

Luis Fernando do Carmo Morato

**EFEITOS DO INSETICIDA ACEFATO EM MODELOS SIMPLES DE
MEMBRANAS LIPÍDICAS BASEADOS EM FILMES DE LANGMUIR E GUVS:
INTERAÇÕES EM NÍVEL MOLECULAR E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS**

Luis Fernando do Carmo Morato

**EFEITOS DO INSETICIDA ACEFATO EM MODELOS SIMPLES DE
MEMBRANAS LIPÍDICAS BASEADOS EM FILMES DE LANGMUIR E GUVS:
INTERAÇÕES EM NÍVEL MOLECULAR E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS**

Monografia apresentada como requisito para o
Defesa de Mestrado na área de Ciência dos Materiais,
junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Materiais (POSMAT).

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Leopoldo
Constantino

Coorientador: Dr. Wallance Moreira Pazin

M831e Morato, Luis Fernando do Carmo
Efeitos do inseticida acefato em modelos simples de membranas lipídicas baseados em filmes de Langmuir e GUVs: interações em nível molecular e alterações morfológicas / Luis Fernando do Carmo Morato. -- Bauru, 2021
111 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino
Coorientador: Wallance Moreira Pazin

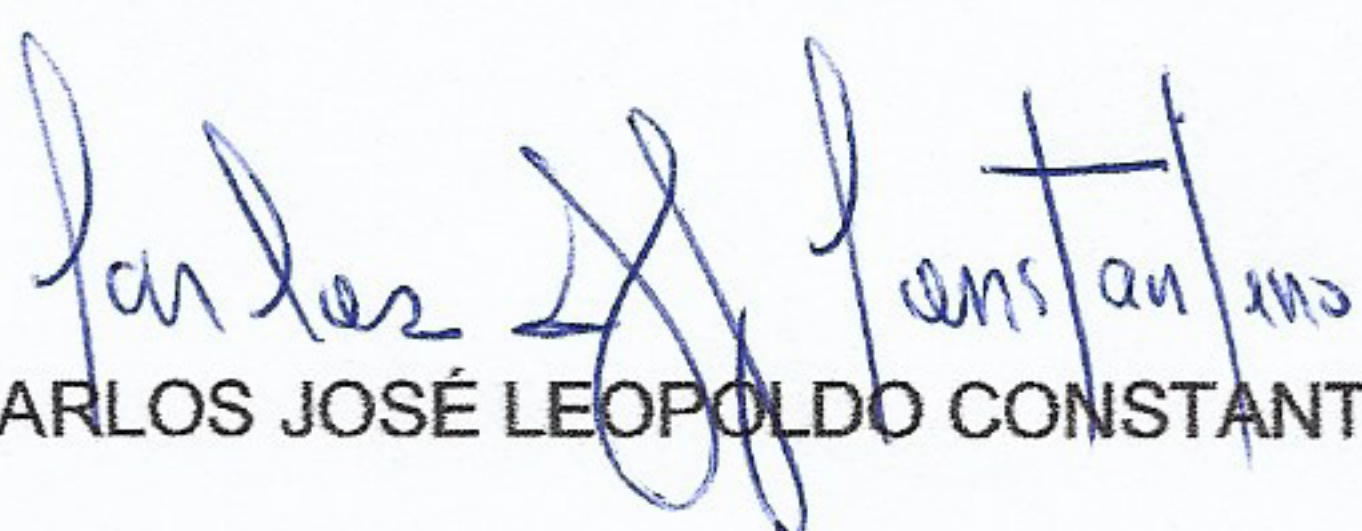
1. Modelos de membrana. 2. Agrotóxicos. 3. Lipídios. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUÍS FERNANDO DO CARMO MORATO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 21 dias do mês de janeiro do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUÍS FERNANDO DO CARMO MORATO, intitulada **Efeitos do inseticida acefato em modelos simples de membranas lipídicas baseados em filmes de Langmuir e GUVs: interações em nível molecular e alterações morfológicas.** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Profa. Dra. KARIN DO AMARAL RISKE (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biofísica / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP, Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual) do(a) Departamento Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai e ao meu irmão, pelo incentivo,
paciência e companheirismo.

Dedico ao meu orientador, Casé, e ao meu co-
orientador, Wallance, por fazer esse trabalho
possível.

Dedico à minha mãe, por ser minha maior
inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial ao meu pai, Fernando, e ao meu irmão, João Pedro, que, apesar de todas as desavenças, sempre me deram força em tudo e sempre estiveram presentes nas horas boas e nas ruins. Em especial também agradeço meus tios Valdir e Edna, por sempre estarem presentes na minha vida.

Agradeço aos meus amigos Fernando (Batman), Pedro (Slash), Dimitri, Duzão e em especial ao Luis Felipe, meu segundo irmão, sempre companheiro e sincero, me escutando nas horas boas e ruins da vida, me acompanhando sempre no Magic e nas festas.

Quero agradecer também aos membros e ex-membros dos grupos Noix e Shoix pelos momentos juntos, churrascos e conversas: Leonardo, Jaqueline, Cibely, Henry, Kay, Marcelão, Malu, Gabriel, Vitória, Bina, João. Agradeço especialmente à Gilia e Diego pelos conselhos, conversas, ajudas nos trabalhos, pela companhia nos congressos e pelo companheirismo na vida (e nas festas), e ao Pedro e Rafa, por me acompanharem no início da Iniciação Científica, me ensinando tudo o que era novo pra mim naquele momento. Agradecimentos em especial também ao Mateusão por dividir a casa por um tempo, por me aturar todos os dias, sendo companheiro e me escutando em todas as horas, pelas ajudas e pelas partidas de Magic.

Agradeço ao meu coorientador, também membro no Noix, Wallance. Os conselhos que me dá sempre ajudam, sendo eles na área profissional ou como amigo. Sempre sendo sincero comigo e dando dicas valiosas que me fortalecem.

Agradeço ao meu professor e orientador Casé. Todo o caminho que estou trilhando devo a ele. Não seria capaz perceber o que poderia fazer em minha vida sem os conselhos dados em reuniões, churrascos, cafés ou em conversas em sua sala. Graças ao Casé, não desisti de completar o curso, não desisti de seguir para a pós-graduação. Mesmo que não tenha dito pessoalmente, as palavras que ouvia dele em palestras, reuniões ou nas comemorações do Noix sempre me inspiram e me fazem refletir.

Agradeço à Priscila, que foi minha orientadora no TCC da graduação. As palavras que me disse em sua sala no momento em que estava escrevendo a primeira versão desta monografia me fizeram tomar rumo, me inspiraram para que eu pudesse colocar um objetivo palpável na minha vida. Os truques estão mais escassos, mas os conselhos são eternos.

Agradeço ao professor Ludovico e ao seu grupo de pesquisa em Lecce: Paola, Michela, Rosanna, Gabrielle, Simona, Francesco e Livia, por todos os momentos no período de estágio, pelos cafés, conversas e ajudas no laboratório.

Agradeço ao aluno Orisson P. Gomes (Unesp – Bauru) e ao professor Augusto Batagin-Neto (Unesp – Itapeva) pela contribuição no trabalho com os resultados de simulação computacional. Agradeço também o professor Osvaldo Novais de Oliveira Junior (IFSC – USP de São Carlos) por disponibilizar os equipamentos de PM-IRRAS e BAM, possibilitando a conclusão dos resultados.

Agradeço à FAPESP e à CAPES pelo suporte financeiro durante todo o período de Mestrado, possibilitando o desenvolvimento da pesquisa presente nessa dissertação e a realização do estágio de pesquisa no exterior: bolsa de mestrado no país processo FAPESP - 2018/01984-8 e CAPES – 1766881; bolsa BEPE/FAPESP - processo 2019/23123-4.

Dentre todas as pessoas que passaram ou ainda estão em minha vida, há uma que já agradei, agradeço de novo e continuarei agradecendo no futuro: minha mãe, Ednéia. Mesmo não estando presente neste plano, mesmo não sabendo como é a vida que tem agora, você está viva em meus pensamentos, no meu coração, no meu dia a dia. Você sempre me agracia com sua presença em minhas lembranças, nas memórias que tenho de você que espero que nunca se apaguem, e nos álbuns da família que, vez ou outra, folheio pra matar a saudade. Todo meu trabalho, todas as minhas conquistas, tudo em minha vida, será dedicado a você onde quer que você esteja. Muito obrigado por ter sido a pessoa mais maravilhosa que já passou pela minha vida.

“Quando o tempo afeta uma parte do corpo com dor, as outras partes sofrem.
Se você não sente a dor dos outros, não merece ser chamado de humano”
(adaptado de Saadi Shirazi)

Resumo da monografia

O acefato é um dos agrotóxicos mais utilizados em lavouras brasileiras e possui o maior índice de uso irregular registrado pela Anvisa. Proveniente da família dos organofosforados, este inseticida foi escolhido por nós para ser investigado neste trabalho pelo potencial de riscos à saúde humana, principalmente ao sistema neurológico. A fim de se estudar os efeitos do acefato em membranas plasmáticas, sistemas miméticos destas estruturas baseados em monocamadas (filmes de Langmuir) e bicamadas (vesículas unilamelares gigantes – GUVs, e grandes - LUVs) lipídicas foram utilizados. Focamos nos fosfolipídios DPPC, que possui duas caudas de hidrocarboneto saturadas e uma cabeça zwitteriônica, e POPC, que difere do DPPC no comprimento de uma das cadeias e por uma insaturação na cadeia alifática, porém mimetiza a fase fluida da membrana plasmática. Outros quatro lipídios que possuem dupla cauda saturada e compartilham grupos químicos referentes à cabeça polar dos fosfolipídios foram utilizados: DODAB (grupo amônia quaternária); DHP (grupo fosfato); DPTAP (grupo glicerol e grupo colina); e DPPA (grupo glicerol e grupo fosfato). Nos estudos de filmes de Langmuir apenas os lipídios DODAB e DPTAP tiveram suas isotermas π -A deslocadas e a morfologia alterada. Espectros de PM-IRRAS permitiram atribuir tais efeitos a afinidade dos grupos positivos da cabeça dos lipídios DPPC, DODAB e DPTAP com o acefato. Enquanto que em GUVs de DPPC, POPC, DODAB e DPTAP não foram observadas alterações morfológicas significativas na presença do acefato, LUVs de DPPC, DODAB e DPTAP indicaram que apenas aquelas formadas a partir de lipídios catiônicos apresentaram aumento no diâmetro e diminuição do potencial zeta quando na presença do pesticida. Experimentos realizados com monocamadas e bicamadas de POPC não evidenciaram nenhum efeito do acefato nestas estruturas. Porém, dada a afinidade do acefato por estruturas positivas, os resultados sugerem que processos biológicos governados por espécies que apresentem tais estruturas, se na presença do acefato, podem perder sua função pela ação do pesticida via interação eletrostática.

Palavras-chave: acefato, filmes de Langmuir, PM-IRRAS, BAM, GUVs, LUVs.

Abstract

Acephate is one the agrochemicals most used in Brazilian crops and the first used in irregular ways registered by Anvisa. Being of organophosphorus family, this insecticide was chosen by its potential risk to the human health, mainly in the neurological system. In order to study the effects of acephate in cell membranes, mimetic systems of these structures based on lipid monolayers (Langmuir films) and bilayers (Giant Unilamellar Vesicles – GUVs and Large Unilamellar Vesicles - LUVs) were evaluated. We focused on the phospholipids DPPC, which has two saturated hydrocarbon chains and a zwitterionic head, and POPC, which differs from DPPC by an unsaturation and length in one of the aliphatic chain, but mimetics the fluid phase of cell membrane. Another four lipids which have saturated chain and shares chemical groups relative to the polar head of the phospholipids were used: DODAB (quaternary ammonium group); DHP (phosphate group); DPTAP (glycerol and choline group); and DPPA (glycerol and phosphate group). In Langmuir films experiments, only DODAB and DPTAP showed interaction with acephate, once its π -A isotherms shifted to smaller molecular areas and its morphology had alterations. PM-IRRAS spectra reveals that these effects are due the affinity between the positive head groups of DPPC, DODAB and DPTAP with acephate. Despite DPPC, POPC, DODAB and DPTAP GUVs morphology did not change in presence of acephate, DPPC, DODAB and DPTAP LUVs indicated that only cationic ones were affected in presence of the pesticide, once its size increase and the zeta potential diminish. Monolayers and bilayers of POPC does not reveal any interaction with the insecticide. However, due the affinity of acephate by positive structures, the results suggests that biological process governed by species which present those structures, if in presence of acephate, can loss its function by the action of the pesticide by electrostatic interaction.

Keywords: acephate, Langmuir films, PM-IRRAS, BAM, GUVs, LUVs.

Lista de Figuras

Figura 1: estrutura molecular do pesticida acefato.

Figura 2: Figura 2: detecções de agrotóxicos em amostras analisadas nos períodos de (a) 2013-2015; e (b) 2017-2018. As tabelas superiores são referentes a dados sobre os agrotóxicos com maior número de detecções, incluindo o acefato; as tabelas inferiores remetem aos agrotóxicos com número de detecções irregulares superior a (a) 30 detecções e (b) 20 detecções. O acefato está destacado em vermelho. Tabelas retiradas e editadas de [23] (Anvisa, 2016, p. 32-33) (a) e [24] (Anvisa, 2019, p. 39-41) (b). Esquema de cores – (a) cor azul: resíduos com concentrações menores ou iguais ao máximo permitido; cor laranja: resíduos não autorizados para a cultura; cor vinho: resíduos com concentrações maiores que o máximo permitido. (b) cor azul: resíduos com concentrações menores ou iguais ao máximo permitido; cor laranja: resíduos não autorizados para a cultura; cor rosa: resíduos com concentrações maiores que o máximo permitido.

Figura 3: (a) cuba de Langmuir; e (b) representação da compressão de moléculas pelas barreiras (fora de escala). Adaptado de [34].

Figura 4: exemplo de isoterma π -A e detalhamento de suas fases. Adaptado de [35].

Figura 5: representação da projeção de isotermas π -A de um lipídio puro ou na presença de analito (concentrações A e B).

Figura 6: (a) esquema de incidência do raio infravermelho e suas polarizações em uma medida PM-IRRAS adaptado de [46]; (b) exemplo de espectro gerado pela técnica, no caso, para o fosfolipídio DPPC na presença de EE2. Adaptado de [47].

Figura 7: representação do espectro PM-IRRAS de uma monocamada lipídica na região da cauda de hidrocarbonetos com as bandas do estiramento simétrico e assimétrico de CH₂ (ν sCH₂ e ν asCH₂, respectivamente). Adaptado de [47].

Figura 8: esquematização de (a) ângulo de Brewster; (b) microscopia por Ângulo de Brewster (BAM) acoplado à cuba de Langmuir; (c) representação de imagem obtida através de BAM.

Figura 9: valores de parâmetros críticos de empacotamento (CPP), seus respectivos formatos e estruturas lipídicas formadas. À esquerda encontra-se a fórmula para calcular o CPP e os parâmetros utilizados em relação a uma molécula lipídica. Adaptado de [58].

Figura 10: grupos de vesículas conforme número de lamelas e tamanhos.

Figura 11: Figura 11: (a) fases encontradas nas vesículas compostas por apenas um tipo de molécula dependendo da temperatura de transição de fase (T_m) e as respectivas conformações das cadeias de hidrocarbonetos. (b) conformação cis presente na cadeia de carbonos de lipídios insaturados, como o POPC, independente de sua fase.

Figura 12: esquema de funcionamento da microscopia por contraste de fase. Adaptado de [70].

Figura 13: estruturas moleculares dos lipídios (a) DPPC (L- α -1,2-dipalmitoil-sn-3-glicerofosfatidilcolina); (b) DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio); (c) DHP (dihexadecil fosfato); (d) DPTAP (1,2 dipalmitoil-3- trimetilamônio propano); (e) DPPA (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfato); (f) POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina). Vermelho: grupo colina/amônia quaternária (DODAB); amarelo: grupo glicerol; azul: grupo fosfato; verde: insaturação.

Figura 14: esquema de eletroformação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Adaptado de [39].

Figura 15: esquema ilustrativo de formação por gel das GUVs de POPC.

Figura 16: isotermas π -A de DODAB na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. Atividade superficial da subfase com acefato 10^{-3} mol/L (inset abaixo). A estrutura do DODAB é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

Figura 17: isotermas π -A de DPTAP na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DPTAP é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

Figura 18: isotermas π -A de DHP na ausência e presença de acefato na subfase nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DHP é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

Figura 19: isothermas π -A de DPPA na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DPPA é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

Figura 20: isothermas π -A de DPPC na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DPPC é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

Figura 21: projeção IDMAP das triplicatas das isothermas π -A dos lipídios DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC na ausência e presença de acefato (10^{-4} e 10^{-3} mol/L). Cada conjunto (*cluster*) remete a uma triplicata de resultados.

Figura 22: módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) das médias das isothermas π -A das monocamadas de (a) DODAB; (b) DPTAP; (c) DHP; (d) DPPA; e (e) DPPC, na ausência e presença de acefato (10^{-4} mol/L). As linhas tracejadas em laranja destacam a pressão de superfície de 30 mN/m, valor utilizado nas análises.

Figura 23: espectros PM-IRRAS de DODAB na ausência (espectros pretos) e presença (espectros vermelhos) de acefato em concentração igual a 10^{-4} mol/L referentes à região da cauda apolar (a) e da cabeça polar (b).

Figura 24: espectros PM-IRRAS de DPTAP na ausência (espectros pretos) e presença (espectros vermelhos) de acefato em concentração igual a 10^{-4} mol/L referentes à região da cauda apolar (a) e da cabeça polar (b).

Figura 25: espectros PM-IRRAS de DPPC na ausência (espectros pretos) e presença (espectros vermelhos) de acefato em concentração igual a 10^{-4} mol/L referentes à região da cauda apolar (a) e da cabeça polar (b). As atribuições dos valores destacados estão no texto. Ir: Intensidade relativa.

Figura 26: mapa colorido dos sítios mais reativos (e mais negativos) e dos sítios menos reativos (e mais positivos) das moléculas de acefato, DPPC, DODAB, DHP, DPTAP e DPPA. f^+ e f^- definem os sítios reativos do acefato e dos lipídios em relação a agentes nucleófilos e eletrófilos, respectivamente.

Figura 27: mapa colorido dos sítios mais reativos (e mais negativos) e dos sítios menos reativos (e mais positivos) dos sistemas adsorvidos de acefato+DPPC, DODAB ou DPPA. f^+ e f^- definem os sítios reativos do acefato e dos lipídios em relação a agentes nucleófilos e eletrófilos, respectivamente.

Figura 28: (a) momento de dipolo do acefato, na qual os átomos estão representados pelas esferas no seguinte esquema de cores: amarelo-enxofre; laranja-fósforo; vermelho-oxigênio; azul-nitrogênio; cinza-carbono; e branco-hidrogênio. Ilustrações esquemáticas das monocamadas de (b) DODAB; (c) DPTAP; e (d) DPPC na presença de acefato. Os grupos das cabeças dos lipídios seguem o seguinte esquema de cor: vermelho-glicerol; laranja-fosfato; e verde-colina/amônia quaternária.

Figura 29: imagens de BAM de monocamadas de Langmuir de DODAB, DPTAP e DPPC na ausência e na presença de acefato (10^{-4} mol/L). As barras de escala equivalem a 40 μm .

Figura 30: GUVs de DODAB e DPTAP em solução de glicose a uma temperatura de 20 ± 1 °C. Cada linha corresponde à uma formação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira formação). As barras de escala equivalem a 10 μm .

Figura 31: GUVs de DODAB e DPTAP em solução de glicose com acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L) a uma temperatura de 20 ± 1 °C. Cada linha corresponde à uma formação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira formação). As barras de escala equivalem a 10 μm .

Figura 32: análise quantitativa (em média de porcentagem) das GUVs de (a) DODAB e (b) DPTAP na ausência (barra cinza) e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L – barra vermelha). Cada conjunto de barras cinza/vermelha corresponde a um conjunto de GUVs sendo: total, perda de contraste de fase e presença de protrusão.

Figura 33: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC em solução de glicose (0,2 mol/L), a uma temperatura de 20 ± 1 °C. Cada linha corresponde a uma eletroformação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira eletroformação). As barras de escala equivalem a 10 μm .

Figura 34: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC em solução de glicose + acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L). Cada linha corresponde à uma eletroformação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira eletroformação). As barras de escala equivalem a 10 μm . A região destacada em laranja na Figura 34 – A equivale a primeira GUV a perder o contraste de fase, enquanto a região destacada de verde equivale a segunda GUV.

Figura 35: análise quantitativa (em média de porcentagem) das GUVs de DPPC na ausência (barra cinza) e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L – barra vermelha). Cada conjunto de barras cinza/vermelha corresponde a um conjunto de GUVs sendo: total, perda de contraste de fase e presença de protrusão.

Figura 36: (a) diâmetros e (b) valores de potencial zeta das LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC em diferentes concentrações de acefato.

Figura 37: (a) isothermas π -A de POPC na ausência (linha preta) e presença (linha azul) de acefato (10^{-4} mol/L); (b) módulo de compressibilidade das monocamadas de POPC na ausência (em preto) e presença (em azul) do pesticida. A linha tracejada em laranja na Figura 37-a remete à área extrapolada referente à pressão de 30 mN/m. Já na Figura 37-b, tal traço indica a mesma pressão para a análise.

Figura 38: projeção IDMAP das triplicatas das isothermas π -A do lipídio POPC na presença e ausência de acefato (10^{-4} mol/L) em comparação às projeções dos lipídios DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC na ausência e presença de acefato (10^{-4} e 10^{-3} mol/L). Cada conjunto (*cluster*) remete a uma triplicata de resultados. AU: subfase de água ultrapura. ACE: subfase de solução de acefato. Ampliação: região dos clusters de POPC.

Figura 39: GUVs de POPC na ausência (esquerda) e presença (direita) de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L). Cada linha corresponde à uma formação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira formação). A barra de escala equivale a 10 μ m. Os destaques em amarelo e verde (linha C, presença de acefato) remetem a duas GUVs diferentes, uma vez que a primeira perdeu o contraste de fase em cerca de 5 minutos de observação.

Figura 40: análise quantitativa (em média de porcentagem) das GUVs de POPC na ausência (barra cinza) e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L – barra vermelha). Cada conjunto de barras cinza/vermelha corresponde a um conjunto de GUVs sendo: total, perda de contraste de fase e presença de protrusão.

Lista de Tabelas

Tabela 1: valores do módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) das monocamadas de DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC, na ausência e na presença de acefato referentes à pressão de superfície de 30 mN/m

Tabela 2: atribuições das bandas encontradas para os espectros PM-RRAS de DPPC na ausência e na presença de acefato

Tabela 3: energias de adsorção para os sistemas acefato+DPPC, +DODAB ou +DPTAP em gás e em água

Tabela 4: diâmetro, PdI e potencial zeta de LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC em diferentes concentrações de acefato

SUMÁRIO

1	Capítulo 1 – Introdução	20
1.1	Poluentes emergentes: pesticidas.....	20
1.2	Acefato	22
1.3	Sistemas miméticos: modelos de membranas celulares.....	24
2	Capítulo 2 – Conceitos Teóricos	26
2.1	Filmes de Langmuir: isothermas π -A e módulo de compressibilidade.....	26
2.2	Técnica de projeção.....	28
2.3	Espectroscopia PM-IRRAS.....	30
2.4	Cálculos teóricos e modelagem molecular.....	32
2.5	Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM).....	33
2.6	Bicamadas lipídicas.....	35
2.7	Microscopia por contraste de fase.....	39
2.8	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta.....	40
3	Capítulo 3 – Justificativa e Objetivos.....	42
3.1	Justificativa.....	42
3.2	Objetivos	43
4	Capítulo 4 – Materiais e Métodos.....	45
4.1	Acefato e lipídios.....	45
4.2	Obtenção dos filmes de Langmuir.....	46
4.3	Espectros PM-IRRAS.....	46
4.4	Cálculos teóricos e modelagem molecular.....	47
4.5	Obtenção de imagens por BAM.....	48
4.6	Formação e obtenção de imagens de GUVs de DPPC, DODAB, DPTAP e POPC.....	49
4.7	Formação e caracterização de LUVs.....	52
5	Capítulo 5 – Resultados e discussão.....	54
5.1	Isothermas π -A	54
5.2	PM-IRRAS dos lipídios DODAB, DPTAP e DPPC.....	66
5.3	Modelagem molecular.....	72
5.4	Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM).....	77
5.5	Microscopia por contraste de fase de GUVs de lipídios catiônicos (DODAB e DPTAP).....	79
5.6	Microscopia por contraste de fase de GUVs de DPPC.....	83
5.7	Diâmetro e potencial zeta de LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC.....	87
5.8	Monocamadas e bicamadas de POPC: estudo de fluidez.....	90

6	Capítulo 6 – Conclusões.....	96
	Referências.....	98

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Poluentes emergentes: pesticidas

Uma das maiores preocupações mundiais da atualidade é a influência das substâncias chamadas poluentes emergentes no meio ambiente e nos seres vivos, principalmente nos seres humanos. Tais substâncias são classificadas como contaminantes que se situam principalmente em efluentes e podem ser originários de fármacos, hormônios, solventes, produtos hospitalares e pesticidas, entre outros [1–3]. Esses contaminantes, dependendo das concentrações em que se encontram no meio, do período de exposição e dos produtos de sua degradação, podem apresentar riscos à saúde dos seres vivos por afetar negativamente tais organismos de diversas formas, como, por exemplo, o desregulamento do sistema endócrino, o que já vem sendo observado para seres aquáticos e aves [4]. Porém, por se tratarem muitas vezes de materiais não regulamentados ou até mesmo proibidos, seu monitoramento é deficiente, tornando seus demais efeitos desconhecidos.

No Brasil, uma das categorias de poluentes emergentes que é alvo de estudos constantes são os agrotóxicos, também chamados de pesticidas, defensores agrícolas, agentes fitossanitários ou agroquímicos. Independentemente da nomenclatura, são definidos pela Lei de Agrotóxicos nº 7802, de 12 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 [5] como

“produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

O Brasil é o primeiro no ranking mundial de utilização desses materiais [6], atingindo a quantidade média consumida por pessoa de aproximadamente 5 litros anuais. O uso excessivo está ligado ao fato do país possuir sua economia bastante focada na área agrícola, ocasionada pela chamada Revolução Verde, “um conjunto de estratégias e inovações tecnológicas que teve como escopo alcançar maior produtividade através do desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização de solos, utilização de agrotóxicos e mecanização agrícola” (Serra et al., 2016, p.4) [7] a fim de combater a fome no país. Tal ação governamental impactou na relação “utilização de defensivos agrícolas/área plantada” desde a década de 1960 até os dias atuais. Pode-se citar o aumento entre os anos de 1964 até 1991 de 16 mil para 60,2 mil toneladas de agrotóxicos utilizados em 28,4/50 milhões de hectares, respectivamente (um aumento de 276,2 % da utilização de defensivos agrícolas para 76 % de área plantada), como mostra Campanhola & Bettiol [8]. Mais recentemente, no ano de 2010, mais de 1 milhão de toneladas de agrotóxicos foram utilizados em lavouras, além do gasto mundial anual de 12 bilhões de dólares destinados a esses produtos [7]. A utilização de agrotóxicos em larga escala no Brasil também se deve ao fato de que o país possui um clima tropical, não havendo um período de inverno capaz de interromper os ciclos das pragas, permitindo que elas se proliferem sem interrupções [9]. Esse aumento da aplicação dos agrotóxicos, muitas vezes utilizados de forma irregular, causa a intoxicação humana e a contaminação do meio ambiente, como revela Faria et al., [10] que aponta 70 mil intoxicações seguidas de morte e 7 milhões de doenças agudas ou crônicas anuais em seres humanos. Segundo dados do Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos de 2018 publicado pelo Ministério da Saúde [11], foram notificadas 84.206 intoxicações por agrotóxicos no Brasil entre 2007 e 2015, sendo 15.042 desses casos somente no estado de São Paulo. Levando em conta dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgados pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná [12], esse

valor pode ser ainda maior, pois, a cada caso notificado, estima-se que outros cinquenta casos não possuem nenhum registro em órgãos competentes.

1.2 Acefato

Um dos agrotóxicos mais utilizados nas lavouras brasileiras é o acefato (O,S-dimetil acetilfosforamidotioato) (Figura 1), inseticida e acaricida da família dos organofosforados, que são compostos formados por ésteres de ácido fosfórico, possuindo variações com oxigênio, carbono e enxofre ou nitrogênio [13]. Este defensivo agrícola é utilizado em culturas como amendoim, algodão, citros, feijão, melão, milho, soja e tomate, e sua classificação toxicológica, segundo normativa recentemente revisada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), é 3 (moderadamente tóxico), numa escala de 1 a 5 (excluindo as substâncias não classificadas), sendo 1 = produto extremamente tóxico e 5 = produto improvável de causar dano agudo. [14,15].

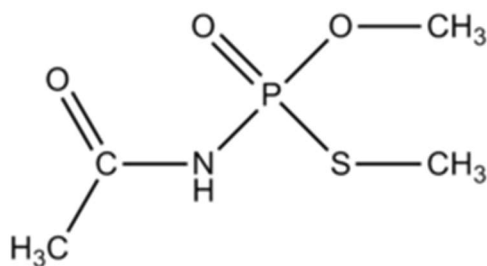


Figura 1: estrutura molecular do pesticida acefato.

O grupo dos organofosforados é responsável por intoxicações por via respiratória, digestiva ou cutânea (através da pele), resultando em sintomas como desmaios, problemas respiratórios e neurais e, ainda, é classificado como potencialmente carcinogênico, ou seja, causador de câncer [16,17]. Estudos ainda apontam como principal ação do pesticida em mamíferos e insetos a inibição da enzima acetilcolinesterase pela ligação covalente entre o

átomo de fósforo do acefato e o átomo do oxigênio do aminoácido serina presente na enzima, impedindo a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, causando sintomas hipercolinérgicos [18–20]. Outros possíveis mecanismos da inibição enzimática provém da interação eletrostática entre o acefato e a acetilcolinesterase [21]. Tais efeitos sobre os seres humanos levou a Anvisa a proibir o uso do acefato em algumas culturas e limitá-lo em outras. Porém, estudos realizados pela mesma agência entre os anos de 2013 e 2015 revelam o uso irregular do pesticida, como mostram os dados da Figura 2-a [22,23]. O mesmo estudo, realizado, porém, entre os anos de 2017 e 2018 revela que, apesar do acefato ter caído de posição entre os agrotóxicos mais detectados em amostras, continua sendo o mais utilizado de maneira irregular (Figura 2-b) [24].

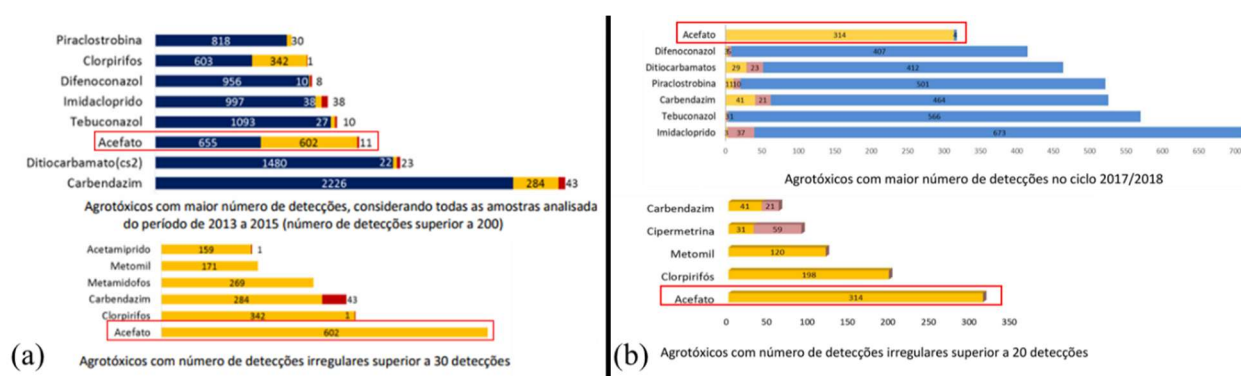


Figura 2: detecções de agrotóxicos em amostras analisadas nos períodos de (a) 2013-2015; e (b) 2017-2018. As tabelas superiores são referentes a dados sobre os agrotóxicos com maior número de detecções, incluindo o acefato; as tabelas inferiores remetem aos agrotóxicos com número de detecções irregulares superior a (a) 30 detecções e (b) 20 detecções. O acefato está destacado em vermelho. Tabelas retiradas e editadas de [23] (Anvisa, 2016, p. 32-33) (a) e [24] (Anvisa, 2019, p. 39-41) (b). Esquema de cores – (a) *cor azul: resíduos com concentrações menores ou iguais ao máximo permitido; cor laranja: resíduos não autorizados para a cultura; cor vinho: resíduos com concentrações maiores que o máximo permitido.* (b) *cor azul: resíduos com concentrações menores ou iguais ao máximo permitido; cor laranja: resíduos não autorizados para a cultura; cor rosa: resíduos com concentrações maiores que o máximo permitido.*

Nota-se nos dados revelados pela Anvisa (Figura 2-a) que o acefato foi o terceiro agrotóxico mais detectado nas culturas entre os anos de 2013 e 2015, sendo que quase metade foi utilizado de forma irregular ou acima do máximo permitido (faixas laranja e vinho, respectivamente). Já entre os anos de 2017 e 2018 (Figura 2-b), apesar de ter sido o sétimo agrotóxico mais detectado, quase sua totalidade foi utilizada de maneira irregular ou acima do limite permitido. Tal limite (chamado de LMR – Limite Máximo Permitido) atinge proporções preocupantes se comparados à União Europeia (UE), por exemplo. Segundo Lombardi, em seu livro “Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia” [25], o LMR de acefato permitido em culturas de soja na UE é de 0,3 mg/kg, enquanto no Brasil o LMR é de 1 mg/kg, ou seja, 3,3 vezes maior. Em outras culturas, como melão e citros, o limite brasileiro é de 10 e 20 vezes maior (0,01/0,1 mg/kg e 0,01/0,2 mg/kg), respectivamente [25]. Já para o LMR em água potável, o valor permitido na UE é de 0,01 µg/L, enquanto no Brasil não há limite estabelecido [25]. Além disso, o acefato ocupa a primeira posição entre os agrotóxicos utilizados de maneira irregular segundo dados divulgados pela ANVISA no ano de 2019 [24]. Tais dados, somados ao impacto do pesticida ao meio ambiente e seus efeitos negativos aos seres vivos, apontam a importância do estudo dos efeitos desconhecidos do mesmo sobre os seres humanos.

1.3 Sistemas miméticos: modelos de membranas celulares

A fim de analisar os efeitos de pesticidas no corpo humano ou de mamíferos, métodos *in vivo* ou *in vitro* são empregados. Porém, a dificuldade em se determinar as estruturas celulares afetadas pelo pesticida dada a complexidade do sistema biológico abre a possibilidade de se simplificar o alvo dos poluentes. Nesse quesito, sistemas miméticos (que mimetizam, ou seja, imitam algo) são alternativas viáveis que podem contribuir para esclarecer os mecanismos de interação entre o analito e alguma estrutura celular escolhida. Dentre essas estruturas

encontra-se a membrana plasmática, um envoltório que possui como características i) ser uma barreira seletivamente permeável, constituída por moléculas lipídicas que possuem uma alta mobilidade, e que estão dispostas em bicamadas de aproximadamente 5 nm de espessura; ii) ser responsável por permitir ou não a passagem de agentes externos ou internos para dentro ou para fora da célula, respectivamente, sendo assim a primeira via de entrada nas células [26,27]. Esses envoltórios são formados majoritariamente por proteínas, que desempenham papel importante no transporte das moléculas que entram e saem da célula, e por lipídios, que dão forma às bicamadas [28,29]. Portanto, para mimetizar a estrutura lipídica da membrana plasmática, utilizar lipídios em sistemas que se estruturam na forma de bicamadas ou monocamadas é uma alternativa para estudar sua interação com o pesticida.

Capítulo 2

Conceitos Teóricos

Capítulo 2 - Conceitos Teóricos

2.1 Filmes de Langmuir: isothermas π -A e módulo de compressibilidade

No preparo de filmes de Langmuir [30,31], um volume predefinido de uma solução de moléculas anfifílicas (composta por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica) com solvente volátil é espalhado de forma homogênea na superfície da subfase aquosa que se encontra na cuba. Uma vez que o solvente evapora, restam na interface ar/água apenas as moléculas anfifílicas, já que possuem a capacidade de flotar (porção hidrofóbica) e se dispersar (porção hidrofílica) na interface ar/água. Após a evaporação do solvente, duas barreiras se aproximam uma da outra de forma simétrica, comprimindo as moléculas espalhadas na subfase. Um sensor de Wilhelmy acoplado a uma balança é responsável por monitorar a pressão de superfície (π) da subfase na compressão das barreiras (Figura 3-b). O *software*, por sua vez, calcula “ π ” através da diferença entre a tensão superficial da água ultrapura (γ_0 , que vale aproximadamente 72 mN/m à 25 ° C [32,33]) e a tensão superficial da água ultrapura com as moléculas anfifílicas espalhadas (γ), resultando na Equação 1:

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

Equação 1

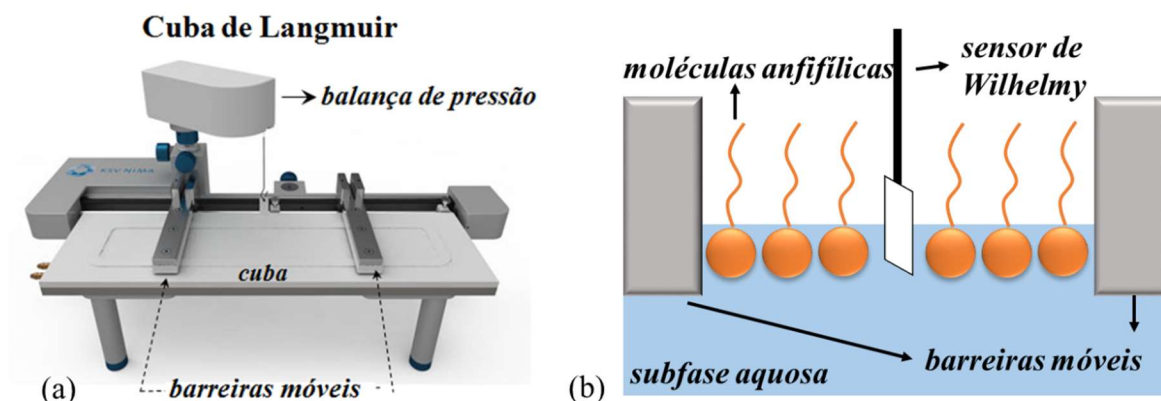


Figura 3: (a) cuba de Langmuir; e (b) representação da compressão de moléculas pelas barreiras (fora de escala). Adaptado de [34].

Uma vez que “ π ” é monitorado durante toda a compressão, é possível a construção de um gráfico que compara a mudança da pressão de superfície em relação à área média das moléculas (A), à temperatura constante, chamado de isoterma π - A (Figura 4). Tal isoterma possui três fases distintas e análogas aos diagramas P - V - T da termodinâmica que simbolizam a distância média entre as moléculas. Essas fases são: gasosa, na qual as moléculas se encontram distantes umas das outras e a pressão de superfície é nula ou quase nula; líquida, na qual as moléculas espalhadas começam a se aproximar e há um aumento gradativo da pressão de superfície; e condensada, na qual as moléculas estão devidamente empacotadas e orientadas, originando o filme de Langmuir [32,33].

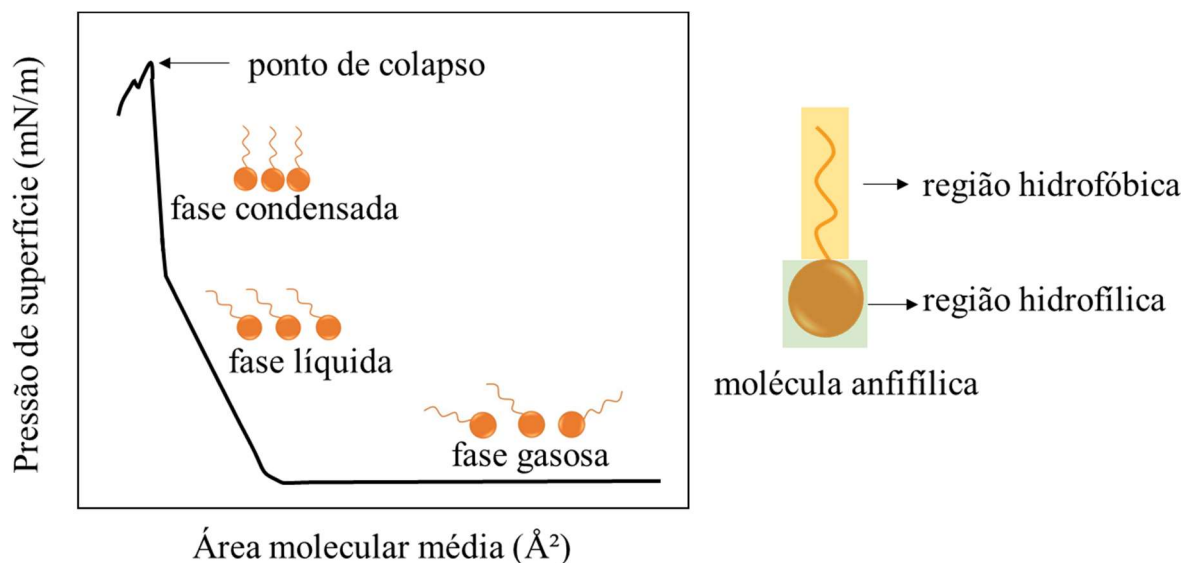


Figura 4: exemplo de isoterma π -A e detalhamento de suas fases. Adaptado de [35].

Através dos valores de pressão de superfície e área molecular média das isotermas π -A pode-se calcular o módulo de compressibilidade da monocamada, que revela o quão rígido é o filme formado [36]. Esse valor é obtido derivando-se os valores de pressão de superfície pelos valores das áreas moleculares médias e multiplicando os valores obtidos pelos valores negativos das áreas moleculares, sempre a uma temperatura constante. O cálculo está representado na Equação 2, na qual “ C_s^{-1} ” é o módulo de compressibilidade, “ π ” é a pressão de superfície, “A” é a área molecular média e “T” é a temperatura.

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

2.2 Técnica de projeção

A fim de facilitar a interpretação dos dados obtidos por meio de isotermas π -A, técnicas de projeção (ou redução de dimensionalidade) baseadas em configuração 2D de distância entre pontos foram aplicadas. Nesse contexto, foram utilizadas duas técnicas que permitem reduzir as curvas obtidas pela técnica de formação de filmes de Langmuir em pontos e posicioná-los

de acordo com a similaridade: o *Sammon's Mapping* (SM) [37] e o *Interactive Document Map* (IDMAP) [38]. Nessas condições, tem-se que o conjunto de dados a ser analisado é dado por $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ com a distância entre os dados “i” e “j” dada por $\delta(x_i, x_j)$. Através da função injetora $f: X \rightarrow Y$ minimiza-se $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(y_j))| \approx 0, \forall x_i, x_j \in X$, determinando-se os valores correspondentes de X para a projeção, onde $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$ e na qual $d(y_i, y_j)$ é a distância entre os pontos para as medidas projetadas [39,40].

No processo, há perda de informação, sendo tal minimizada por uma função (função erro). Para os métodos SM e IDMAP, as funções erro são dadas pelas Equações 3 e 4, respectivamente [38–40]:

$$S = \frac{1}{\sum_{i < j} \delta(x_i, x_j)} \sum_{i < j} \frac{(d(y_i, y_j) - \delta(x_i, x_j))^2}{\delta(x_i, x_j)} \quad \text{Equação 3}$$

$$\Delta = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{\min}}{\delta_{\max} - \delta_{\min}} - d(y_i, y_j) \quad \text{Equação 4}$$

Na Equação 3, δ e d são funções de distância, e na Equação 4, $\delta_{\max}$ e $\delta_{\min}$ são a máxima e a mínima distância entre os objetos (amostras) do espaço original.

A Figura 5 mostra uma representação de como os dados obtidos por isoterma π -A ficam projetados utilizando os métodos descritos acima.

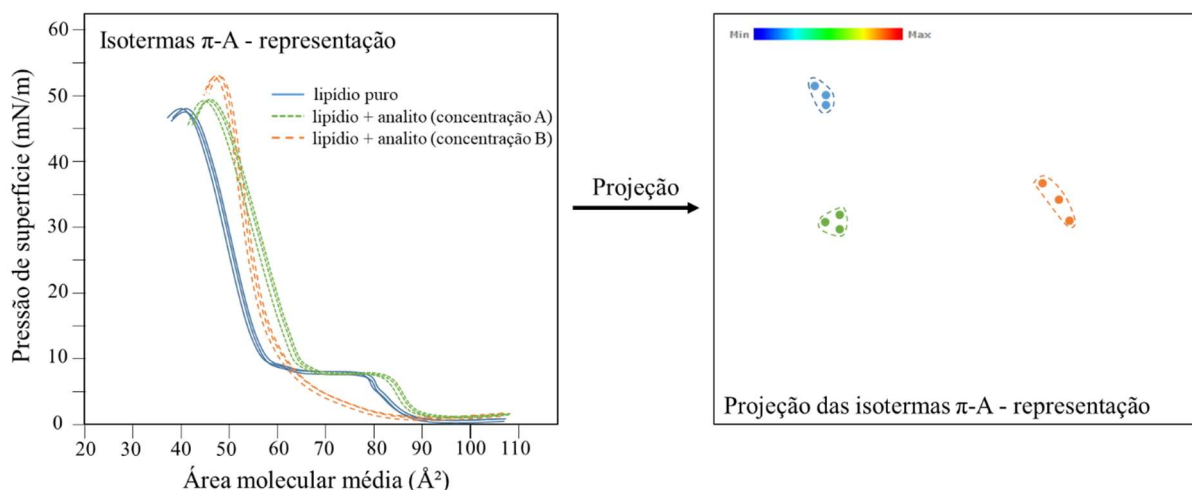


Figura 5: representação da projeção de isotermas π -A de um lipídio puro ou na presença de analito (concentrações A e B).

De acordo com a Figura 5, cada ponto na projeção é referente a uma isoterma π -A, sendo representado por sua respectiva cor. Quanto menor a distância entre os pontos, mais similares (em forma ou em deslocamento de isotermas π -A) são as curvas [41,42]. Os conjuntos de pontos muito próximos (*clusters*) são referentes às triplicatas, revelando sua reprodutibilidade.

2.3 Espectroscopia PM-IRRAS

A espectroscopia PM-IRRAS consiste em incidir um feixe de luz no intervalo do comprimento de onda do infravermelho e medir a diferença na reflexão da luz polarizada incidida, no caso deste trabalho, na interface ar/água. Tal feixe de luz é polarizado em dois planos distintos, chamados “p” (paralelo ao plano de incidência) e “s” (perpendicular ao plano de incidência). Tais polarizações (p e s) são praticamente sobrepostas devido à modulação em alta frequência e seus feixes possuem um ângulo de incidência de aproximadamente 80° [43] (Figura 6-a). O sinal do equipamento é calculado pela diferença dos espectros das duas polarizações, obedecendo a Equação 5, na qual S é o sinal PM-IRRAS, R_p é a refletância da polarização “p” e R_s é a refletância da polarização “s” [43,44]. Tal técnica permite identificar a composição química da monocamada na interface ar/água, bem como as orientações das

moléculas e suas possíveis interações com o analito dissolvido na subfase através dos espectros gerados, como exemplo na Figura 6-b [45].

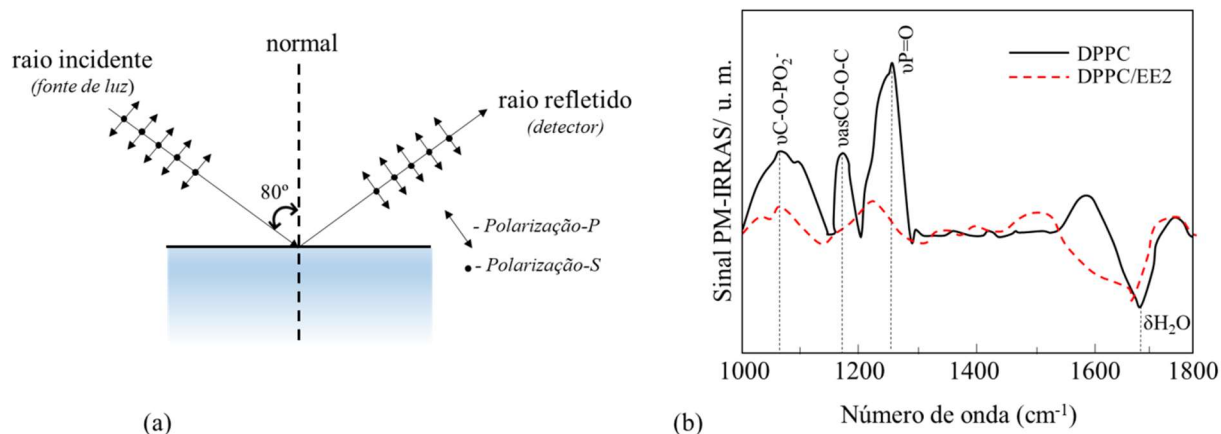


Figura 6: (a) esquema de incidência do raio infravermelho e suas polarizações em uma medida PM-IRRAS adaptado de [46]; (b) exemplo de espectro gerado pela técnica, no caso, para o fosfolípido DPPC na presença de EE2. Adaptado de [47].

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad \text{Equação 5}$$

Em monocamadas lipídicas, os espectros podem ser divididos conforme as regiões das moléculas para uma melhor análise: de 900 a 1800 cm^{-1} (região da cabeça hidrofílica) e de 2800 a 3000 cm^{-1} (região da cauda hidrofóbica) [48,49]. Com relação à região da cauda hidrofóbica, a intensidade relativa (I_r) entre as bandas dos estiramentos simétrico e antissimétrico de CH_2 (Equação 6) indicam o ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos. Ao calcular a variação da I_r (ΔI_r – Equação 7) entre as monocamadas de um mesmo lipídio na ausência e presença do analito (neste caso, o acefato), tem-se que um aumento do valor indica um aumento na desordem das cadeias, enquanto uma diminuição do valor remete ao ordenamento dessa região [47]. A Figura 7 mostra um exemplo ilustrativo de um espectro da região da cauda em uma monocamada lipídica.

$$Ir = \frac{v_s\text{CH}_2}{v_{as}\text{CH}_2} \quad \text{Equação 6}$$

$$\Delta Ir = Ir_{com\ acefato} - Ir_{sem\ acefato} \quad \text{Equação 7}$$

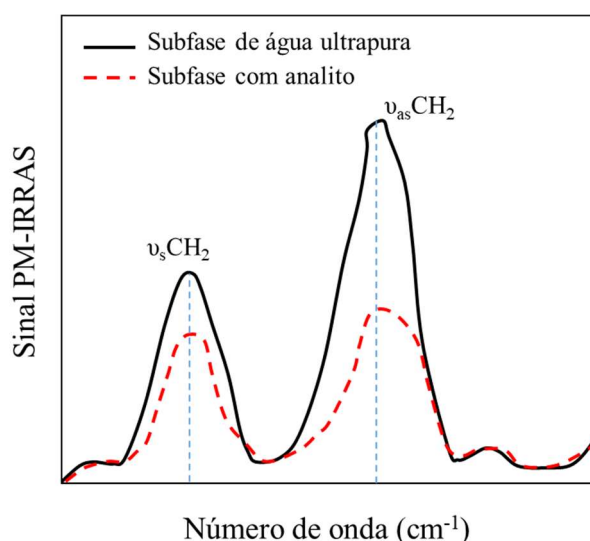


Figura 7: representação do espectro PM-IRRAS de uma monocamada lipídica na região da cauda de hidrocarbonetos com as bandas do estiramento simétrico e assimétrico de CH_2 ($v_s\text{CH}_2$ e $v_{as}\text{CH}_2$, respectivamente). Adaptado de [47].

2.4 Cálculos teóricos e modelagem molecular

Os métodos computacionais têm se mostrado técnicas eficazes no estudo de moléculas por apresentarem suas propriedades estruturais e eletrônicas com êxito, complementando assim os trabalhos realizados em laboratórios. Um dos métodos utilizados é a Teoria do Funcional de Densidade (DFT - *density functional theory*), que tem como principal característica a substituição da função de onda pela densidade eletrônica [50]. Este método pode, em conjunto com outros, indicar a relação entre duas moléculas através de cálculos de energia. Neste contexto, pode-se citar dois outros métodos: o CAFI (*condensed-to-atoms Fukui indexes*) [51,52], que é utilizado na avaliação de interação molecular pelas fronteiras dos orbitais moleculares e podem indicar

os sítios mais reativos das moléculas em relação a agentes externos eletrofílicos (f^-) e nucleofílicos (f^+) [53]; e mapeamento MEP (*molecular electrostatic potential*). Este pode indicar regiões ricas ou deficientes de elétrons, indicando possíveis interações eletrostáticas. Outro programa que se destaca é o ORCA [54], que permite, além de definir parâmetros geométricos das moléculas, inferir o potencial de energia de superfície das mesmas. Portanto, utilizando essas técnicas em conjunto, pode-se montar estruturas 3D das moléculas (utilizando também programas como Gaussian [55] para otimização da geometria molecular), averiguar seus sítios reativos e avaliar as interações entre moléculas, levando em conta também seu potencial de energia de superfície.

2.5 Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM)

A microscopia por ângulo de Brewster (ou BAM) é utilizada para a análise morfológica dos filmes de Langmuir. Tal ângulo é obtido quando, ao incidir um raio de luz não polarizado em determinada superfície, o raio refletido é polarizado e perpendicular ao raio refratado (Figura 8-a). Sendo θ_{Brewster} : ângulo de Brewster; θ_r : ângulo de refração; n_1 : índice de refração do meio 1 (ar, no caso da cuba de Langmuir); n_2 : índice de refração do meio 2 (subfase aquosa, no caso da cuba de Langmuir), define-se o valor de tal ângulo ($51,3^\circ$) da seguinte forma:

Como o raio refletido é perpendicular ao raio refratado, tem-se que:

$$\theta_{\text{Brewster}} + \theta_r = 90^\circ. \quad (1)$$

$$\text{A lei da refração mostra que: } n_1 \cdot \text{sen}\theta_1 = n_2 \cdot \text{sen}\theta_2 \quad (2)$$

No caso do ângulo de Brewster: $\theta_1 = \theta_{\text{Brewster}}$ e $\theta_2 = \theta_r$.

$$\text{Substituindo em (2): } n_1 \cdot \text{sen}\theta_{\text{Brewster}} = n_2 \cdot \text{sen}\theta_r \quad (3)$$

como $\theta_r = 90^\circ - \theta_{\text{Brewster}}$, então

$$n_1 \cdot \text{sen}\theta_{\text{Brewster}} = n_2 \cdot \text{sen}(90^\circ - \theta_{\text{Brewster}}) = n_2 \cos\theta_{\text{Brewster}}$$

$$\text{Logo, } n_1 \cdot \text{sen}\theta_{\text{Brewster}} = n_2 \cdot \text{cos}\theta_{\text{Brewster}} \quad (4)$$

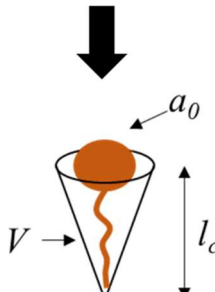
De (4), temos que $\frac{\text{sen}\theta_{\text{Brewster}}}{\text{cos}\theta_{\text{Brewster}}} = \frac{n_2}{n_1}$, mas como $\frac{\text{sen}\theta}{\text{cos}\theta} = \text{tg}\theta$, chega-se na lei do ângulo

de Brewster:

$$\text{tg}\theta_{\text{Brewster}} = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Equação 8}$$

No BAM utilizado em uma cuba de Langmuir, o raio incidente já é polarizado, logo não há reflexão do raio incidido, fazendo com que a subfase pura não seja visualizada (Figura 8-b). Porém, ao espalhar moléculas que se encontram na interface ar/água, como os lipídios, a formação de agregados faz com que o raio incidente seja refletido, possibilitando a visualização de um contraste na qual a região escura remete à ausência de filme e a região mais clara, à presença do material [56] (Figura 8-c).

estrutura a ser formada pelo lipídio desejado, sendo $CPP = V/a_0l_c$ [39,58]. A Figura 9 mostra os diferentes tipos de estruturas possíveis em virtude do valor de CPP.

$$CPP = \frac{V}{a_0l_c}$$


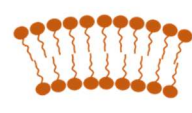
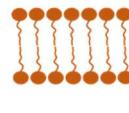
Valor de CPP (formato de CPP)	Tipo de estrutura
$CPP < 1/3$ (cone) 	 Micela esférica
$1/3 < CPP < 1/2$ (cone truncado) 	 Micela cilíndrica
$1/2 < CPP < 1$ (cone truncado) 	 Bicamada flexível (vesícula)
$CPP \sim 1$ (cilindro) 	 Bicamada planar
$CPP > 1$ (cone truncado invertido) 	 Micela inversa

Figura 9: valores de parâmetros críticos de empacotamento (CPP), seus respectivos formatos e estruturas lipídicas formadas. À esquerda encontra-se a fórmula para calcular o CPP e os parâmetros utilizados em relação a uma molécula lipídica. Adaptado de [58].

As vesículas (Figura 9, $1/2 < CPP < 1$) são divididas em grupos dependendo do número de lamelas (camadas) e diâmetro (Figura 10). Vesículas multilamelares (MLVs – *multilamellar vesicles*) possuem mais de uma lamela dispostas concêntricamente, com tamanho maior que 1 μm , enquanto vesículas multivesiculares (MVVs – *multivesicular vesicles*) são formadas por mais de uma lamela, porém não concêntricas. As vesículas unilamelares são formadas por apenas uma lamela e são subdivididas em grupos segundo o diâmetro que possuem: vesículas unilamelares pequenas, grandes ou gigantes. As pequenas (SUVs – *small unilamellar vesicles*) possuem diâmetros menores que 100 nm, enquanto as grandes (LUVs – *large unilamellar*

vesicles) possuem diâmetro maiores que 100 nm e menores que 1 μm . Já as vesículas unilamelares gigantes (GUVs – *giant unilamellar vesicles*) são maiores que 1 μm [59–61].

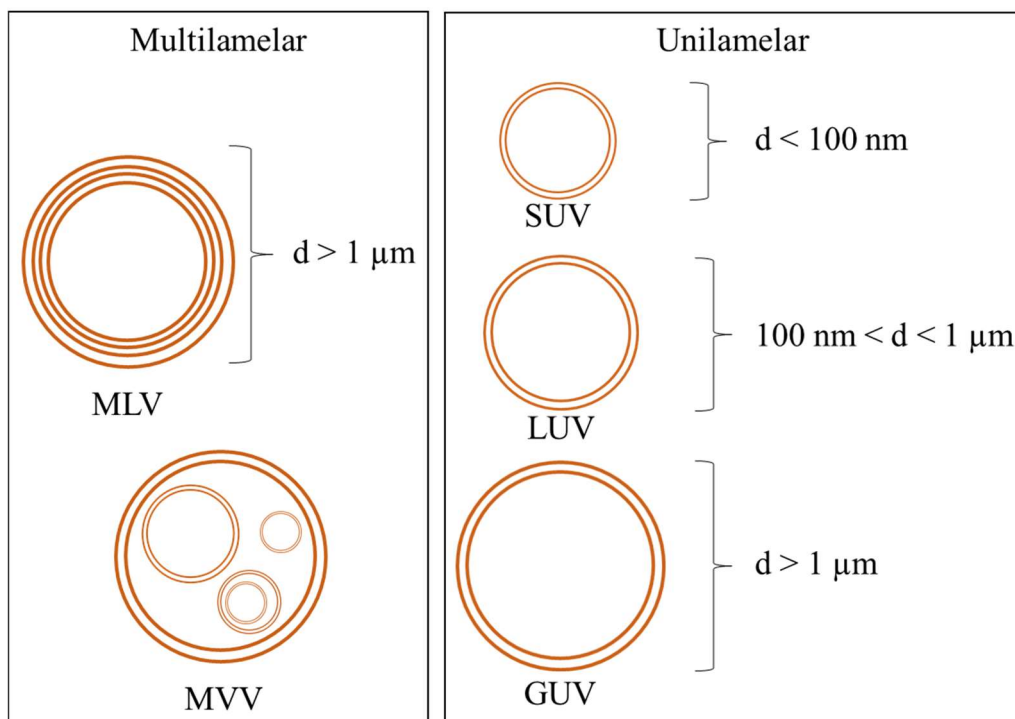


Figura 10: grupos de vesículas conforme número de lamelas e tamanhos.

As MLVs são formadas espontaneamente hidratando um filme lipídico e, ao passar pelo processo de extrusão, pode-se formar as SUVs ou LUVs [62]. Já as GUVs podem ser formadas, dentre as metodologias mais aplicadas, por eletroformação [63], formação por gel [64] e formação por agitação em vórtex [65], que serão detalhadas no Capítulo 3 - Materiais e métodos. As GUVs são mais próximas das membranas de células eucarióticas naturais em termos de estrutura, tamanho e curvatura da membrana [66].

Outro aspecto fundamental no estudo das vesículas é a fluidez das mesmas. Dependendo, principalmente, do lipídio utilizado na formação e da temperatura em que se encontram, as vesículas formadas por apenas um tipo de molécula podem estar em fase fluida ou sólida. A fase fluida, chamada de líquida-desordenada (L_α), consiste nas moléculas dispostas

com maior grau de liberdade entre as cadeias, possibilitando a difusão lateral dos lipídios e diminuindo a espessura da bicamada. Nessa fase, as cadeias de hidrocarbonetos estão em sua maioria em conformação *gauche*. Já a fase rígida, chamada de fase gel (L_β) é caracterizada pelo maior empacotamento das moléculas lipídicas, proporcionando um menor grau de liberdade das cadeias de hidrocarbonetos e limitando a difusão lateral dos lipídios. Nessa fase, as cadeias estão em sua maioria na conformação *all trans*, mais verticalizadas, fazendo com que a espessura da bicamada seja maior em relação à fase L_α . Com relação à conformação das cadeias, o lipídio insaturado utilizado no trabalho (POPC) possui conformação *cis* tanto em fase sólida quanto em fase fluida devido sua restrição rotacional na dupla ligação [67,68]. Dependendo da relação entre a área da cabeça polar e das cadeias de hidrocarbonetos, pode haver inclinação das últimas (fase L_β'), o que acontece para os lipídios da família das fosfatidilcolinas (PCs). A temperatura de transição de fase (T_m) desempenha papel fundamental na fluidez da bicamada. Vesículas que estão abaixo da T_m do lipídio que a compõe estão na fase L_β , enquanto a fase L_α é observada acima da T_m [57,69]. A Figura 11 mostra um esquema das fases dependendo da temperatura, com suas respectivas conformações das cadeias.

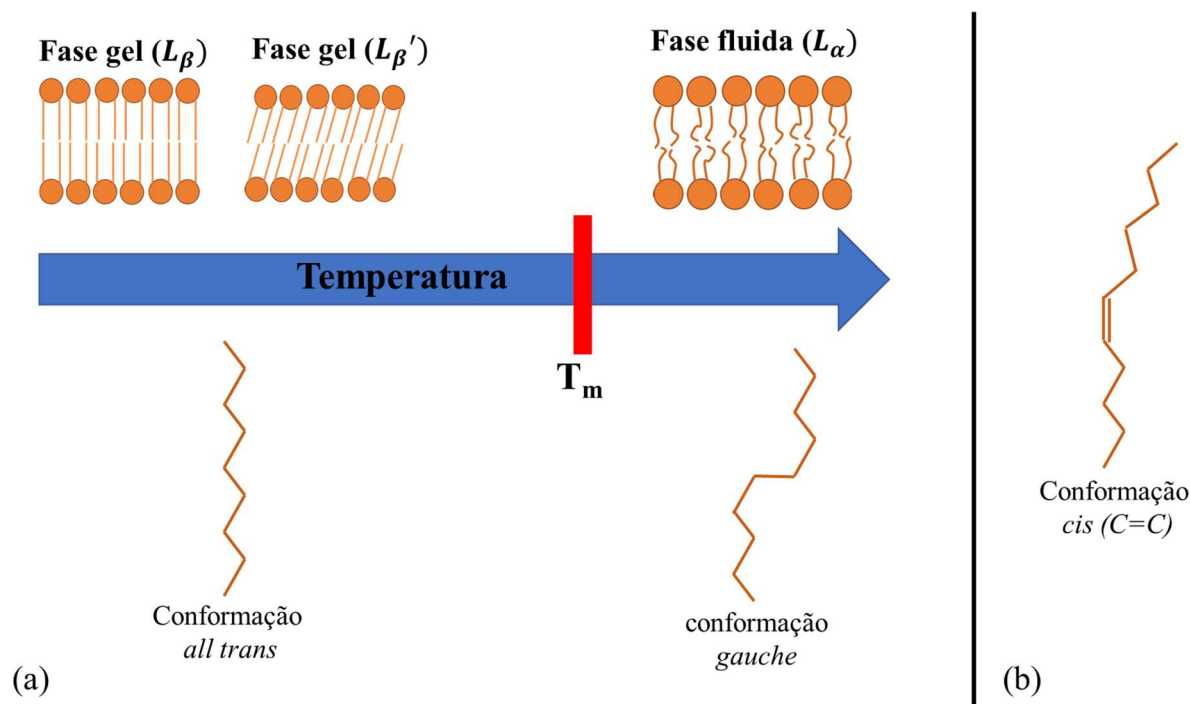


Figura 11: (a) fases encontradas nas vesículas compostas por apenas um tipo de molécula dependendo da temperatura de transição de fase (T_m) e as respectivas conformações das cadeias de hidrocarbonetos. (b) conformação *cis* presente na cadeia de carbonos de lipídios insaturados, como o POPC, independente de sua fase.

2.7 Microscopia por contraste de fase

A microscopia por contraste de fase permite observar a estrutura desejada através da diferença entre os índices de refração dos corpos (vesícula, neste caso) presentes na solução, bem como dos índices de refração do meio interno e externo das vesículas, fazendo com que seu contorno fique visível à lente do microscópio (Figura 12).

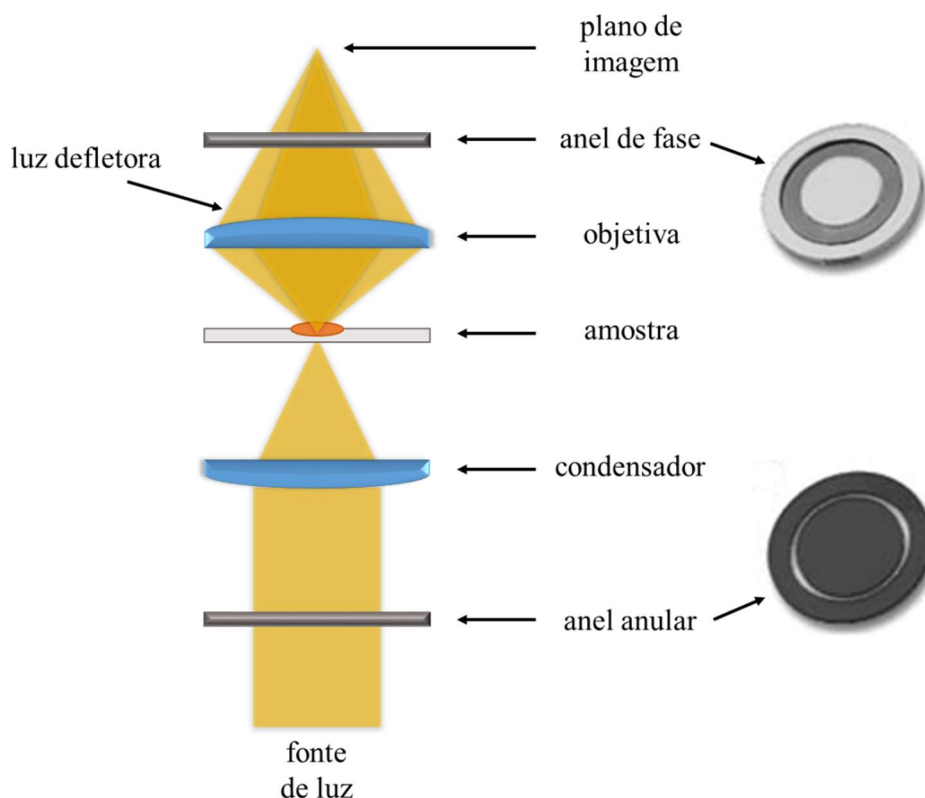


Figura 12: esquema de funcionamento da microscopia por contraste de fase. Adaptado de [70].

No método aplicado, a luz da fonte passa através de um anel anular, que faz com que a luz passe pelo condensador e atinja o plano focal traseiro da objetiva em forma de anel. A luz em forma de cone passa pela amostra e, por diferença de índice de refração, é difratada, espalhando-se pelo foco traseiro da objetiva. A luz direta e a luz difratada passam pela objetiva e pelo anel de fase, que faz com que a luz desviada percorra uma distância menor do que a luz difratada, gerando a imagem desejada (contraste) [70,71].

2.8 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta

Dois técnicas utilizadas para medir o tamanho e a carga superficial de partículas em suspensão, como as LUVs, são o espalhamento de luz dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scattering*) e o potencial zeta, respectivamente. No DLS, um feixe de luz incidido na solução contendo uma suspensão é espalhado devido ao índice de refração das partículas e analisado

pelo detector do equipamento. Uma vez que se têm movimentos aleatórios das partículas presentes na suspensão (chamado de movimento Browniano), a intensidade da luz espalhada sofre variações com o tempo. No método de espectroscopia por correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy* – PCS) tais variações podem ser correlacionadas (multiplicando as intensidades da luz), o que permite o cálculo do coeficiente de difusão das partículas no meio [72]. Este, por sua vez, é utilizado na determinação do diâmetro (ou raio) hidrodinâmico (Equação 9, chamada de equação de Stokes-Einstein, onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do meio, R_H é o raio hidrodinâmico e D é o coeficiente de difusão), que são dados em uma distribuição de intensidade ou volume desses valores [73,74].

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{Equação 9}$$

No potencial zeta é analisada a carga de uma camada externa de íons que rondam a partícula. Nesse caso, contra-íons são atraídos para a partícula carregada, formando a chamada “camada de Stern”. A camada de Stern é densa e impede que outros contra-íons se aproximem da partícula, fazendo com que outra camada, menos densa, se forme, chamada de camada difusa. A densidade de contra-íons diminui conforme aumenta a distância referente à partícula, até que haja o equilíbrio de cargas dos íons de carga contrária e de mesma carga da partícula [75]. O potencial zeta é medido entre a camada de Stern e a camada difusa, sugerindo assim a carga superficial da partícula [76]. Dessa forma, quanto menor o equilíbrio entre contra-íons e íons de carga igual à partícula estiver presente nessa região, mais positiva ou negativa será a partícula, enquanto um maior equilíbrio entre os íons aponta para uma carga superficial mais neutra.

Capítulo 3

Justificativa e Objetivos

3.1 Justificativa

Dentre os lipídios encontrados nas células dos mamíferos estão os fosfolipídios (moléculas anfífilas formadas por cadeias de hidrocarbonetos apolar -hidrofóbica- terminadas em uma cabeça polar - hidrofílica [77]) da família das fosfatidilcolinas (ou PC, do inglês *phosphatidylcholine*), que é o grupo encontrado em maior porcentagem (cerca de 50 % em massa dentre os fosfolipídios) [78–80]. A fim de mimetizar as estruturas lipídicas que conferem a integridade da membrana celular, esse grupo de fosfolipídios pode ser utilizado para formar monocamadas lipídicas através de técnicas como Filmes de Langmuir, descritos pela primeira vez por Langmuir em um trabalho dividido em duas publicações nos anos de 1916 e 1917 [30,31]. Também há possibilidade de estruturar as moléculas lipídicas em bicamadas, como os lipossomas, descritas pela primeira vez em 1965 por Bangham et al. [81]. Estes possuem tamanhos que variam da ordem dos nanômetros aos micrômetros [82], como, por exemplo, as vesículas unilamelares grandes (LUVs, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*) e as vesículas unilamelares gigantes (GUVs, do inglês *Giant Unilamellar Vesicles*), respectivamente.

As duas vertentes estruturam as moléculas lipídicas das seguintes maneiras: os filmes de Langmuir as dispõem em forma de monocamadas lipídicas na interface ar/água; as GUVs e LUVs as dispõem em bicamadas lipídicas formando vesículas de diâmetro maiores que 1 micrometro e entre 100 nm e 1 micrometro, respectivamente [83]. Sendo assim, utilizar as duas técnicas em conjunto possibilita um estudo complementar que indica o que pode ocorrer nas estruturas biológicas.

Os lipídios DODAB, DHP, DPPA e DPTAP foram escolhidos porque apresentam, separadamente, grupos químicos que compõem a cabeça polar das fosfatidilcolinas e a cauda

saturada. A escolha dos lipídios permite compreender quais dos grupos químicos mais contribuem para a interação em nível molecular com o acefato, como detalhado na seção 3.1 (Figura 10). O DPPC foi escolhido por apresentar o perfil de isoterma π -A, bem como as fases e morfologia das monocamadas, bem estabelecidos. Já o POPC foi escolhido devido à fluidez em temperatura ambiente, dada a sua transição de fase rígida/fluida em $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que possibilita uma maior aproximação em questão de estrutura e fluidez das membranas plasmáticas. Uma vez que as membranas celulares dos mamíferos possuem em sua composição lipídios majoritariamente aniônicos e zwitteriônicos, o estudo dos mecanismos de interação entre o acefato e os lipídios catiônicos (DODAB e DPTAP) e aniônicos (DHP e DPPA) podem elucidar qual região dos lipídios zwitteriônicos (DPPC e POPC) são afetadas quando utilizados na mimetização da membrana celular.

3.2 Objetivos

Este trabalho de mestrado teve como objetivo principal estudar os efeitos do pesticida acefato em sistemas miméticos da estrutura lipídica da membrana plasmática. Tais efeitos podem ser entendidos como interações químicas em nível molecular com monocamadas lipídicas (filmes de Langmuir) e/ou alterações morfológicas tanto em mono como em bicamadas (GUVs e LUVs) lipídicas.

Objetivos específicos:

i) Monocamadas lipídicas:

a) Estudo dos efeitos do acefato em filmes de Langmuir dos lipídios DPPC, DODAB, DHP, DPPA, DPTAP e POPC através de isotermas π -A;

b) Estudos das interações em nível molecular entre o acefato e as monocamadas lipídicas através da técnica de PM-IRRAS (do inglês *polarization modulation – infrared reflection-adsorption spectroscopy*).

c) Análise da morfologia das monocamadas lipídicas através da microscopia por ângulo de Brewster (BAM).

ii) Bicamadas lipídicas:

a) GUVs: verificar a morfologia de GUVs de DPPC, DODAB, DPTAP e POPC através de microscopia por contraste de fase na ausência e na presença do acefato a fim de detectar possíveis alterações morfológicas em suas estruturas, bem como o surgimento de abertura de poros refletida através da perda do contraste de fase.

b) LUVs: verificar mudanças no tamanho e carga superficial de LUVs lipídicas na presença de acefato através das técnicas de DLS e potencial zeta, respectivamente.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Capítulo 4 - Materiais e métodos

4.1 Acefato e lipídios

O acefato foi adquirido da Sigma-Aldrich, sendo que suas características físico-químicas relevantes para as análises propostas são: solubilidade máxima em água de $4,46 \times 10^{-3}$ mol/L; temperatura de fusão entre 72 e 90 °C; e massa molar igual a 183,17 g/mol [84]. Os lipídios DPPC (L- α -1,2-dipalmitoil-sn-3-glicero-fosfatidilcolina; 734,04 g/mol) (Figura 13-a), DHP (dihexadecil fosfato; 546,85 g/mol) (Figura 13-c), DPTAP (1,2 dipalmitoil-3-trimetilamônio propano; 646,47 g/mol) (Figura 13-d); DPPA (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato; 648,89 g/mol) (Figura 13-e) e POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina; 760,08 g/mol) (Figura 13-f) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, e o DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio; 630,95 g/mol) (Figura 13-b) foi adquirido da Fluka. Tais lipídios possuem temperatura de transição de fase (T_m) de gel para líquido-cristalina iguais a: 41° C para o DPPC [85]; 65° C para o DHP [86]; 66° C para o DPPA [87]; 52,8° C para o DPTAP [88]; 45° C para o DODAB [89] e -3° C para o POPC [90].

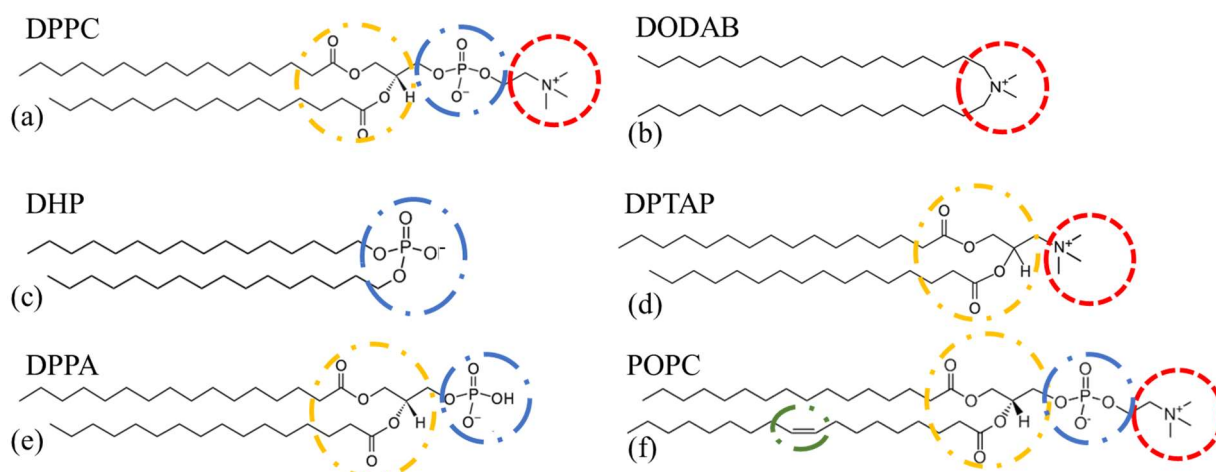


Figura 13: estruturas moleculares dos lipídios (a) DPPC (L- α -1,2-dipalmitoil-sn-3-glicero-fosfatidilcolina); (b) DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio); (c) DHP (dihexadecil fosfato); (d) DPTAP (1,2 dipalmitoil-3- trimetilamônio propano); (e) DPPA (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato); (f) POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina). **Vermelho:** grupo colina/amônia quaternária (DODAB); **amarelo:** grupo glicerol; **azul:** grupo fosfato; **verde:** insaturação.

4.2 Obtenção dos filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir foram formados espalhando-se soluções dos lipídios (0,5 mg/mL em mistura de clorofórmio:metanol, 7:3, v:v) em subfase de água ultrapura ou solução de acefato diluído em água ultrapura nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L numa cuba de Langmuir da marca KSV com capacidade de 30 mL (modelo minimicro) ou 1100 mL (modelo 2000). As moléculas na interface água/ar foram comprimidas por barreiras simétricas a uma velocidade de 10 mm/min, à temperatura constante de 23 ± 1 °C a fim de obter as isotermas π -A (todas em triplicata).

4.3 Espectros PM-IRRAS

Os espectros PM-IRRAS foram obtidos utilizando um espectrofotômetro modelo PMI 550 (KSV Instruments) sob supervisão do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., no IFSC –

USP de São Carlos. As soluções dos lipídios DPPC, DODAB e DPTAP (0,5 mg/mL) foram espalhadas em uma cuba de Langmuir, sendo as barreiras comprimidas até que se atingisse a pressão superficial de 30 mN/m (pressão lateral da membrana celular [91]). Dessa forma, os espectros foram registrados no intervalo de 800 até 4200 cm^{-1} , com um ângulo rasante de 80°, em temperatura igual a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Antes de coletar os espectros com os lipídios espalhados, foram obtidos *backgrounds* das subfases (água ultrapura e solução de acefato) sem que as barreiras fossem comprimidas (0 mN/m). Uma vez que não houve diferenças significativas entre as curvas deslocadas referentes às isotermas π -A das duas concentrações do acefato na subfase, os espectros PM-IRRAS foram então obtidos em água ultrapura e em solução aquosa de acefato 10^{-4} mol/L.

4.4 Cálculos teóricos e modelagem molecular

Os cálculos das estruturas eletrônicas foram realizados para o acefato e os lipídios DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC a fim de avaliar as reatividades locais, os potenciais eletrônicos e as energias de adsorção. Tais cálculos foram realizados por DFT usando as funções de relação de troca B3LYP [92–95] (para sistemas isolados) e CAM-B3LYP [96] (para sistemas adsorvidos), com conjunto de base 6-31G(d,p). A presença da água foi simulada por PCM (*polarizable continuum method*) [97]. Para os cálculos e otimização de geometria foi utilizado o Gaussian 16 [55] e para os cálculos de energia de adsorção, foi utilizado o Orca 4.0 [98].

As reatividades locais foram avaliadas por CAFE e MEP. O CAFE foi estipulado por aproximação de diferença finita levando em conta os átomos neutros, aniônicos e catiônicos das moléculas [99,100]. O mapeamento MEP foi estimado por conformação de carga de átomos por esquema CHelp [101]. O método de partição de carga Hirshfeld's foi utilizado para evitar índices negativos nas partições eletrônicas [102,103].

Os sistemas de adsorção acefato+lipídios foram avaliados por meio de aproximação DFT/CAM-B3LYP/6-31(d,p) para avaliar as energias de ligação e mudanças em CAFI e MEP. Os sítios negativos e positivos do acefato e dos lipídios DODAB, DPTAP e DPPC foram alinhados nos desenhos das moléculas. As energias de ligação foram estimadas considerando as energias totais dos sistemas adsorvidos e isolados, antes e depois da adsorção, eliminando o erro de superposição de conjunto de base (*BSSE – basis set superposition error*) através do método de contrapeso [104], levando em conta as seguintes equações:

$$E_{ADS} = E_{A+L}^{A+L}(A + L) - [E_A^A(A) + E_L^L(L)] - \Delta E_{BSSE} \quad \text{Equação 10}$$

$$\Delta E_{BSSE} = \left(E_{A+L}^{A+L}(A + L) - E_{A+L}^{A+L}(A) \right) + \left(E_{A+L}^{A+L}(A + L) - E_{A+L}^{A+L}(L) \right) \quad \text{Equação 11}$$

onde $E_X^Y(Z)$ representa a energia total do fragmento X, calculado pela geometria otimizada do fragmento Y e levando em conta o conjunto de base do fragmento Z. A letra A representa o acefato, enquanto a letra L representa o lipídio (A+L é o sistema adsorvido acefato+lipídio). Tais equações eliminam a estabilização artificial dos sistemas acefato+lipídio pelo uso de conjunto de base adicional dos lipídios para descrever a configuração eletrônica do acefato, e vice e versa.

Estes cálculos foram realizados pelo aluno de doutorado Orisson P. Gomes (UNESP, campus Bauru) supervisionado pelo professor Dr. Augusto Batagin-Neto (UNESP, campus Itapeva) a fim de complementar os estudos realizados para este trabalho.

4.5 Obtenção de imagens por BAM

As medidas de BAM foram realizadas utilizando um equipamento de microscopia por ângulo de Brewster Accurion Nanofilm EP4 (Goettingen, Alemanha) acoplado à uma cuba de Langmuir (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlândia), ambos situados no IFSC – São Carlos

sob supervisão do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. Soluções de 0,5 mg/mL de DPPC, DODAB ou DPTAP (a escolha desses lipídios é descrita nos resultados) foram espalhadas na cuba, seguindo o mesmo procedimento descrito na seção 3.2. Após a evaporação do solvente, um laser (658 nm) é incidido na interface ar/água com um ângulo incidente igual a $53,1^\circ$ (ângulo de Brewster), e uma câmera CCD (*charged-coupled-device*) é utilizada para capturar as imagens em diferentes pressões de superfície. É importante frisar que tanto as posições do laser como da câmera são fixas, sendo possível observar a morfologia do filme apenas em uma região da cuba.

4.6 Formação e obtenção de imagens de GUVs de DPPC, DODAB, DPTAP e POPC

As GUVs de DPPC foram formadas pela técnica de eletroformação, descrita pela primeira vez por Angelova e Dimitrov [105], que consiste em, através da aplicação de um campo elétrico em um filme hidratado, formar vesículas esféricas utilizando a molécula desejada. Para isso, é necessário espalhar uma solução da molécula desejada utilizando solvente volátil em duas superfícies condutoras (geralmente ITO ou fio de platina) dispostas lado a lado e confinadas por uma estrutura de teflon. Após a evaporação do solvente, o filme remanescente é hidratado com solução aquosa e a superfície condutora é submetida à uma tensão alternada de 1 V a uma frequência de 10 Hz por aproximadamente 1 hora, fazendo com que as moléculas presentes no filme recém hidratado formem as vesículas unilamelares gigantes (Figura 14).

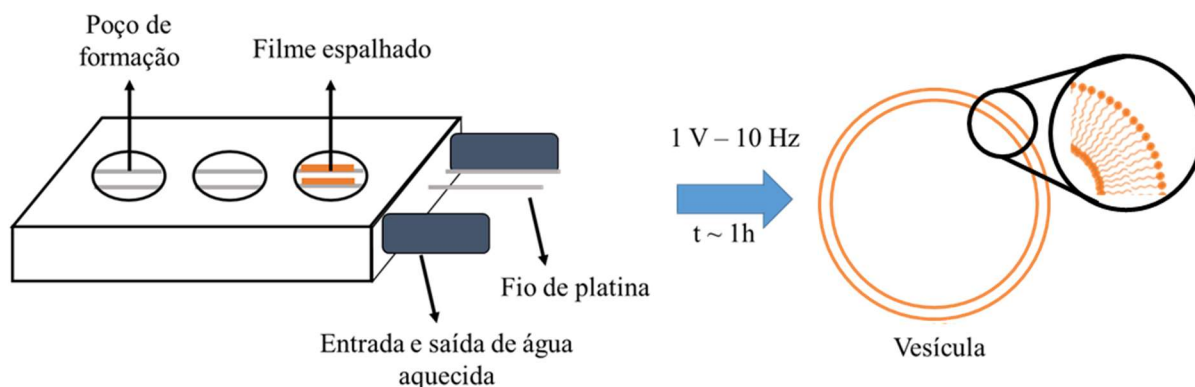


Figura 14: esquema de eletroformação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Adaptado de [39].

Foram espalhados 4 μL de solução de DPPC diluída em clorofórmio (10^{-3} mol/L) em cada parte do fio de platina. O sistema foi submetido a 1 hora em secagem a vácuo e, posteriormente, os poços foram hidratados com 500 μL de solução de sacarose diluída em água ultrapura (0,2 mol/L), previamente aquecida a 60°C . Uma fonte de corrente alternada foi utilizada para aplicar uma voltagem de 1 V e uma frequência de 10 Hz nos fios de platina, e um sistema de aquecimento (Lauda, modelo Alpha A-6) foi utilizado para atingir a temperatura de 60°C durante a formação das vesículas (acima da T_m do lipídio [85]).

GUVs de DODAB e DPTAP foram formadas utilizando o procedimento experimental descrito por Martins et al. [65]. Inicialmente, soluções de DODAB ou DPTAP (10 mM) diluídos em uma mistura de metanol:clorofórmio (1:3 – v:v) são dispostas em tubos de ensaio e submetidas à secagem por gás nitrogênio, sendo posteriormente deixadas em vácuo por cerca de 1 hora a fim de retirar qualquer traço do solvente. Após a secagem, 5 mL de solução de sacarose (0,2 M) previamente aquecida à 80°C (temperatura acima das temperaturas de transição de fase dos lipídios DODAB e DPTAP, descritas na seção 3.1) foram adicionados aos tubos. Estes, já hidratados, foram deixados em banho aquecido (aquecedor marca Lauda) por vinte minutos, sendo levados à agitação por vórtex a cada cinco minutos.

Por fim, as GUVs de POPC foram formadas utilizando a técnica de formação por gel, descrita por Weinberg et al. [64]. Primeiramente, uma solução de PVA (álcool polivinílico, Sigma-Aldrich, MM: 146.000 – 186.000 g/mol) com concentração igual a 10^{-4} mol/L foi adicionada em um béquer de 5 mL, que foi levado a uma estufa à 50 °C até que o solvente evaporasse, restando apenas o filme do soluto. Após essa etapa, 10 μ L de solução de POPC (10^{-3} mol/L) foi espalhado sobre o filme de PVA no béquer, que foi levado para uma estufa à vácuo e deixado por aproximadamente 1 hora até que o solvente fosse totalmente evaporado. Por fim, o filme lipídico foi hidratado com 1 mL de solução de glicose (0,2 mol/L) por aproximadamente 1,5 hora, até que as vesículas se formassem. A Figura 15 mostra um esquema de como foi realizada tal formação.

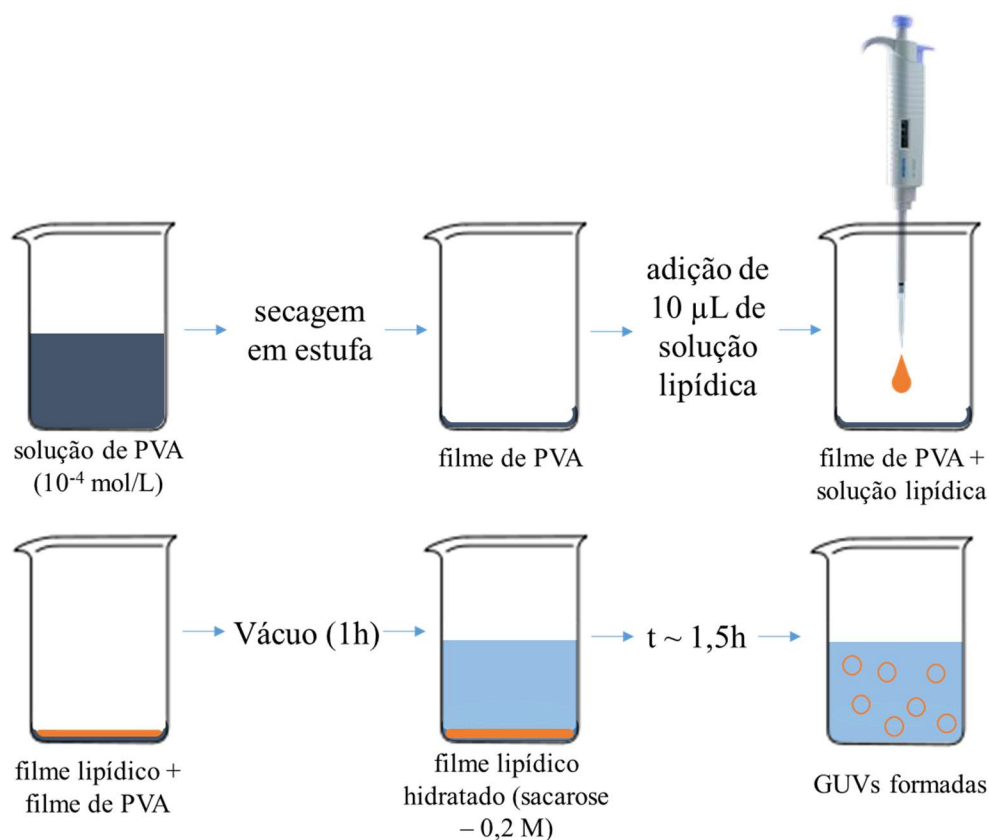


Figura 15: esquema ilustrativo de formação por gel das GUVs de POPC.

Após formação das GUVs, 50 μL das soluções contendo as vesículas de cada lipídio (DPPC, POPC, DODAB ou DPTAP) foram adicionados a 250 μL de solução de glicose diluída em água ultrapura (0,2 mol/L) em uma célula para observação em microscópio (marca Ibidi). Além disso, as mesmas quantidades das suspensões de vesículas foram adicionadas a 250 μL de uma solução de acefato (10^{-4} mol/L) diluída em solução de glicose (0,2 mol/L), resultando em uma concentração final igual a $0,8 \times 10^{-4}$ mol/L para o pesticida na célula para observação.

Para a obtenção das imagens foi utilizado um microscópio óptico da marca Nikon, modelo C2/C2si equipado com uma lente objetiva de 40x que foi utilizada na obtenção dos vídeos e das imagens das GUVs de DPPC.

Para cada eletroformação, uma GUV era escolhida para ser acompanhada durante uma filmagem de 30 minutos e, em intervalos de 15 minutos (0, 15 e 30 minutos), uma imagem da vesícula escolhida foi editada utilizando o programa ImageJ a fim de comparar sua morfologia nos três intervalos de tempo. Após o vídeo, cinco imagens foram obtidas em regiões diversas do poço de observação para a contagem das GUVs, sendo as mesmas classificadas pela perda do contraste de fase e presença ou não de protrusões. Tanto o vídeo quanto as imagens possuíam tamanho 1636 X 1088 mm com uma resolução espacial de 0,22 $\mu\text{m}/\text{pixel}$.

4.7 Formação e caracterização de LUVs

As LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC foram formadas pela técnica de extrusão. Inicialmente, os filmes lipídicos foram formados em tubos de ensaio, secando as soluções voláteis com fluxo de nitrogênio seguidos de secagem à vácuo por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, os filmes foram hidratados com água ultrapura (18,2 M Ω .cm) previamente aquecida acima das temperaturas de transição de fase dos lipídios (descritas na seção 3.1) a fim de atingir a concentração de 2 mM e levados ao vórtex por, no mínimo, 2 minutos. Após essa etapa, 1 mL de cada solução já contendo a suspensão de vesículas (formadas durante a agitação

por vórtex) foi submetido à extrusão em duas etapas para se obter as LUVs: na primeira etapa as suspensões foram extrusadas 8 vezes em uma membrana de policarbonato (Whatman, Sigma-Aldrich) com poros de 400 nm; na segunda etapa foram extrusadas 15 vezes em membranas com poros de 100 nm. Nas duas etapas o sistema foi mantido aquecido acima da temperatura de transição de fase dos lipídios.

Após a formação das LUVs, alíquotas a partir de cada suspensão lipídica, resultando na concentração final de 100 μM , foram adicionadas (diluídas) em solução de água ultrapura ou de acefato nas concentrações de 0,1, 10, 25, 50, 75 e 100 μM . As amostras foram caracterizadas por DLS e potencial zeta no equipamento Zetasizer Nano ZS90.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Capítulo 5 - Resultados e discussão

5.1 Isotermas π -A

Inicialmente, foram formados filmes de Langmuir de DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC em subfase contendo água ultrapura ou solução aquosa de acefato (nas concentrações 10^{-4} ou 10^{-3} mol/L). A Figura 16 mostra as isotermas π -A de DODAB (lipídio que possui em sua cabeça uma amônia quaternária) na ausência e na presença de acefato. A Figura 16 também apresenta a curva obtida pela compressão das barreiras somente da subfase aquosa com acefato, ou seja, na ausência de monocamadas lipídicas.

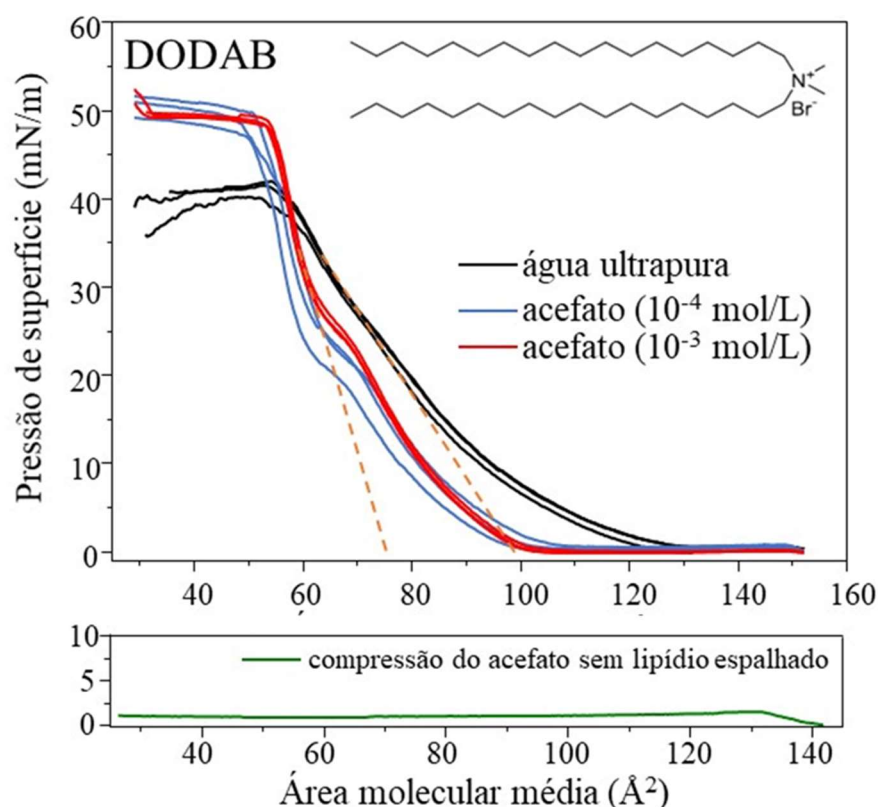


Figura 16: isotermas π -A de DODAB na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. Atividade superficial da subfase com acefato 10^{-3} mol/L (inset abaixo). A estrutura do DODAB é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

As isotermas π -A de DODAB (Figura 16) em subfase de água ultrapura possuem o perfil típico encontrado na literatura para esse lipídio [106,107]. O inset abaixo da isoterma π -A de DODAB mostra o gráfico da compressão da subfase contendo o acefato sem lipídio espalhado. Uma vez que não há alterações na pressão de superfície com a compressão das barreiras, sugere-se que o acefato não tenha atividade superficial. A fim de examinar os efeitos do pesticida nas monocamadas, a área extrapolada (A_E) foi determinada traçando uma linha tangente desde a região com pressão superficial referente ao maior empacotamento da monocamada até a pressão nula. O valor médio da A_E (tracejado laranja) é igual a $99 \pm 1 \text{ Å}^2$, e da pressão de colapso da monocamada é em torno de $41 \pm 1 \text{ mN/m}$ para a monocamada em água ultrapura. Na presença do acefato na subfase aquosa, a isoterma π -A do DODAB é deslocada para menores áreas

moleculares (72 ± 3 e $77 \pm 1 \text{ \AA}^2$ para as concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L de acefato, respectivamente). Além disso, há uma mudança no perfil da isoterma π -A do DODAB caracterizada por uma leve transição de fase na pressão superficial de aproximadamente 20 mN/m, bem como o aumento da pressão de colapso para 49 ± 2 e cerca de 49 mN/m na presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L , respectivamente. Tal aumento sugere, portanto, uma maior estabilidade da monocamada na presença do pesticida [108]. A diminuição da área mínima ocupada por molécula na monocamada formada na subfase aquosa contendo o acefato pode ser atribuída ao fato de que as moléculas do pesticida são atraídas pela cabeça polar do DODAB carregada positivamente, diminuindo a repulsão entre as moléculas do lipídio e, portanto, permitindo um maior empacotamento da monocamada [109].

A Figura 17 mostra as isotermas π -A de DPTAP (com os grupos glicerol seguido de colina em sua cabeça) na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L .

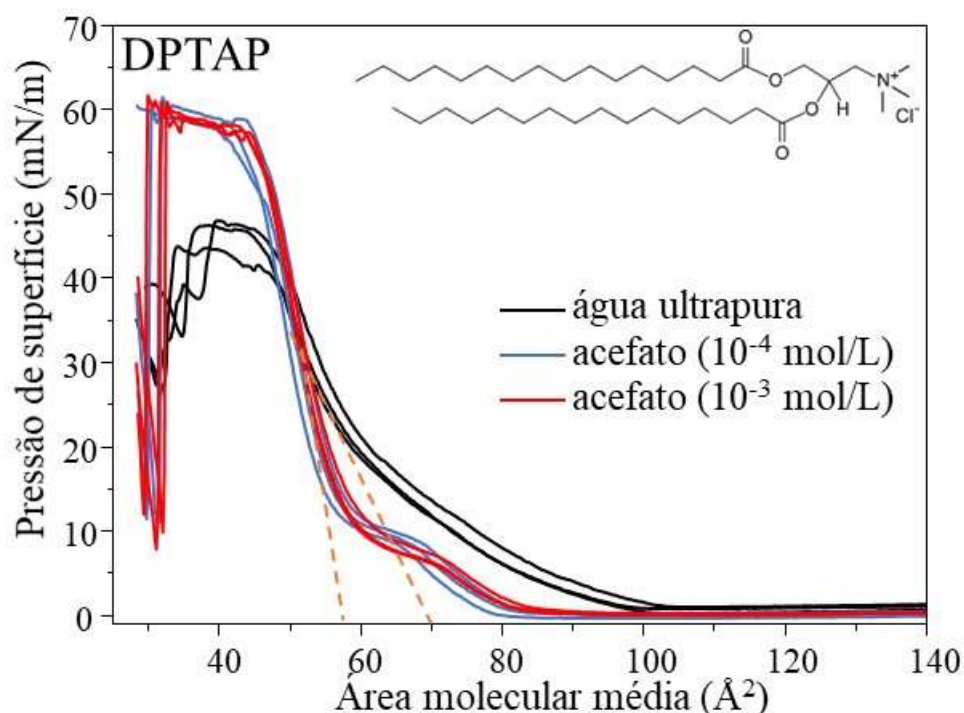


Figura 17: isothermas π -A de DPTAP na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DPTAP é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

Em água ultrapura, os perfis das isothermas π -A são condizentes com a literatura, revelando A_E (tracejado laranja) médio igual a $70 \pm 1 \text{ Å}^2$ e pressão de colapso médio igual a $45 \pm 2 \text{ mN/m}$ [110]. Na presença do acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L, as isothermas π -A do DPTAP deslocam-se, respectivamente, para 58 ± 2 e aproximadamente 60 Å^2 em relação a A_E , além de um aumento da pressão de colapso para cerca de 58 mN/m em ambas concentrações. Tais mudanças sugerem, assim como no caso do DODAB, uma afinidade do acefato pela cabeça positiva do DPTAP, diminuindo a repulsão entre os lipídios e aumentando a estabilidade da monocamada (aumento da pressão de colapso) para ambas concentrações do analito. Além disso, a semelhança entre as mudanças das monocamadas sofridas pela presença do acefato entre o DODAB (Figura 16) e o DPTAP (Figura 17) revelam que o grupo glicérol não possui interação significativa com o pesticida.

Comparando a Figura 16 (DODAB) e a Figura 17 (DPTAP), nota-se que, na pressão de 30 mN/m (referente à pressão lateral da membrana [91,111]), há um maior deslocamento no primeiro (de aproximadamente $66 \text{ \AA}^2$ em água ultrapura para 59 ± 2 e $61,3 \pm 0,6 \text{ \AA}^2$ na presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L , respectivamente). Para o DPTAP, os valores são de $53 \pm 1 \text{ \AA}^2$ em água ultrapura e 51 ± 2 e $52 \pm 1 \text{ \AA}^2$ na presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L , respectivamente. Essa diferença provavelmente ocorre devido à forte interação repulsiva entre as moléculas de DODAB, que possui apenas um grupo positivo em sua cabeça. Para o DPTAP, o grupo glicerol pode aumentar as forças coesivas, diminuindo a repulsão eletrostática entre as moléculas do lipídio. Essa repulsão também é refletida pela maior área molecular na qual a pressão de superfície começa a aumentar em subfase de água ultrapura (aproximadamente $130,0 \text{ \AA}^2$ para o DODAB e $101 \pm 2 \text{ \AA}^2$ para o DPTAP), o que sugere que o acefato promove uma maior diminuição da repulsão entre as moléculas de DODAB em comparação com o DPTAP.

A Figura 18 mostra as isotermas π -A de DHP (possui o grupo fosfato na cabeça) na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L .

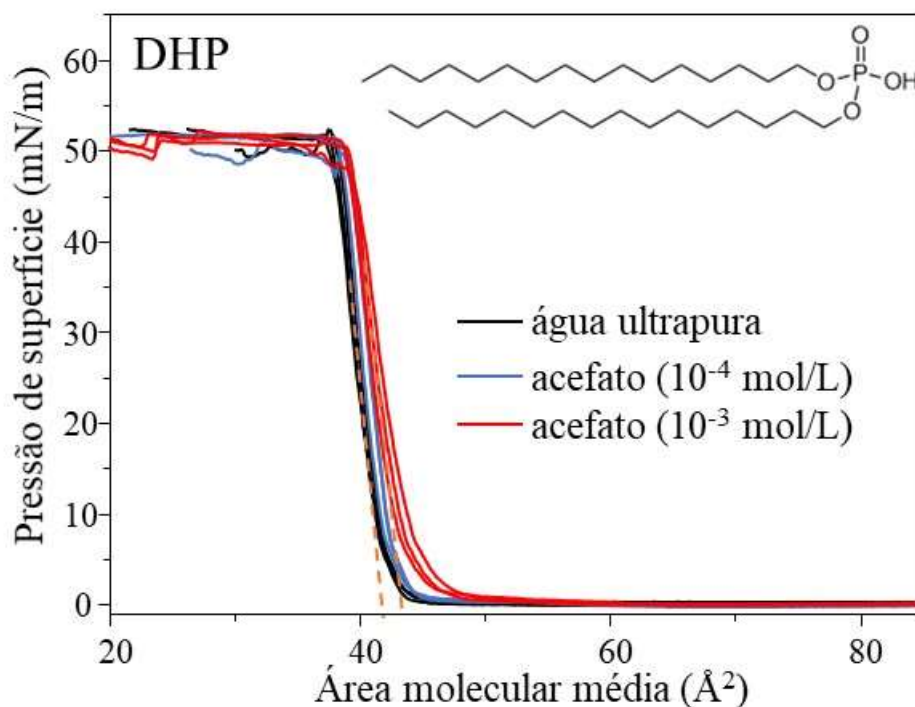


Figura 18: isotermas π -A de DHP na ausência e presença de acefato na subfase nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DHP é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

As isotermas π -A de DHP obtidas em subfase aquosa revelam um perfil semelhante aos encontrados literatura, com A_E (tracejado laranja) médio igual a aproximadamente $41 \text{ \AA}^2$ e pressão de colapso médio igual a cerca de 51 mN/m [112,113]. Na presença de acefato (10^{-4} e 10^{-3} mol/L) há deslocamentos para 43 ± 1 e $44 \pm 1 \text{ \AA}^2$, respectivamente, porém tal mudança não se mostra significativa, além do perfil da isoterma π -A ser mantido para todas as subfases (com ou sem o acefato).

A Figura 19 mostra as triplicatas das isotermas π -A de DPPA na presença e ausência de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L.

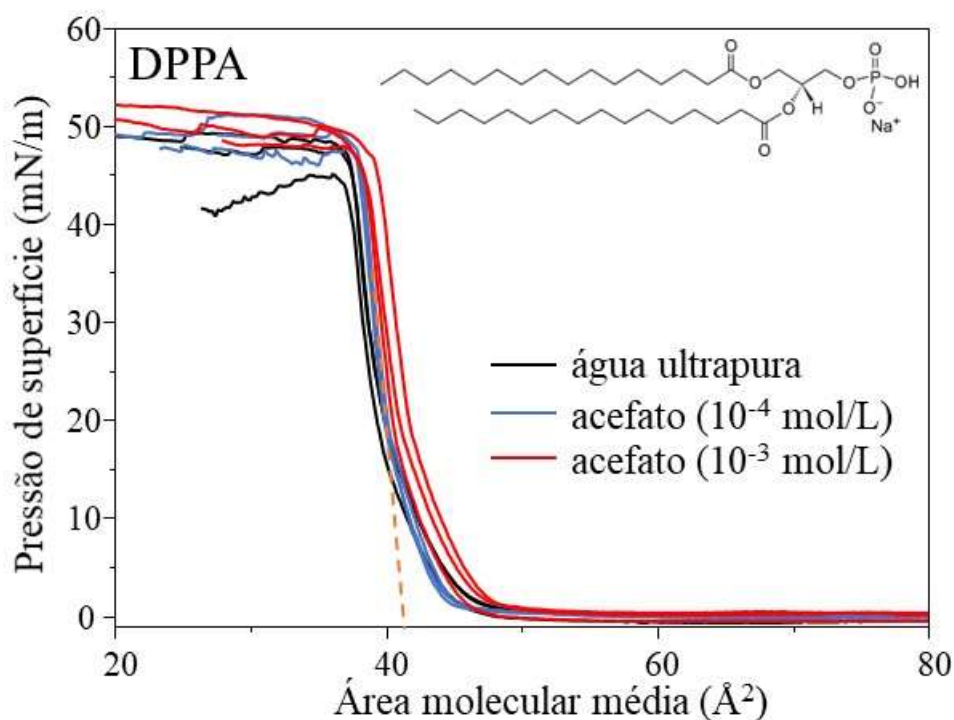


Figura 19: isothermas π -A de DPPA na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DPPA é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

As triplicatas das isothermas π -A de DPPA na Figura 19 mostram perfil condizente com o encontrado na literatura, com área extrapolada (tracejado laranja) média de cerca de $47 \pm 2 \text{ Å}^2$ [114]. Assim como o DHP, as isothermas π -A de DPPA não sofrem alterações significativas quando estão na presença de acefato em ambas as concentrações, reforçando que o acefato possui pouca ou nenhuma afinidade pela cabeça de fosfato (negativa) das moléculas do DPPA.

Por fim, a Figura 20 mostra as isothermas π -A de DPPC (lipídio zwitteriônico) na ausência e presença de acefato na subfase (10^{-3} e 10^{-4} mol/L).

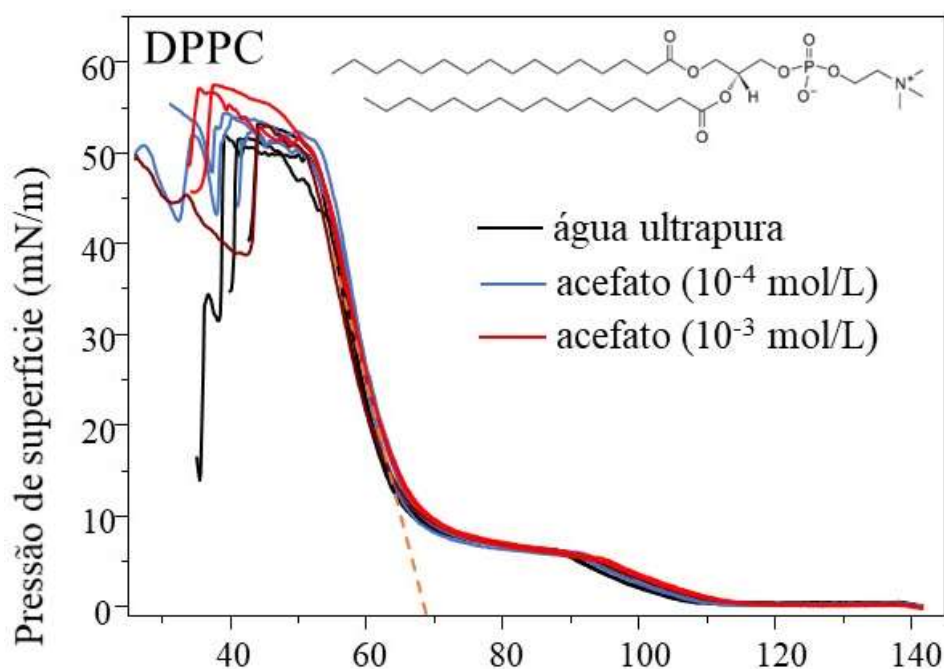


Figura 20: isothermas π -A de DPPC na ausência e presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L. A estrutura do DPPC é mostrada na figura. Tracejado laranja: área extrapolada.

A isoterma π -A de DPPC (Figura 20) possui o mesmo perfil encontrado em outros trabalhos na literatura [47,115], independente da presença do acefato na subfase em diferentes concentrações. A A_E (tracejado laranja) média é similar para todas as medidas (aproximadamente $65 \text{ \AA}^2$ em água ultrapura e 66 ± 2 e $65 \pm 2 \text{ \AA}^2$ na presença de acefato nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} mol/L, respectivamente) indicando que não há efeito significativo na área da monocamada na presença de acefato. Os valores de pressão de colapso também se mantêm similares para as isothermas π -A do lipídio na presença e na ausência do pesticida, sendo os valores em torno de 52 mN/m . A ausência de mudanças nas monocamadas de DPPC podem sugerir que as moléculas do pesticida se encontram sob a monocamada, aproximando-se do grupo positivo (colina). A razão pela qual a redução da repulsão eletrostática entre os grupos da cabeça do DPPC não ocorre pela presença do acefato pode estar relacionada ao volume ocupado pelo grupo glicerol e/ou pela repulsão entre os grupos fosfato, localizados logo acima

dos grupos colina. A última hipótese é mais provável, uma vez que, para o DPTAP, que também possui o grupo glicerol, houve mudanças nas isothermas π -A.

Em resumo, observando as isothermas π -A desses cinco lipídios, nota-se que o acefato altera apenas as monocamadas de DODAB e DPTAP, que possuem cabeças positivas, enquanto que para o DHP e DPPA (cabeças negativas) e para o DPPC (cabeça zwitteriônica) não houve mudanças significativas. Para se ter uma resposta mais precisa dos resultados, foi utilizada a projeção IDMAP das isothermas π -A dos lipídios. A Figura 21 mostra tal projeção, indicando a triplicata referente de cada *cluster* na imagem. Destaca-se que não houve diferenças significativas entre as projeções IDMAP e Sammon's Mapping, portanto apenas a primeira é discutida.

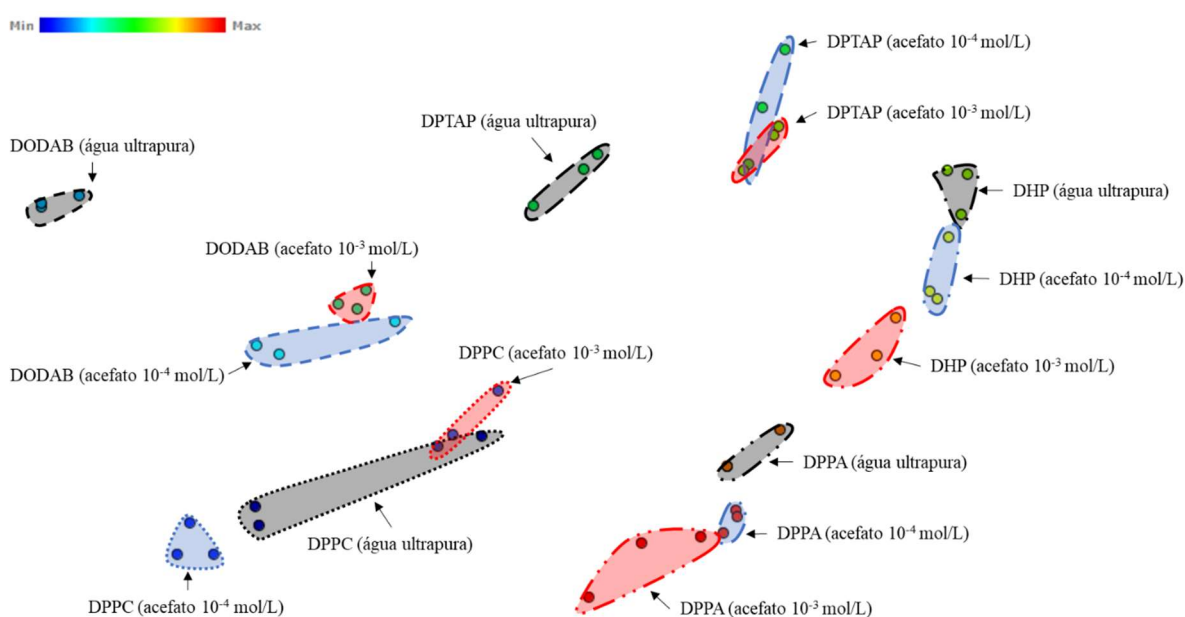


Figura 21: projeção IDMAP das triplicatas das isothermas π -A dos lipídios DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC na ausência e presença de acefato (10^{-4} e 10^{-3} mol/L). Cada conjunto (*cluster*) remete a uma triplicata de resultados.

Na Figura 21, nota-se que o conjunto de pontos das isothermas π -A de DPPC em água ultrapura se aproxima mais do conjunto dos pontos da monocamada na presença de acefato na

concentração de 10^{-3} mol/L e se distancia do conjunto referente à presença do pesticida em menor concentração. Semelhante ao DPPC, os conjuntos de pontos de DHP e DPPA em água ultrapura também se encontram levemente afastados dos pontos referentes à monocamada na presença de acefato em ambas concentrações. Esses afastamentos, por mais leves que sejam, são consequência da diferença entre as isotermas π -A principalmente na pressão de colapso. Uma vez que o software somente realiza os cálculos se o mesmo número de áreas moleculares referentes à compressão da barreira for informado, a diferença após o colapso também influencia na distância entre os pontos. Já para o DODAB e DPTAP, o afastamento entre os conjuntos das monocamadas em água ultrapura e os conjuntos referentes à presença de acefato em ambas concentrações são mais proeminentes, concordando com o observado através de isotermas π -A. Além disso, para esses lipídios não há afastamento dos conjuntos das duas concentrações de acefato entre si, revelando que não há diferença significativa entre as interações observadas para o pesticida mais concentrado (10^{-3} mol/L) e menos concentrado (10^{-4} mol/L). Uma vez que não houve diferenças entre os efeitos do pesticida nas duas concentrações, os experimentos a seguir foram realizados apenas para a menor concentração (10^{-4} mol/L).

A fim de se estudar os efeitos do acefato na elasticidade das monocamadas, foram plotados os gráficos de módulo de compressibilidade das isotermas π -A discutidas anteriormente em função do valor médio da pressão de superfície referentes às monocamadas de DODAB (Figura 22-a), DPTAP (Figura 22-b), DHP (Figura 22-c), DPPA (Figura 22-d) e DPPC (Figura 22-e) na ausência e presença de acefato (10^{-4} mol/L).

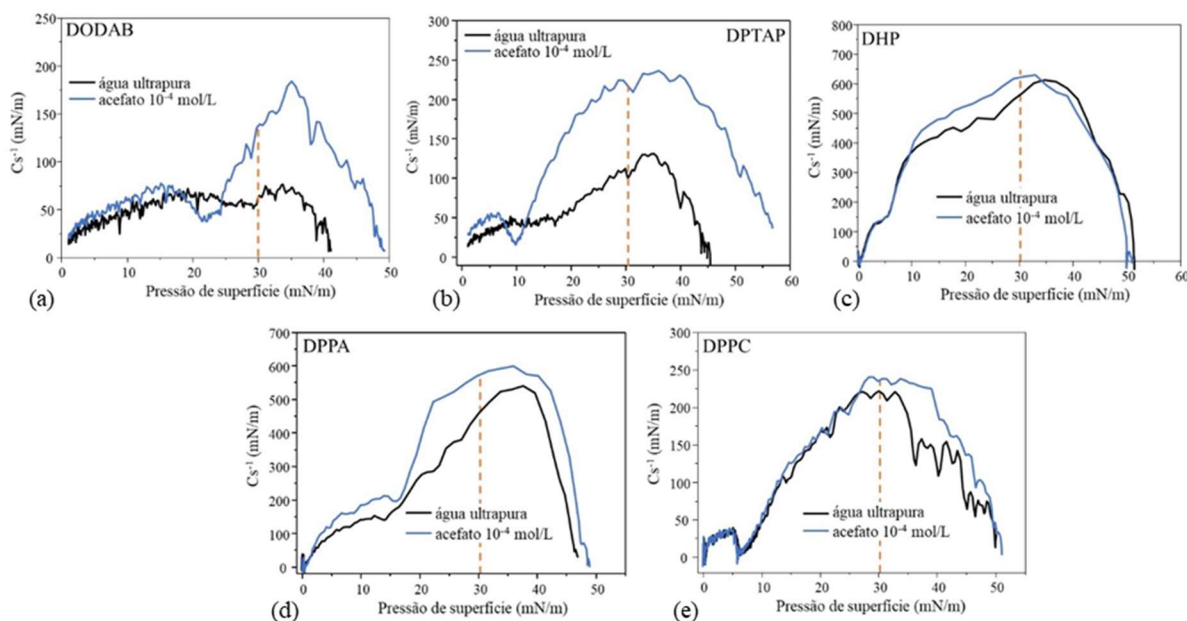


Figura 22: módulo de compressibilidade (Cs^{-1}) das médias das isotermas π -A das monocamadas de (a) DODAB; (b) DPTAP; (c) DHP; (d) DPPA; e (e) DPPC, na ausência e presença de acefato (10^{-4} mol/L). As linhas tracejadas em laranja destacam a pressão de superfície de 30 mN/m, valor utilizado nas análises.

As monocamadas verdadeiras se encontram nas seguintes fases conforme o valor do módulo de compressibilidade [116,117]:

- i) interface sem moléculas = 0 mN/m;
- ii) fase líquido-expandida (LE) = 12,5 a 50 mN/m;
- iii) fase líquido-condensada (LC) = 100 a 250 mN/m;
- iv) fase sólida (S) = 600 a 2000 mN/m.

Gew e Misran, no estudo de monocamadas de ácido esteárico, apontam a fase sólida acima dos 250 mN/m [118].

Em resumo, a Tabela 1 mostra os valores dos módulos de compressibilidade de cada lipídio nas diferentes subfases referentes à pressão de superfície de 30 mN/m.

Tabela 1: valores do módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) das monocamadas de DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC, na ausência e na presença de acefato referentes à pressão de superfície de 30 mN/m

Lipídio	C_s^{-1} : água ultrapura (mN/m)	C_s^{-1} : acefato (10^{-4} mol/L) (mN/m)
DODAB	63±5	138±34
DPTAP	108±2	220±9
DHP	560±20	621±37
DPPA	460±43	572±42
DPPC	220±9	233±22

Observando o módulo de compressibilidade dos lipídios catiônicos DODAB e DPTAP (Figura 22-a e b, respectivamente e Tabela 1), nota-se uma mudança no valor quando na presença de acefato. Enquanto a monocamada de ambos os lipídios, respectivamente, possuem valores de 63 ± 5 e 108 ± 2 mN/m no módulo de compressibilidade em água ultrapura (condizente com a literatura [89] [119]), esses valores são alterados para 138 ± 34 mN/m (2,2 vezes maior) e 220 ± 9 (cerca de 2 vezes maior), respectivamente, na presença de 10^{-4} mol/L de acefato na subfase. Esses dados sugerem uma mudança da fase líquido-expandida (LE) para líquido-condensada (LC) do DODAB [116] na presença do pesticida, enquanto que para o DPTAP, mesmo com o aumento significativo do módulo de compressão, não houve mudança de fase da monocamada. Portanto, a monocamada de DODAB se torna menos elástica na presença do acefato, consistente com uma aproximação das moléculas do lipídio, como discutido para os resultados das isothermas π -A (Figura 16), diminuindo a fluidez do filme [109].

Os valores referentes ao módulo de compressibilidade dos lipídios aniônicos DHP e DPPA (Figura 22-c e d, e Tabela 1), são de 560 ± 20 e 460 ± 43 mN/m, respectivamente, em água

ultrapura. Tais medidas são variadas na presença de acefato (10^{-4} mol/L) na subfase, assumindo valores de 621 ± 37 mN/m para o DHP (1,1 vez maior que na água ultrapura) e 572 ± 42 mN/m para o DPPA (1,2 vez maior em relação ao valor em água ultrapura). Por fim, o módulo de compressibilidade do DPPC (Figura 22-e) não revela diferenças significativas na fase da monocamada tanto na presença quanto na ausência do acefato, permanecendo na fase líquido-condensada (LC) [115,116], uma vez que o valor de C_s^{-1} atingiu valores de 220 ± 9 e 233 ± 22 mN/m para as monocamadas em água ultrapura e na presença de acefato a 10^{-4} mol/L, respectivamente, referente à pressão de superfície de 30 mN/m.

Nota-se, portanto, que há uma proporção respeitada entre as mudanças de módulo de compressibilidade dos cinco lipídios: enquanto para as monocamadas de lipídios catiônicos (DODAB e DPTAP) os valores aumentam em 2,2 e 2 vezes, respectivamente, na presença do acefato, para os lipídios aniônicos (DHP e DPPA) os valores aumentam, respectivamente, em 1,1 e 1,2 vezes. Uma vez que para o DPPC não há mudanças significativas, os valores condizem com os resultados obtidos por isothermas π -A, no qual revelam interações significativas entre monocamadas de DODAB ou DPTAP na presença do pesticida e mudanças não significativas ou nulas para monocamadas de DHP, DPPA e DPPC.

5.2 PM-IRRAS dos lipídios DODAB, DPTAP e DPPC

A discussão apresentada através das análises dos resultados obtidos das isothermas π -A infere que somente o DODAB e o DPTAP sofrem deslocamentos significativos quando a monocamada é comprimida em subfase contendo acefato (10^{-4} e 10^{-3} mol/L). Portanto, foram realizados experimentos de PM-IRRAS para essas duas moléculas (além do DPPC para fins comparativos) em subfase de água ultrapura e de acefato na concentração de 10^{-4} mol/L, na pressão de superfície 30 mN/m. A Figura 23 mostra os espectros do DODAB na ausência (cor preta) e presença (cor vermelha) do pesticida.

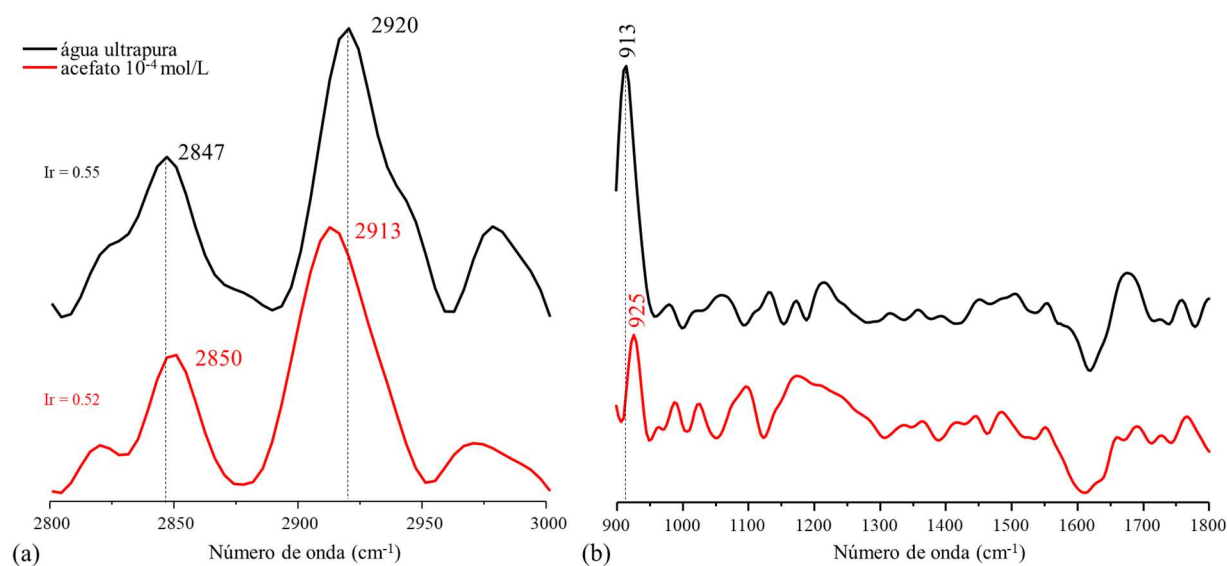


Figura 23: espectros PM-IRRAS de DODAB na ausência (espectros pretos) e presença (espectros vermelhos) de acefato em concentração igual a 10^{-4} mol/L referentes à região da cauda apolar (a) e da cabeça polar (b).

Nota-se, inicialmente, que o espectro das vibrações dos grupos químicos da cauda do DODAB (Figura 21-a) em subfase de água ultrapura (em preto) está de acordo com a literatura [47,120], com valores de picos iguais a 2847 e 2920 cm^{-1} , respectivos aos estiramentos simétrico e antissimétrico do CH_2 . Comparados com os valores obtidos na presença do acefato na subfase, houve um deslocamento significativo apenas no pico referente ao estiramento antissimétrico do CH_2 , diminuindo de 2920 para 2913 cm^{-1} , sugerindo que as moléculas do acefato se encontram nas cadeias de hidrocarbonetos do DODAB [115,121] ou que o ângulo de inclinação das mesmas tenha sido modificado [122]. Contudo, não houve mudanças entre as intensidades relativas (ΔI_r , sendo I_r calculado por $v_s\text{CH}_2/v_{as}\text{CH}_2$) na presença e na ausência do inseticida, uma vez que houve uma diminuição de apenas 0,03, sugerindo a não alteração no ordenamento das cadeias do DODAB. Ao analisar a região da cabeça do DODAB (Figura 23-b), nota-se um deslocamento significativo referente ao estiramento C-N, de 12 cm^{-1} (de 913 cm^{-1} em água ultrapura [123] para 925 cm^{-1} na presença de acefato). Tal mudança aponta para uma

interação íon-dipolo do acefato com o grupo positivo da cabeça do DODAB, corroborando com as mudanças observadas nas isotermas π -A (Figura 16), como apresentado por Stunges et al., [47] no qual há interação entre o hormônio 17 α -etinilestradiol (EE2) com a região da cabeça positiva do DODAB.

A Figura 24 mostra os espectros das vibrações dos grupos químicos da região das cadeias hidrofóbicas (Figura 24-a) e da região da cabeça hidrofílica do DPTAP (Figura 24-b).

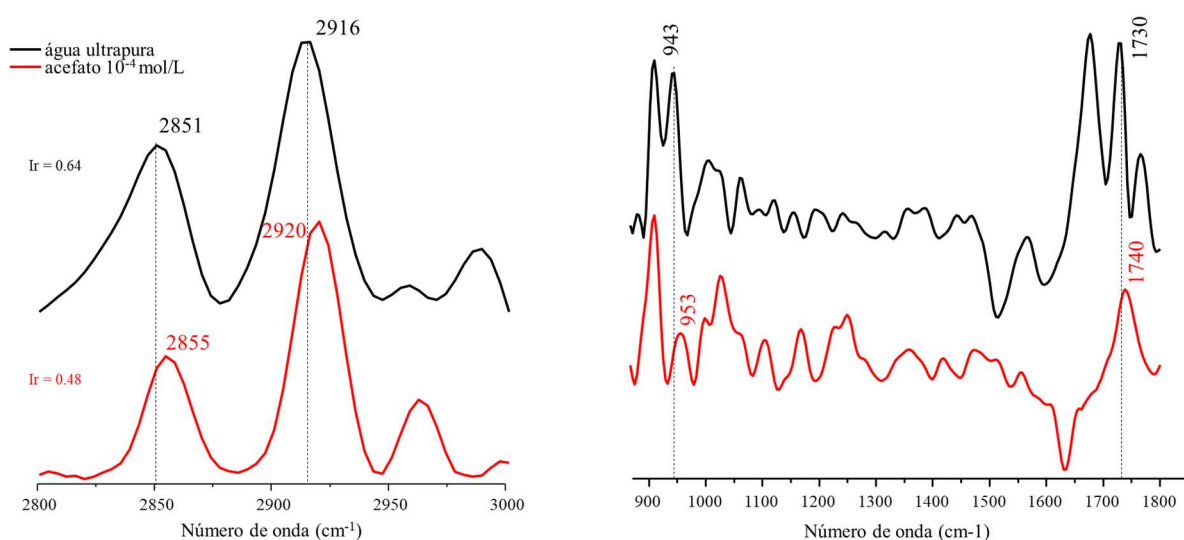


Figura 24: espectros PM-IRRAS de DPTAP na ausência (espectros pretos) e presença (espectros vermelhos) de acefato em concentração igual a 10^{-4} mol/L referentes à região da cauda apolar (a) e da cabeça polar (b).

Ao analisar o espectro PM-IRRAS de DPTAP na região da cadeia hidrofóbica (Figura 24-a), nota-se que os picos referentes ao estiramento simétrico de CH_2 ($\nu_s\text{CH}_2$) (2851 cm^{-1}) e ao estiramento antissimétrico de CH_2 ($\nu_{as}\text{CH}_2$) (2916 cm^{-1}) corroboram com os valores encontrados na literatura para o DPPC, com o qual compartilha a mesma região da cauda [124,125]. Nenhum deslocamento significativo é observado no espectro na presença do acefato, uma vez que, para os estiramentos simétrico e antissimétrico de CH_2 os valores encontrados foram de 2855 e 2920 cm^{-1} , respectivamente. Porém, há uma diminuição na intensidade relativa

desses picos, variando de 0,64 para o DPTAP em água ultrapura para 0,48 em subfase contendo o pesticida ($\Delta I_r = 0,16$). Tal diminuição sugere que há um ordenamento nas cadeias hidrofóbicas do DPTAP [47].

Analisando a região da cabeça hidrofílica do DPTAP (Figura 24-b) os valores destacados para a subfase de água ultrapura (943 e 1730 cm^{-1}) remetem grupos $\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$ e ($\nu\text{C=O}$), respectivamente [124]. Na presença de acefato, os valores aumentam de 943 para 953 cm^{-1} ($\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$), e de 1730 para 1740 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), revelando a interação do acefato com esses grupos, o que condiz com os deslocamentos das isotermas π -A para o DPTAP (Figura 17). O deslocamento referente ao grupo colina ($\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$) remete uma atração íon-dipolo entre o grupo positivo da cabeça hidrofílica e o acefato. Já deslocamento da banda referente ao grupo glicerol ($\nu\text{C=O}$) para maiores números de onda sugere um enfraquecimento das ligações de hidrogênio em torno desse grupo [126,127]. Além disso, a presença do grupo glicerol no DPTAP pode ter afetado a organização das cadeias de hidrocarbonetos, uma vez que, para o DPPC (que possui o grupo glicerol em sua estrutura) houve uma diferença na I_r , e para o DODAB (que não possui o grupo glicerol) não houve mudanças nesse quesito. Portanto, supõe-se que tal grupo tenha papel fundamental na organização ou reorganização das cadeias de hidrocarbonetos quando a monocamada está na presença do acefato.

A Figura 25 mostra os espectros de PM-IRRAS de DPPC na ausência (espectro preto) e presença (espectro vermelho) de acefato, assim como as atribuições dos picos analisados, da região da cadeia de hidrocarbonetos (Figura 25-a) e da cabeça polar (Figura 25-b) da molécula.

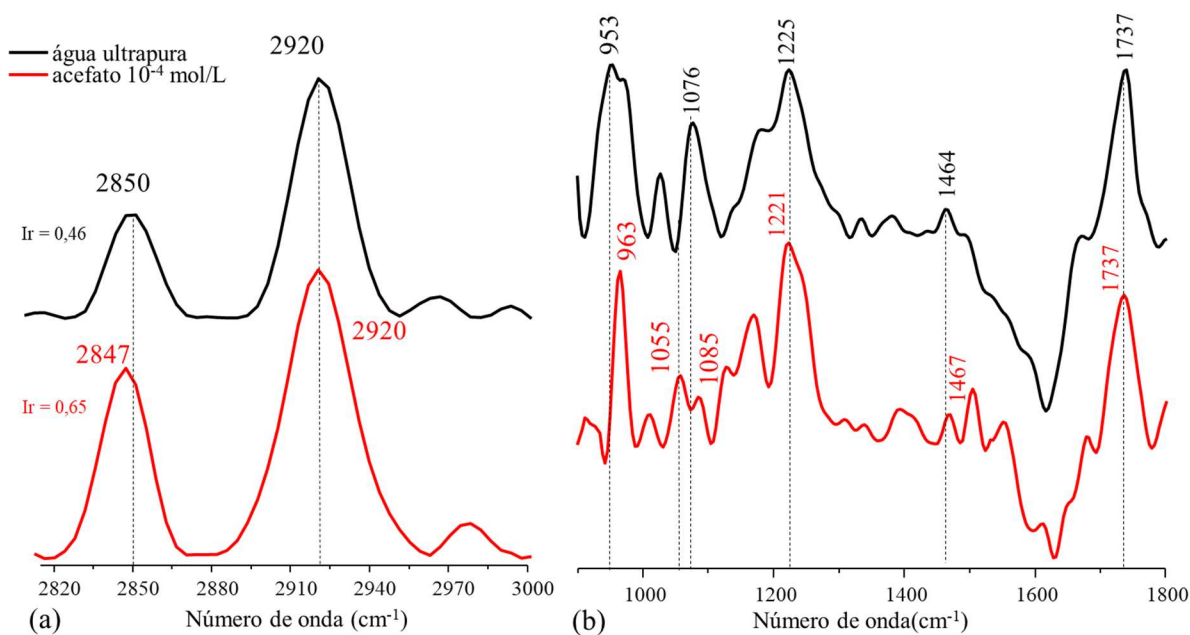


Figura 25: espectros PM-IRRAS de DPPC na ausência (espectros pretos) e presença (espectros vermelhos) de acefato em concentração igual a 10^{-4} mol/L referentes à região da cauda apolar (a) e da cabeça polar (b). As atribuições dos valores destacados estão no texto. Ir: Intensidade relativa.

Inicialmente, nota-se que em relação à cauda do DPPC (Figura 25-a), não houve grandes deslocamentos das bandas referentes ao estiramento simétrico de CH_2 ($\nu_s\text{CH}_2$), uma vez que o valor para a subfase de água ultrapura é igual a 2850 cm^{-1} e, na presença de acefato, é igual a 2847 cm^{-1} . Com relação ao estiramento antissimétrico de CH_2 ($\nu_{as}\text{CH}_2$), o valor encontrado para a monocamada em subfase de água ultrapura é de 2920 cm^{-1} [124,125], mantendo o mesmo valor na presença de acefato. Porém, relacionando a diferença entre as intensidades relativas das bandas em questão, nota-se que houve um aumento de 0,19, o que indica uma aumento na desordem das cadeias hidrofóbicas do DPPC [47].

Com relação à região relativa aos modos vibracionais dos grupos localizados na cabeça polar da molécula de DPPC (Figura 25-b), nota-se que os valores principais são o estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$) em 953 cm^{-1} ; o estiramento simétrico e antissimétrico do grupo fosfato ($\nu_s\text{P=O}$ em 1076 cm^{-1} e $\nu_{as}\text{P=O}$ em 1225 cm^{-1} , respectivamente),

a deformação angular (δ) do grupo CH_2 em 1464 cm^{-1} e o estiramento do grupo carbonila ($\nu\text{C=O}$) em 1737 cm^{-1} , sendo esses valores condizentes com a literatura [124]. A fim de comparar os valores obtidos dos espectros do DPPC na presença e ausência de acefato, a Tabela 2 mostra os valores encontrados, bem como as atribuições correspondentes.

Tabela 2: atribuições das bandas encontradas para os espectros PM-IRRAS de DPPC na ausência e na presença de acefato

Atribuição	Subfase: água ultrapura	Subfase: acefato 10^{-4} mol/L
$\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$	953 cm^{-1}	963 cm^{-1}
$\nu_{\text{s}}\text{P=O}$	1076 cm^{-1}	$1055\text{ e }1085\text{ cm}^{-1}$
$\nu_{\text{as}}\text{P=O}$	1225 cm^{-1}	1221 cm^{-1}
δCH_2	1464 cm^{-1}	1467 cm^{-1}
$\nu\text{C=O}$	1737 cm^{-1}	1737 cm^{-1}

Inicialmente, nota-se um deslocamento significativo na banda do estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$) para maiores números de onda (de 953 para 963 cm^{-1} quando na presença de acefato). Tal deslocamento revela, assim como nos resultados para o DODAB e DPTAP, uma interação íon-dipolo, apesar de não apresentar mudanças nos resultados de isothermas π -A. Há ainda a possibilidade de um mesmo tipo de interação entre a porção positiva do acefato com o grupo fosfato do DPPC, uma vez que a banda presente em 1076 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{P=O}$) na ausência de acefato divide-se em outras duas (1055 e 1085 cm^{-1}) na presença do pesticida. Uma vez que não há mudanças significativas nas bandas em 1464 e 1737 cm^{-1} (δCH_2 e $\nu\text{C=O}$, grupo glicerol), sugere-se que o acefato encontra-se em torno apenas dos grupos colina e fosfato, preferencialmente.

5.3 Modelagem molecular

Afim de se avaliar melhor as interações entre os lipídios e o acefato, foram realizados cálculos teóricos por meio de modelagem molecular. A Figura 26 mostra os mapas de CAF e MEP para a reatividade das moléculas isoladas de DPPC, DODAB, DHP, DPTAP e DPPA, além do acefato. As regiões mais avermelhadas definem os sítios mais reativos e negativamente carregados, enquanto as regiões mais azuladas definem as porções menos reativas e carregadas positivamente.

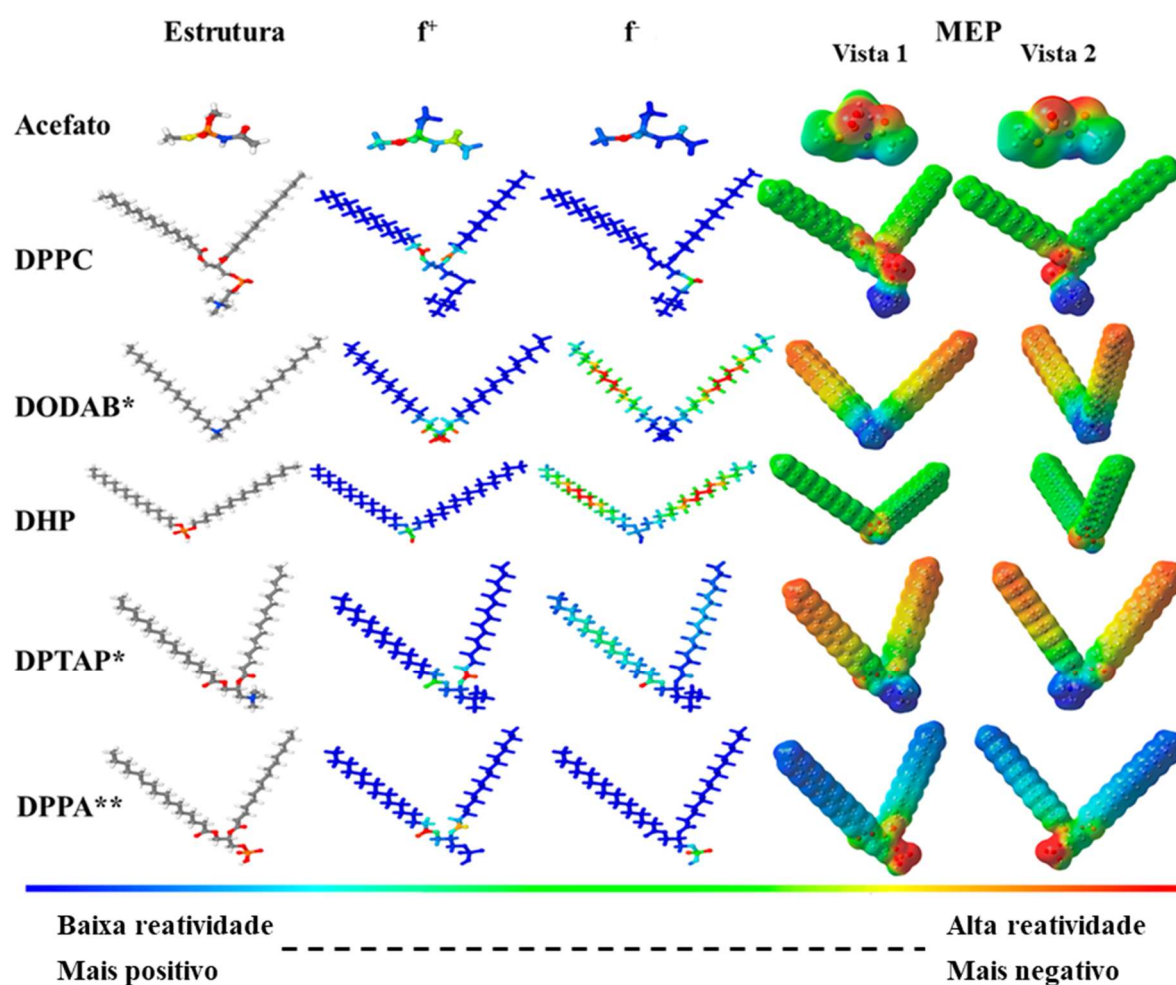


Figura 26: mapa colorido dos sítios mais reativos (e mais negativos) e dos sítios menos reativos (e mais positivos) das moléculas de acefato, DPPC, DODAB, DHP, DPTAP e DPPA. f^+ e f^- definem os sítios reativos do acefato e dos lipídios em relação a agentes nucleófilos e eletrófilos, respectivamente.

Observa-se, na Figura 26, que o acefato possui uma região de alta densidade eletrônica próxima ao átomo de oxigênio ligado ao átomo de fósforo, enquanto as cargas positivas se encontram espalhadas ao longo da molécula, principalmente nos átomos de hidrogênio das ligações NH e CH₃. Tal restrição do potencial negativo próximo ao oxigênio pode facilitar a interação do acefato com as porções positivas dos lipídios. Além disso, como os potenciais positivos do acefato se referem aos grupos metil terminais, tal porção da molécula pode ser sensível a mudanças estruturais induzidas termicamente, dificultando interações efetivas entre o acefato e porções negativas dos lipídios.

Com base nos resultados obtidos na Figura 26, foram avaliados os sistemas com o acefato adsorvido nas moléculas de DPPC, DODAB e DPPA, alinhando as porções negativas do acefato às porções positivas dos lipídios, como mostra a Figura 27.

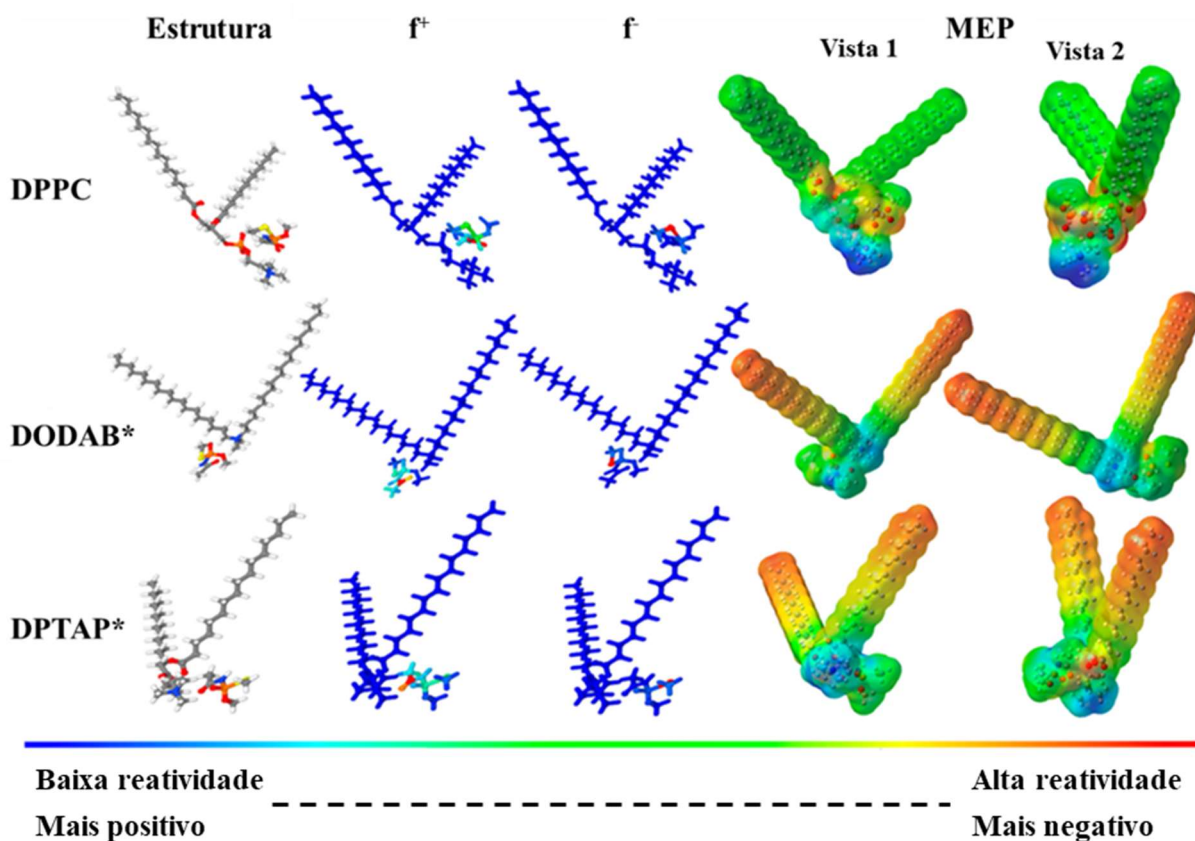


Figura 27: mapa colorido dos sítios mais reativos (e mais negativos) e dos sítios menos reativos (e mais positivos) dos sistemas adsorvidos de acefato+DPPC, DODAB ou DPPA. f^+ e f^- definem os sítios reativos do acefato e dos lipídios em relação a agentes nucleófilos e eletrófilos, respectivamente.

Nota-se, a princípio, que o acefato reduz o potencial próximo às cabeças lipídicas com efeitos mínimos em suas cadeias. A adsorção do pesticida nos lipídios DODAB e DPPA revelam que o acefato reduz as forças repulsivas entre as moléculas lipídicas, possibilitando sua aproximação, porém sua presença também ocupa espaço entre as moléculas, restringindo um possível maior empacotamento. Para o DPPC, o acefato muda o balanceamento de carga da cabeça zwitteriônica, o que pode afetar as interações entre as moléculas DPPC/DPPC. Uma vez que se tem uma interação efetiva entre o grupo oxigênio do acefato com a colina dos lipídios, nota-se que os átomos de enxofre (S) são expostos a unidades adjacentes para todos os casos, sugerindo um processo coesivo adicional.

A Tabela 3 mostra as energias de adsorção para cada um dos sistemas presentes na Figura 27, em ambiente gasoso e em água.

Tabela 3: energias de adsorção para os sistemas acefato+DPPC, +DODAB ou +DPTAP em gás e em água

Sistema	Energia de adsorção (kJ/mol)	
	gás	água
Acefato+DPPC	-198,906	-81,831
Acefato+DODAB	-90,162	-27,976
Acefato+DPTAP	-102,857	-34,670

As energias de adsorção foram realizadas para o vácuo para legitimar os resultados. Uma vez que tais valores se mostram 3 vezes maiores do que os obtidos em água, os resultados obtidos na Tabela 3 se mostram compatíveis. Nota-se que, para o sistema acefato+DPPC, a energia de adsorção se mostra 2,9 e 2,7 vezes maior do que os valores obtidos para os lipídios DODAB e DPTAP, respectivamente. Tal valor sugere que o acefato sofre uma quimiossorção no DPPC, enquanto sofre uma fisiossorção para os demais lipídios. Vale ressaltar que os cálculos foram realizados para uma única posição pré-estabelecida do acefato em relação às cabeças dos lipídios, sendo os valores da Tabela 3 correspondentes a esse sistema.

Em resumo, os resultados obtidos por meio de isotermas π -A, espectros PM-IRRAS e cálculos teóricos revelam que o acefato possui um caráter negativo localizado que pode ser atraído pelos grupos positivos colina e amônia quaternária dos lipídios e possui uma interação menos evidente com grupos negativos (fosfato). Em tal interação, os sítios negativos (O) e os sítios nucleofílicos (S) do acefato podem se aproximar dos átomos de nitrogênio (N) dos grupos catiônicos dos lipídios, enquanto os átomos de hidrogênio do pesticida se aproximam do grupo fosfato. O último caso poderia afetar as áreas moleculares nas isotermas π -A dos lipídios DHP e DPPA da mesma forma que o observado para os lipídios DODAB e DPTAP. Porém tal efeito

não é observado provavelmente pela distribuição de carga positiva em torno de toda a molécula do pesticida, o que sugere que as moléculas de acefato se encontram abaixo das monocamadas dos lipídios DHP e DPPA. A Figura 28 mostra o momento de dipolo do acefato calculado por Gaussian 16 (Figura 28-a), bem como esquemas ilustrativos das monocamadas de DODAB (Figura 28-b), DPTAP (Figura 28-c) e DPPC (Figura 28-d) na presença de acefato levando em conta a discussão anterior.

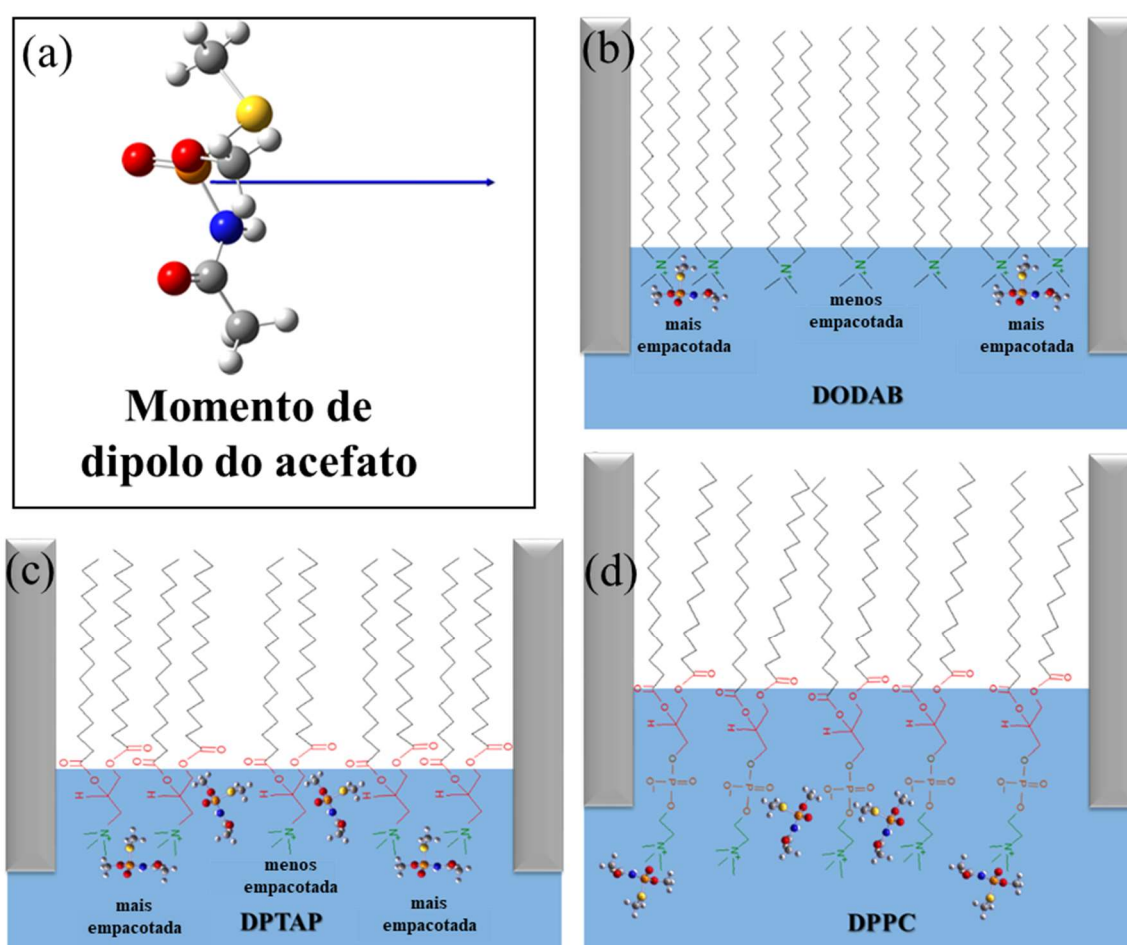


Figura 28: (a) momento de dipolo do acefato, na qual os átomos estão representados pelas esferas no seguinte esquema de cores: *amarelo- enxofre; laranja-fósforo; vermelho-oxigênio; azul-nitrogênio; cinza-carbono; e branco-hidrogênio*. Ilustrações esquemáticas das monocamadas de (b) DODAB; (c) DPTAP; e (d) DPPC na presença de acefato. Os grupos das cabeças dos lipídios seguem o seguinte esquema de cor: vermelho-glicerol; laranja-fosfato; e verde-colina/amônia quaternária.

As ilustrações na Figura 28 mostram a disposição das moléculas de lipídios mais e menos empacotadas (para o DODAB e para o DPTAP). O acefato está disposto nas regiões das cabeças seguindo as explicações citadas anteriormente. Já com relação à região das cadeias hidrofóbicas (ordenamento – PM-IRRAS), tem-se que, para o DODAB, nenhuma mudança é observada, enquanto para o DPTAP há um maior ordenamento. Para o DPPC, há um desordenamento dessas cadeias na presença do acefato. Tal padrão pode estar ligado à organização das cadeias hidrofóbicas para as monocamadas em água ultrapura. Por meios das intensidades relativas obtidas por espectros PM-IRRAS, observa-se que, na ausência de acefato, a monocamada de DPPC se encontra mais ordenada ($I_r=0,46$ – Figura 25-a), seguida pelo DODAB ($I_r=0,55$ – Figura 23-a) e pelo DPTAP ($I_r=0,64$ – Figura 24-a). Na presença do acefato, os valores de I_r para o DODAB e DPTAP possuem valores semelhantes (0,52 e 0,48, respectivamente), tendo um ordenamento similar. Uma vez que as cadeias hidrofóbicas de DODAB já se encontram relativamente ordenadas em água ultrapura, a presença do acefato não altera esse valor significativamente. Já para o DPTAP, menos ordenado em água ultrapura, fica evidente a mudança de I_r na presença do pesticida. No caso do DPPC, que possui um maior ordenamento na ausência do pesticida em relação ao DODAB e ao DPTAP, as interações entre o pesticida com os grupos colina e fosfato podem diminuir o ordenamento das cadeias.

5.4 Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM)

A morfologia das monocamadas DODAB, DPTAP e DPPC na ausência e na presença de acefato (10^{-4} mol/L) foi analisada por meio de BAM em diferentes pressões de superfície, como mostra a Figura 29.

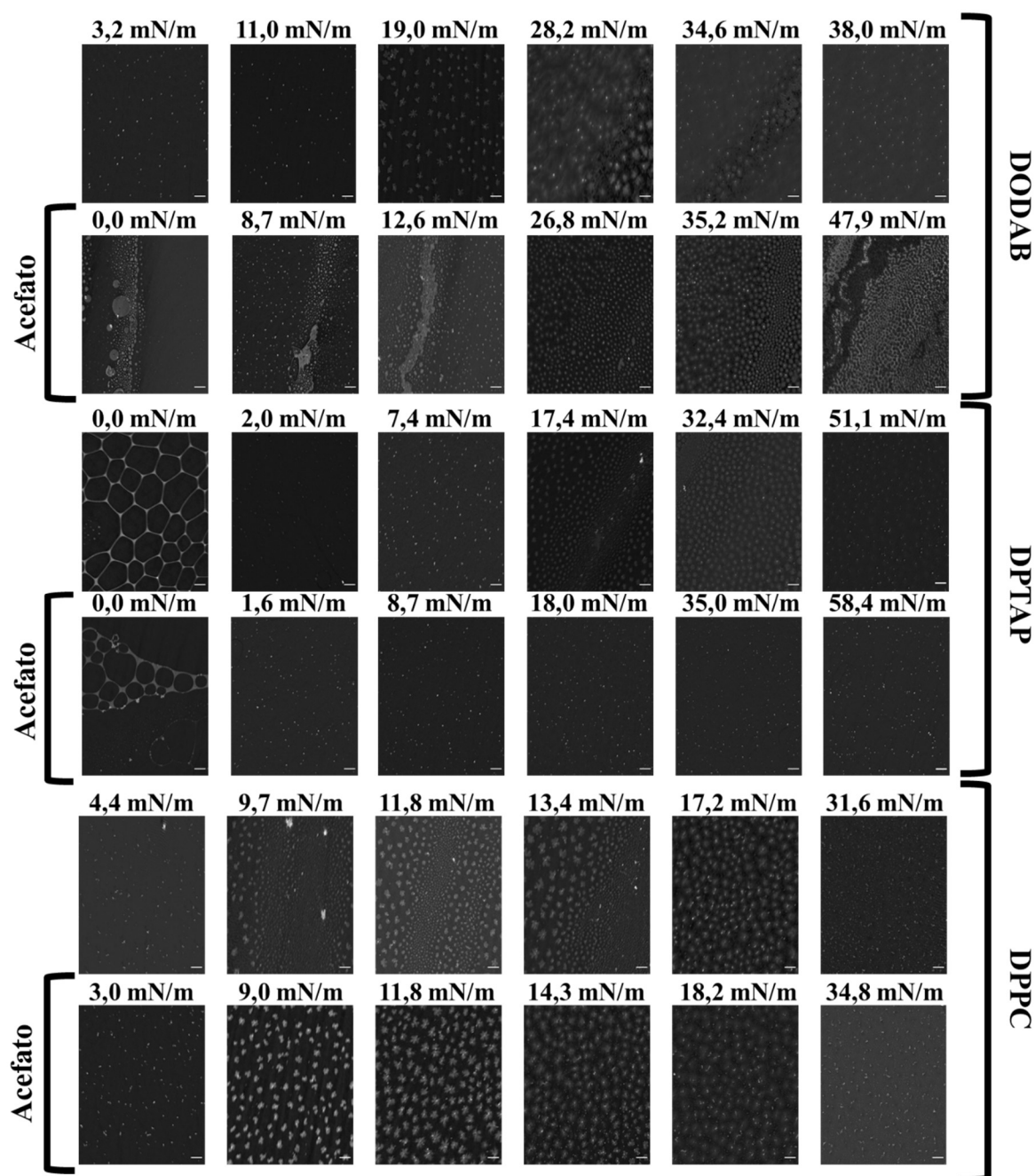


Figura 29: imagens de BAM de monocamadas de Langmuir de DODAB, DPTAP e DPPC na ausência e na presença de acefate (10^{-4} mol/L). As barras de escala equivalem a 40 μ m.

Nas monocamadas de DODAB, observam-se estruturas circulares que aparecem em menores pressões de superfície (3 mN/m), tomando um formato de “folhas”, característico do lipídio em maiores pressões (19 mN/m), até se tornar homogêneo entre 34,6 e 38 mN/m [128]. Em relação ao filme de DPTAP, pequenos domínios circulares são observados a partir de 8

mN/m e se tornam homogêneos em torno de 50 mN/m [129]. Nas monocamadas de DPPC em água ultrapura, estruturas referentes à fase LE-LC são formadas em 9,7 mN/m [130,131] e permanecem até o empacotamento da monocamada em 31,6 mN/m, tornando-se homogêneas. Na presença de acefato, para o DODAB e DPTAP, mudanças na morfologia das estruturas, bem como no tamanho e na quantidade encontrada são observadas. Para ambas as monocamadas, os domínios se tornam menores, mais arredondados e mais espaçados entre si, sendo mais proeminente no DPTAP. Tanto o tamanho quanto o formato dos domínios são atribuídos a forças atrativas e repulsivas durante a compressão [132,133]. Dessa forma, como discutido nos resultados anteriores, o pesticida interage com a porção positiva das cabeças dos lipídios DODAB e DPTAP, diminuindo a repulsão eletrostática entre as moléculas presentes na interface ar/água, resultando nos deslocamentos das isotermas π -A, aumento do C_s^{-1} e, por consequência, alterando a morfologia das monocamadas. Nenhuma mudança significativa foi observada na monocamada de DPPC, corroborando com os resultados obtidos por isotermas π -A e módulo de compressibilidade (Figuras 20 e 22-e, respectivamente).

5.5 Microscopia por contraste de fase de GUVs de lipídios catiônicos (DODAB e DPTAP)

Foram analisadas GUVs dos lipídios catiônicos DODAB e DPTAP na ausência e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L) por meio de microscopia de contraste de fase. A Figura 30 mostra as triplicatas (linhas A, B e C) das GUVs de DODAB e DPTAP em glicose.

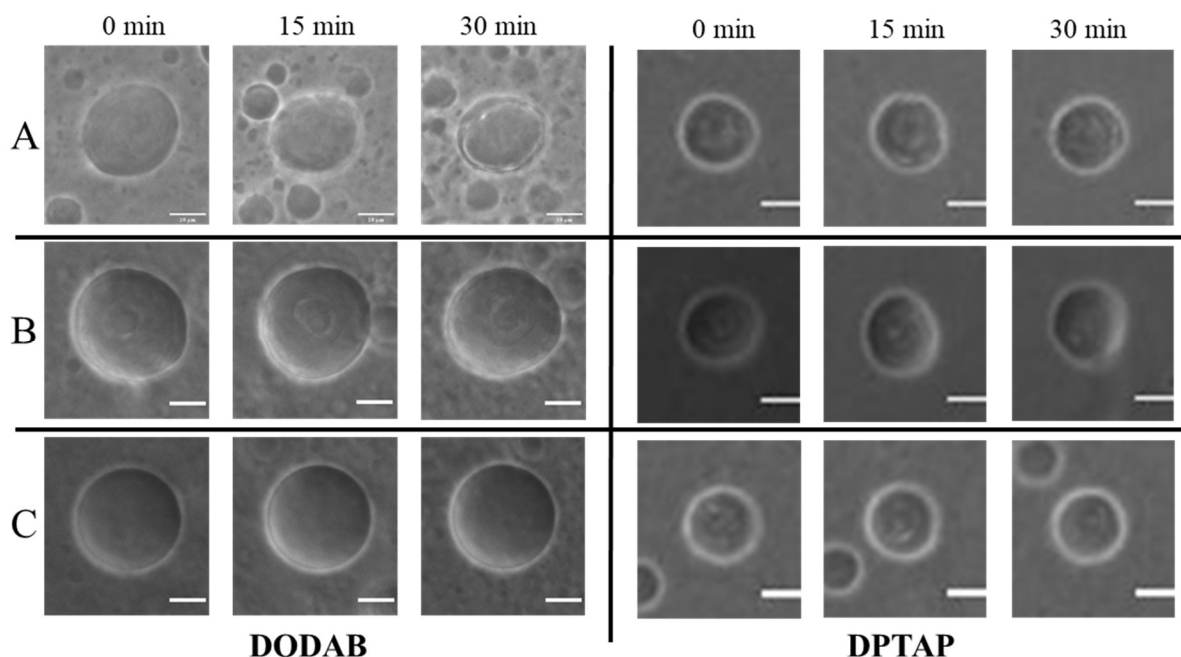


Figura 30: GUVs de DODAB e DPTAP em solução de glicose a uma temperatura de 20 ± 1 °C. Cada linha corresponde à uma formação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira formação). As barras de escala equivalem a 10 μm .

Inicialmente, nota-se que as GUVs possuem o contraste de fase definido e o mantém até o fim da observação. O formato das vesículas dos dois lipídios, principalmente das formações A e B, possuem um caráter menos esférico do que o que se costuma observar para essas estruturas. Essa morfologia é encontrada devido à fase em que se encontram as vesículas de DODAB e DPTAP em temperatura ambiente. Uma vez que a transição de fase se encontra em altas temperaturas para ambas (seção 3.1), as bicamadas se encontram na fase gel, sendo mais rígidas do que GUVs de lipídios como POPC e DOPC, que se encontram em fases fluidas nessa temperatura [134,135].

A fim de comparar as vesículas dos lipídios catiônicos na ausência e presença de acefato, a Figura 31 mostra as GUVs de DODAB e DPTAP, em triplicata, na presença do pesticida ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L).

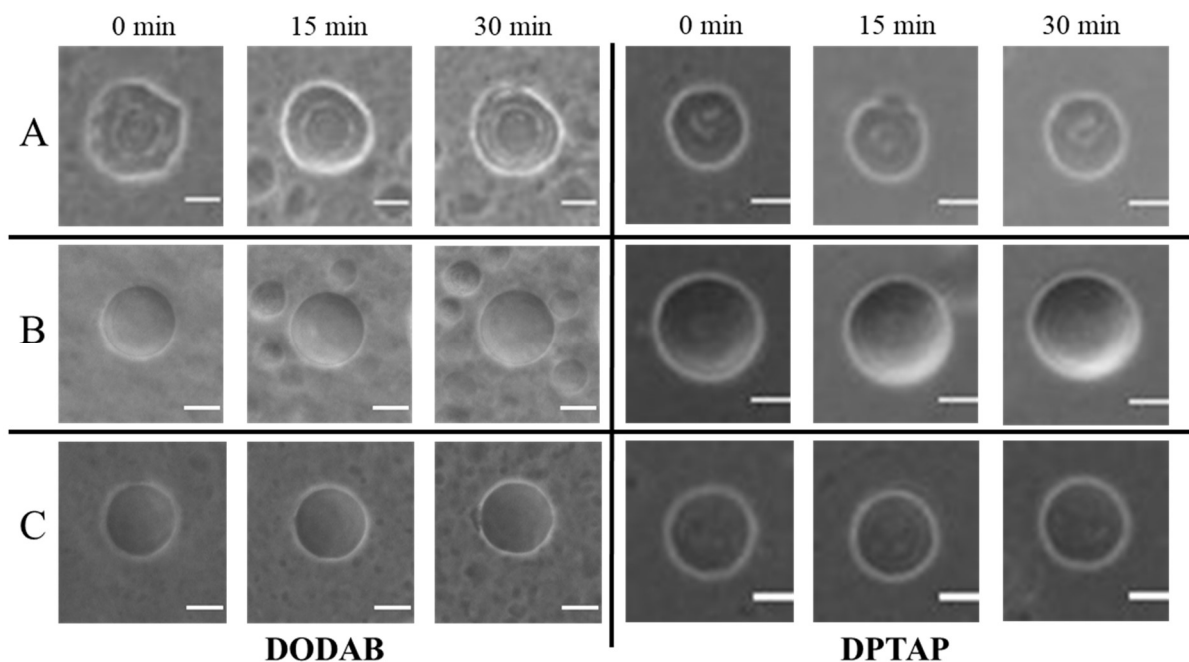


Figura 31: GUVs de DODAB e DPTAP em solução de glicose com acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L) a uma temperatura de 20 ± 1 °C. Cada linha corresponde à uma formação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira formação). As barras de escala equivalem a 10 μ m.

Primeiramente, nota-se que, assim como as GUVs de DODAB e DPTAP em solução de glicose (Figura 30) na ausência do acefato, o contraste de fase se mantém para todas as vesículas observadas na presença do acefato durante toda a aquisição das imagens. Outro ponto importante é a mudança de formato observado nas GUVs da linha A, de ambos os lipídios, durante o tempo de observação. Tal mudança ocorreu uma vez que as vesículas estavam em movimento durante a aquisição das imagens, sofrendo rotações, o que revelou a assimetria nas estruturas. Vale ressaltar que, apesar da GUV de DPTAP, linha A, em 15 minutos, ter uma porção sem contraste de fase, tal região é atribuída a uma assimetria que possui seu foco diferente do resto da vesícula. No geral, a esfericidade das bicamadas aparece mais nitidamente na presença do pesticida. É importante frisar que as imagens retratam apenas uma única GUV em uma região com um maior número de vesículas presentes, não sendo o suficiente para

atribuir possíveis mudanças morfológicas causadas pelo acefato em outras regiões não monitoradas através do vídeo.

A fim de investigar um possível efeito do acefato na morfologia das GUVs de DODAB e DPTAP não observadas no vídeo, um estudo quantitativo foi realizado da seguinte forma: após os 30 minutos dos vídeos, 5 imagens foram capturadas em regiões distintas. O total de GUVs foi contado (em número e porcentagem), incluindo aquelas que apresentaram mudanças morfológicas como perda de contraste e protrusões, para cada experimento da triplicata. Por fim, a média aritmética e o desvio padrão das porcentagens do total de vesículas e mudanças morfológicas foram calculados. A Figura 32 mostra tal análise por meio de gráfico de barras das GUVs de DODAB e DPTAP na ausência (barras cinzas) e presença de acefato (barras vermelhas).

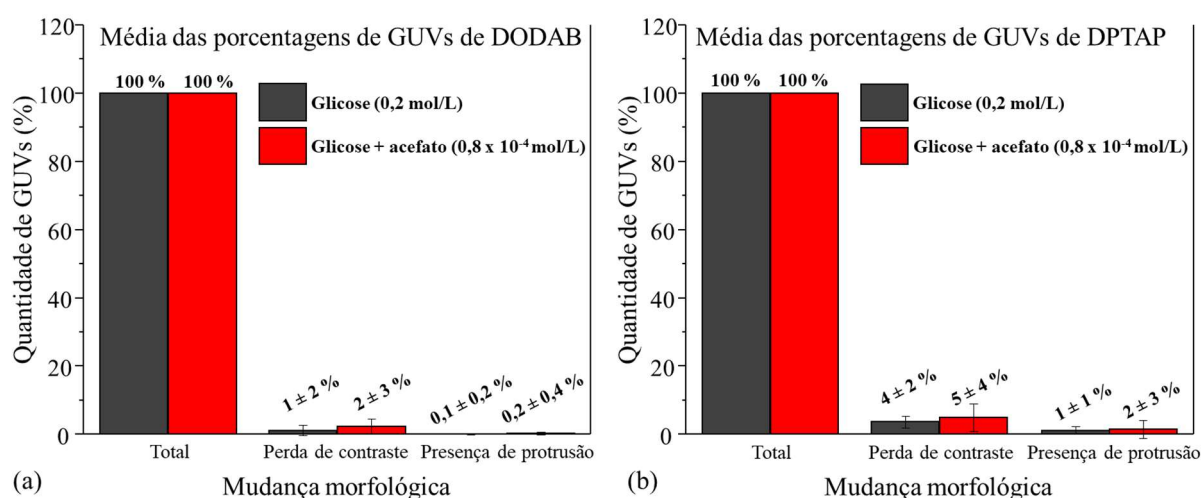


Figura 32: análise quantitativa (em média de porcentagem) das GUVs de (a) DODAB e (b) DPTAP na ausência (barra cinza) e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L – barra vermelha). Cada conjunto de barras cinza/vermelha corresponde a um conjunto de GUVs sendo: total, perda de contraste de fase e presença de protrusão.

Nota-se, pela Figura 32, que para ambas composições das GUVs (DODAB – Figura 32-a e DPTAP – Figura 32-b) não houve mudanças morfológicas (perda de contraste de fase ou

presença de protrusões [136,137]) na maioria das bicamadas analisadas. Além disso, nota-se também a semelhança entre as porcentagens das vesículas com mudanças morfológicas na ausência e presença do pesticida, revelando que o acefato não promove um aumento de número de GUVs afetadas. Dentre as contagens, observa-se que há um desvio padrão maior que o valor da média encontrado para as vesículas de DODAB com perda de contraste de fase (Figura 32-a) e para as vesículas de DPTAP com protrusões (Figura 32-b). Tal discrepância se deve à diferença entre os experimentos das triplicatas, uma vez que se tem diferentes valores de GUVs encontradas com mudanças morfológicas.

Uma vez que não há diferenças significativas nas porcentagens tanto para o DODAB quanto para o DPTAP na presença de acefato, sugere-se que o pesticida não promove nenhum tipo de mudança morfológica nas vesículas que sejam visíveis por meio de microscopia, mesmo que efeitos tenham sido observados por meio de isotermas π -A (Figuras 16 – DODAB- e 17 - DPTAP), PM-IRRAS (Figuras 23 –DODAB – e 24 - DPTAP) e BAM (Figura 29).

5.6 Microscopia por contraste de fase de GUVs de DPPC

Foram analisadas as GUVs de DPPC eletroformadas após a adição de uma alíquota em solução de glicose 0,2 mol/L. A Figura 33 mostra as imagens coletadas através da microscopia de contraste de fase ao longo da observação, no tempo 0, 15 e 30 minutos, das vesículas do DPPC em solução de glicose.

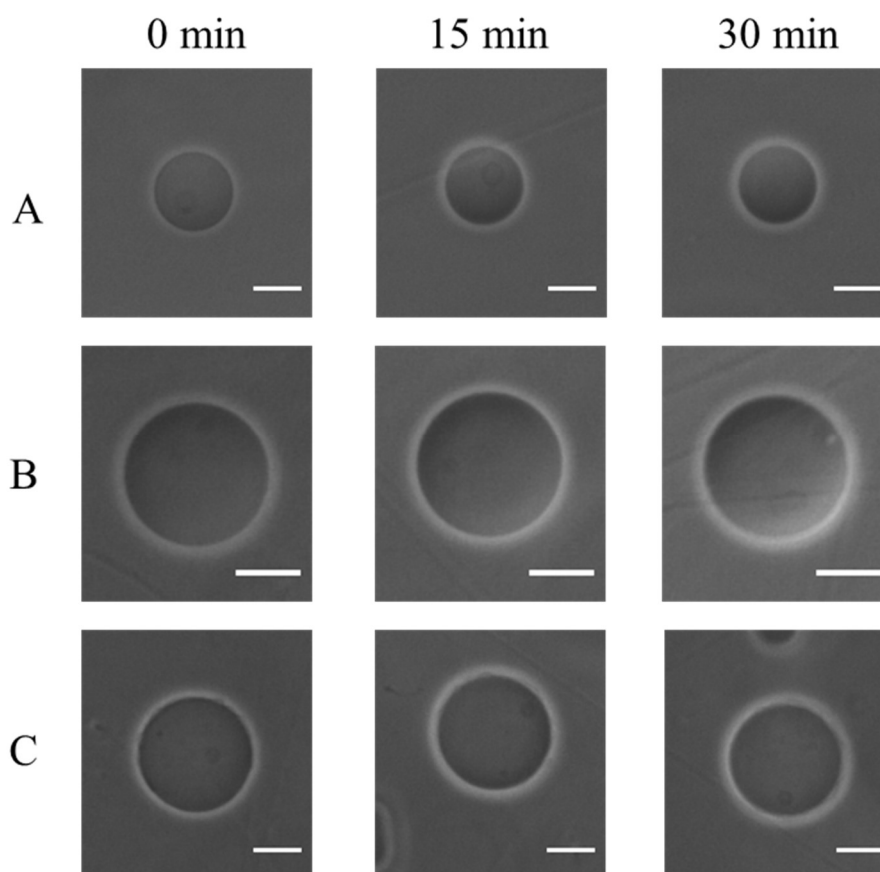


Figura 33: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC em solução de glicose (0,2 mol/L), a uma temperatura de 20 ± 1 °C. Cada linha corresponde a uma eletroformação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira eletroformação). As barras de escala equivalem a 10 μ m.

Observa-se que as GUVs apresentam o formato esférico esperado [138] durante toda a aquisição das imagens. Nenhuma mudança morfológica foi visualizada, mostrando que as GUVs obtidas permaneceram estáveis. Além disso, não foi observada perda no contraste de fase durante os 30 minutos de observação.

O mesmo experimento foi realizado em solução de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L), mantendo as mesmas condições anteriores. A Figura 34 mostra as imagens de microscopia de contraste de fase para as vesículas do DPPC na presença do acefato referente ao vídeo de 30 minutos. Assim como a Figura 33, cada imagem foi capturada de 15 em 15 minutos, exceto para a Figura 34-A (os conjuntos de retângulo laranja e verde representam GUVs distintas), sendo cada linha equivalente a uma eletroformação diferente.

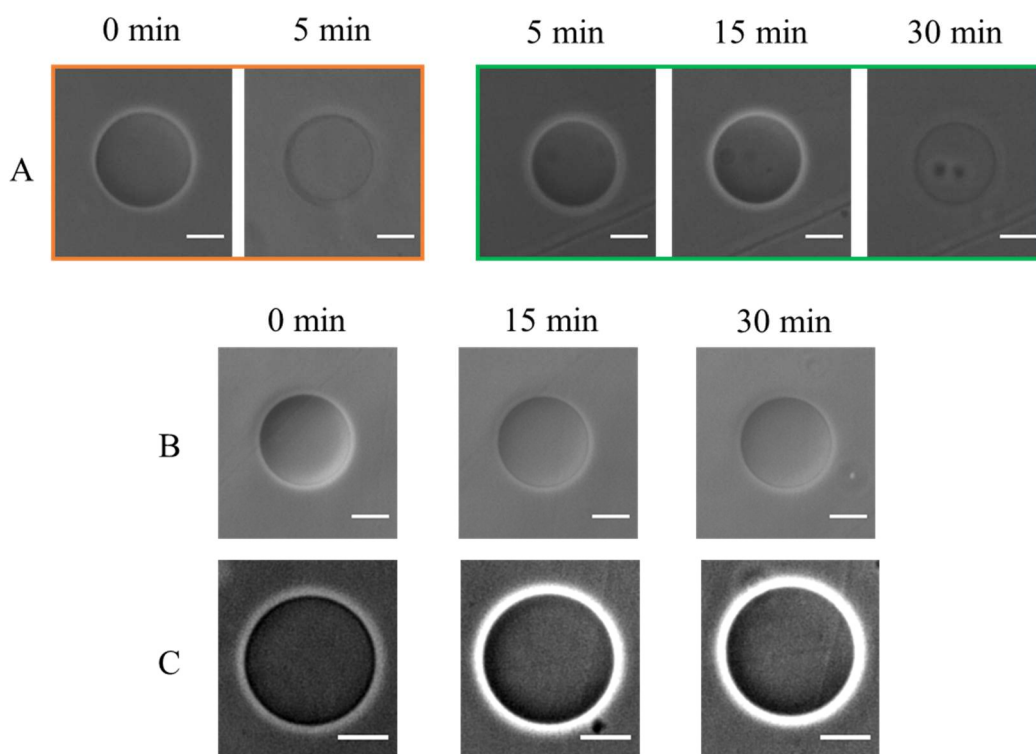


Figura 34: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC em solução de glicose + acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L). Cada linha corresponde a uma eletroformação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira eletroformação). As barras de escala equivalem a $10 \mu\text{m}$. A região destacada em laranja na Figura 34 – A equivale a primeira GUV a perder o contraste de fase, enquanto a região destacada de verde equivale a segunda GUV.

Nota-se que as GUVs, no geral, mantêm o formato esférico esperado durante todo o tempo de aquisição do vídeo. Além disso, nenhuma mudança morfológica ocorreu para qualquer uma das vesículas. A fim de investigar um possível efeito do acefato nas GUVs de DPPC, um estudo quantitativo foi realizado da mesma maneira feita para as vesículas de DODAB e DPTAP. A Figura 35 mostra a análise quantitativa em porcentagem para as GUVs de DPPC na ausência e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L) levando em conta o total de vesículas contadas e presença de mudanças morfológicas (perda do contraste de fase e presença de protrusões). Os valores apresentados representam a média das triplicatas, bem como o desvio padrão.

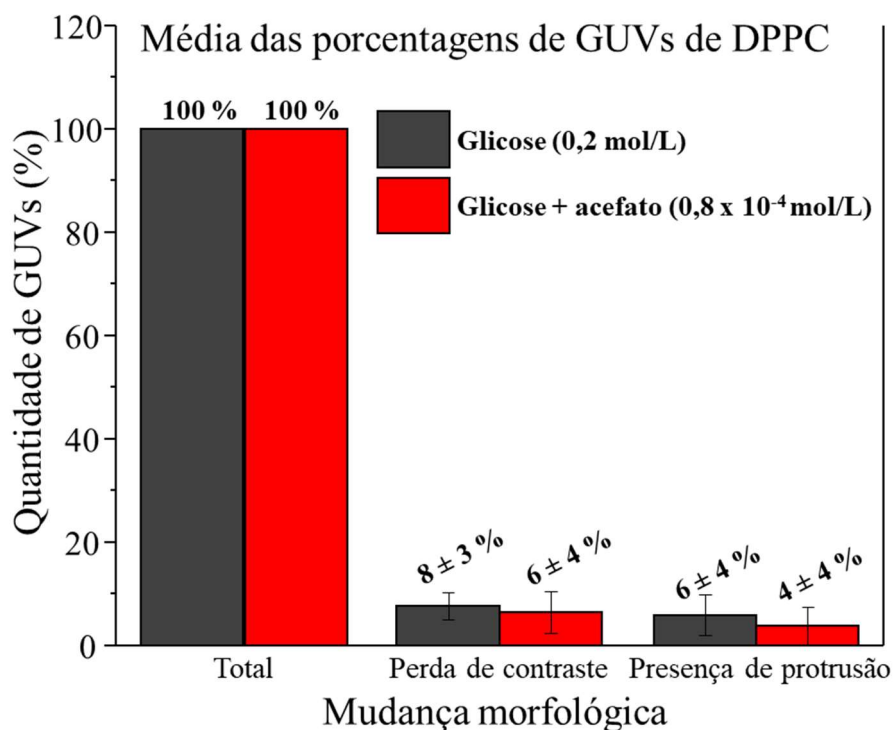


Figura 35: análise quantitativa (em média de porcentagem) das GUVs de DPPC na ausência (barra cinza) e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L – barra vermelha). Cada conjunto de barras cinza/vermelha corresponde a um conjunto de GUVs sendo: total, perda de contraste de fase e presença de protrusão.

De acordo com a Figura 35, as GUVs de DPPC apresentam, tanto na ausência quanto na presença de acefato, perda do contraste de fase e presença de protrusões. Apesar de possuir porcentagens maiores, em termos de mudanças morfológicas, que as observadas nas vesículas dos lipídios catiônicos (Figura 32), nota-se que não há aumento do número de vesículas de DPPC sem contraste de fase ou com protrusões na presença do pesticida quando comparado com as vesículas observadas em glicose.

5.7 Diâmetro e potencial zeta de LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC

Uma vez que os estudos de microscopia por contraste de fase não evidenciam nenhum efeito significativo do acefato em vesículas gigantes de DODAB, DPTAP ou DPPC, contrastando com as análises realizadas a partir dos resultados obtidos pelos estudos de monocamadas e também de modelagem teórica, foram analisados os valores de tamanho e potencial zeta das LUVs formadas por esses lipídios na ausência e na presença do acefato. Na Figura 36 estão representados os gráficos de variação de diâmetro (Figuras 36-a) e potencial zeta (Figura 36-b) das LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC (todas a 100 μM) em diferentes concentrações de acefato nos sistemas (0, 0,1, 10, 25, 50, 75 ou 100 μM).

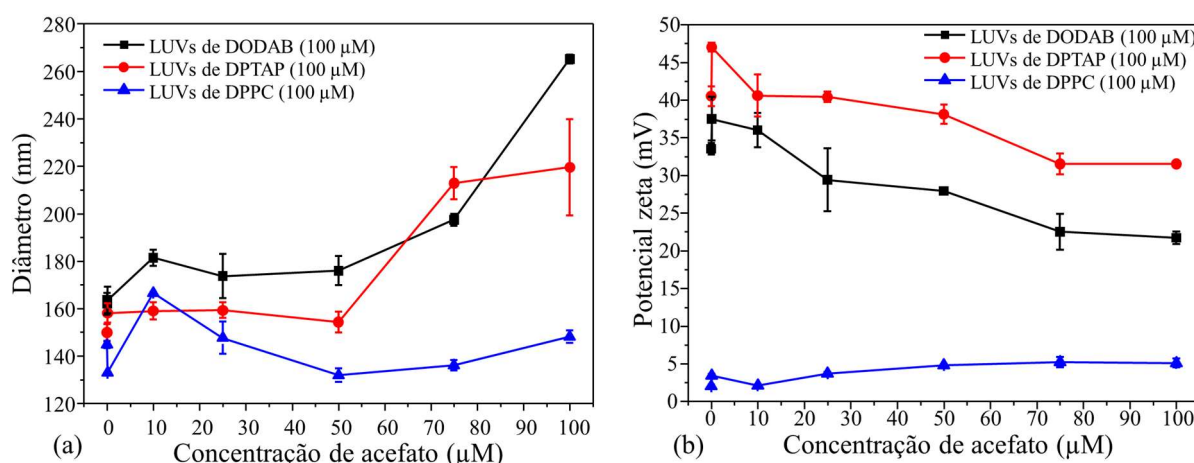


Figura 36: (a) diâmetros e (b) valores de potencial zeta das LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC em diferentes concentrações de acefato.

Inicialmente, nota-se que em concentrações de acefato menores que 75 μM os valores de diâmetro (Figura 36-a) e potencial zeta (Figura 36-b) das vesículas permanecem relativamente estáveis, sendo que alterações significativas desses parâmetros nas LUVs de DODAB e DPTAP são observadas na presença do pesticida nas concentrações de 75 e 100 μM . À medida que o diâmetro das vesículas catiônicas aumenta, os valores de potencial zeta diminuem, apontando para uma aproximação das moléculas de acefato nas LUVs de DODAB

e DPTAP. A Tabela 4 mostra os valores de diâmetro, PdI (*polydispersity index* – índice de polidispersividade) e potencial zeta referentes aos gráficos da Figura 36 a fim de uma melhor avaliação dos resultados.

Tabela 4: diâmetro, PdI e potencial zeta de LUVs de DODAB, DPTAP e DPPC em diferentes concentrações de acefato

Concentração de acefato (μM)	LUVs de DODAB (100 μM)		LUVs de DPTAP (100 μM)		LUVs de DPPC (100 μM)	
	Diâmetro (nm)/PdI	Pot. Zeta (mV)	Diâmetro (nm)/PdI	Pot. Zeta (mV)	Diâmetro (nm)/PdI	Pot. Zeta (mV)
0,0	162 $\pm$ 5/0,209	33,5 $\pm$ 0,8	150 $\pm$ 4/0,133	41 $\pm$ 1	145 $\pm$ 1/0,075	2,0 $\pm$ 0,2
0,1	164 $\pm$ 6/0,196	38 $\pm$ 3	158 $\pm$ 4/0,149	47,0 $\pm$ 0,6	132,9 $\pm$ 0,4/0,057	3,4 $\pm$ 0,2
10,0	182 $\pm$ 4/0,193	36 $\pm$ 2	159 $\pm$ 4/0,148	41 $\pm$ 3	166,5 $\pm$ 0,4/0,114	2,1 $\pm$ 0,1
25,0	174 $\pm$ 9/0,182	29 $\pm$ 4	159 $\pm$ 3/0,142	40,4 $\pm$ 0,7	148 $\pm$ 7/0,127	3,7 $\pm$ 0,2
50,0	176 $\pm$ 6/0,131	27,9 $\pm$ 0,3	154 $\pm$ 4/0,161	38 $\pm$ 1	132 $\pm$ 3/0,072	4,8 $\pm$ 0,2
75,0	197 $\pm$ 3/0,132	23 $\pm$ 2	213 $\pm$ 7/0,202	33 $\pm$ 1	136 $\pm$ 2/0,082	5,2 $\pm$ 0,7
100,0	265 $\pm$ 2/0,196	21,7 $\pm$ 0,8	220 $\pm$ 20/0,192	31,5 $\pm$ 0,4	148 $\pm$ 3/0,119	5,1 $\pm$ 0,6

Com relação aos diâmetros apresentados na Tabela 4, nota-se que, com exceção das LUVs de DODAB e DPPC na presença de acefato na concentração de 10 μM , os valores não sofrem mudanças significativas quando avaliados na presença do pesticida em concentrações menores que 75 μM em comparação com as vesículas na ausência do analito. Comparando o diâmetro das vesículas dos três lipídios na ausência de acefato e na presença do mesmo na concentração de 50 μM , observa-se um aumento de 8,6 % para LUVs de DODAB e de 3 % para o DPTAP e uma diminuição de 8,9 % nas LUVs de DPPC. Há um aumento significativo de tamanho das LUVs de DODAB e DPTAP na presença do pesticida nas concentrações de 75

e 100 μM , o que não é observado nas vesículas de DPPC, que não possuem alteração significativa nos valores ao aumentar a concentração de acefato no meio. Para o DODAB, os valores alteram de 162 ± 5 nm (ausência do pesticida) para 197 ± 3 (concentração de acefato em 75 μM) e 265 ± 2 nm (concentração de acefato em 100 μM), aumentos, em porcentagem, de 22 e 64 %, respectivamente. Já para o DPTAP os diâmetros aumentaram em 42 % (75 μM de acefato) e 46 % (100 μM de acefato) do valor referente às vesículas na ausência do pesticida (150 ± 4 nm). A variação do diâmetro para maiores valores indica que o acefato pode estar adsorvido nas LUVs catiônicas, embebida entre as cabeças polares [139].

Com relação aos valores de potencial zeta, as LUVs de DODAB e DPTAP apresentam cargas positivas, enquanto as de DPPC possuem valores mais neutros, o que já era esperado [140,141]. Na presença de acefato, é importante notar que há mudanças significativas para as maiores concentrações do pesticida (75 e 100 μM), semelhante ao observado nos valores de diâmetro. Outra semelhança é a ausência de mudanças observadas nas LUVs de DPPC, sendo que apenas os valores de potencial zeta das vesículas catiônicas (DODAB e DPTAP) se alteram. Nesse sentido, há uma diminuição da carga superficial dessas vesículas na presença de acefato nas duas maiores concentrações. O potencial zeta das LUVs de DODAB diminui de $33,5 \pm 0,8$ mV (na ausência de acefato) para 23 ± 2 (75 μM de acefato) e $21,7 \pm 0,8$ mV (100 μM de acefato), 33 e 35 % menos positivos, respectivamente. A carga superficial das vesículas de DPTAP diminui em 20 e 22 % quando na presença do pesticida nas concentrações de 75 e 100 μM , respectivamente. Tais mudanças indicam a aproximação entre o pesticida e as LUVs, possivelmente devido à atração eletrostática entre as vesículas positivas e a porção negativa do acefato. A leve neutralização do potencial zeta poderia também induzir a uma agregação das vesículas, refletindo no aumento de tamanho das mesmas [142]. No entanto, como os valores de PDI estão em torno de 0,2 ou menos, indicando que as amostras são monodispersas com uma distribuição uniforme dos tamanhos, a agregação é descartada [143]. Os resultados revelam que

há interações entre o pesticida acefato e as LUVs de DODAB e DPTAP (catiônicas), principalmente quando as concentrações do analito e das vesículas são próximas ou iguais. Nesse sentido, uma hipótese mais provável é que as moléculas de acefato adsorvem nas cabeças positivas dos lipídios, diminuindo a carga superficial das vesículas e aumentando o tamanho das mesmas.

Sabe-se que as membranas biológicas possuem uma característica fluida, com domínios mais ordenados distribuídos em suas estruturas, conhecidos como *lipid rafts*, formados principalmente por esfingolipídios e colesterol. Estes domínios têm como função regular a polaridade da célula e o tráfego vesicular, além de servirem como vias de sinalização que afetam diversos processos biológicos da estrutura [144]. Os estudos realizados com as vesículas formadas pelos lipídios até então apresentados carecem de uma mimetização mais realística em relação à fluidez da membrana, pois encontram-se em fase gel na temperatura ambiente. Portanto, a fim de obter um resultado mais próximo ao visto nas membranas celulares dos mamíferos, os experimentos em vesículas foram realizados utilizando o lipídio POPC, uma vez que este encontra-se na fase líquido-desordenada [28] em temperatura ambiente, garantindo sua fluidez. Ressaltamos também o estudo complementar realizado com as monocamadas de POPC, a fim de compará-los aos resultados obtidos para os outros lipídios explorados aqui.

5.8 Monocamadas e bicamadas de POPC: estudo de fluidez

A Figura 37 mostra as triplicatas de isothermas π -A de POPC na ausência e presença de acefato (Figura 37-a), bem como o módulo de compressibilidade das respectivas monocamadas (Figura 37-b). É importante frisar que, como discutido anteriormente, não houve mudanças significativas nos efeitos observados nas monocamadas de DODAB e DPTAP devido ao aumento da concentração de acefato na subfase (Figuras 16 e 17, respectivamente), portanto foi

escolhida a menor concentração do pesticida (10^{-4} mol/L) para realizar os experimentos com o POPC.

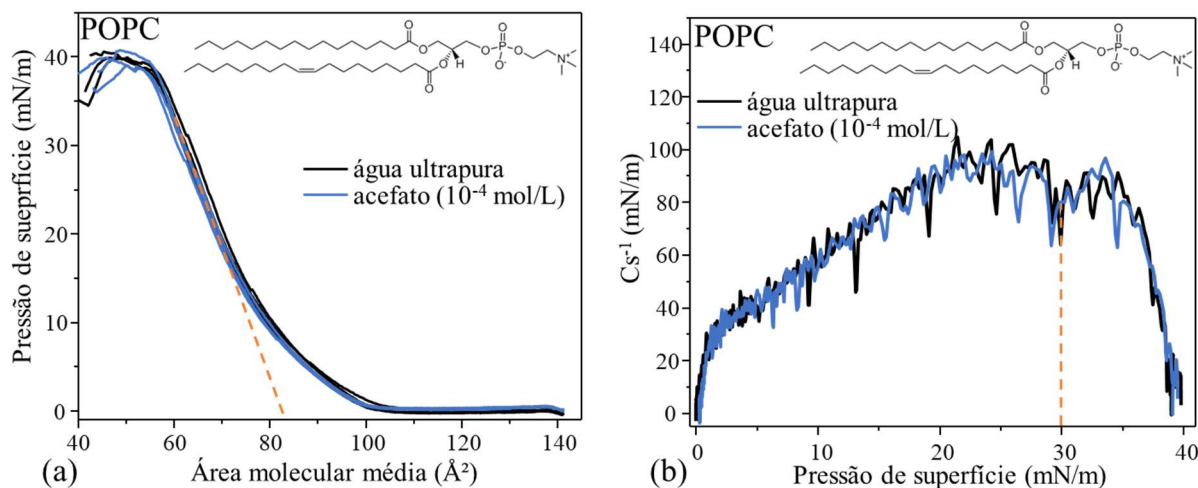


Figura 37: (a) isothermas π -A de POPC na ausência (linha preta) e presença (linha azul) de acefato (10^{-4} mol/L); (b) módulo de compressibilidade das monocamadas de POPC na ausência (em preto) e presença (em azul) do pesticida. A linha tracejada em laranja na Figura 37-a remete à área extrapolada referente à pressão de 30 mN/m. Já na Figura 37-b, tal traço indica a mesma pressão para a análise.

Primeiramente, nota-se que a monocamada de POPC em água ultrapura (Figura 37-a, linhas pretas) condiz com resultados da literatura [145–147], tendo sua área extrapolada referente à pressão de 30 mN/m (tracejado laranja) no valor médio de $84 \pm 1 \text{ \AA}^2$ e a pressão de colapso média em aproximadamente 40 mN/m. Nenhuma diferença significativa ocorreu na presença do acefato na subfase (linhas azuis), uma vez que o perfil da isothermas π -A, bem como valores de área extrapolada e pressão de colapso permanecem similares. Ao analisarmos o módulo de compressibilidade do mesmo (Figura 37-b), nota-se que o valor de C_s^{-1} é igual para as monocamadas do fosfolípido na ausência e na presença de acefato (10^{-4} mol/L), sendo os valores iguais a 81 mN/m na pressão de superfície de 30 mN/m. Logo, ambas as monocamadas se encontram na fase líquido-expandida [116]. A fim de uma melhor análise em questão de efeitos nas isothermas π -A de POPC na presença de acefato, foi realizada a projeção IDMAP do

mesmo. A Figura 38 mostra tal projeção do lipídio em comparação com os dispostos na Figura 21. A região dos pontos do POPC foi ampliada para facilitar a visualização.

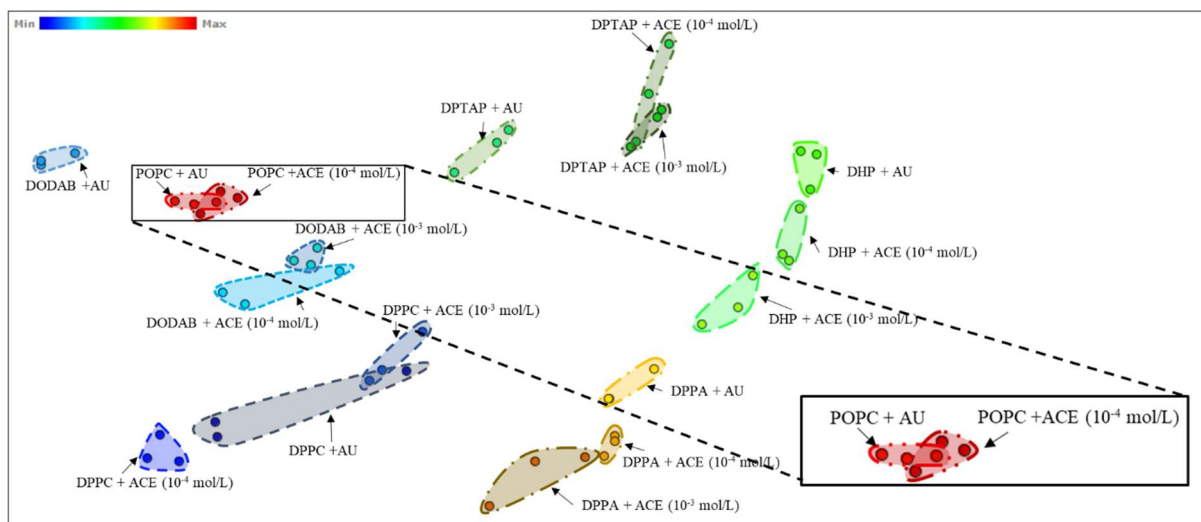


Figura 38: projeção IDMAP das triplicatas das isothermas π -A do lipídio POPC na presença e ausência de acefato (10^{-4} mol/L) em comparação às projeções dos lipídios DODAB, DPTAP, DHP, DPPA e DPPC na ausência e presença de acefato (10^{-4} e 10^{-3} mol/L). Cada conjunto (*cluster*) remete a uma triplicata de resultados. AU: subfase de água ultrapura. ACE: subfase de solução de acefato. Ampliação: região dos clusters de POPC.

Nota-se, pela Figura 38, que os pontos referentes às isothermas π -A de POPC possuem grande reprodutibilidade para as monocamadas tanto em água ultrapura (POPC + AU) quanto para a presença de acefato na concentração de 10^{-4} mol/L (POPC + ACE 10^{-4} mol/L). Além disso, os *clusters* sobrepostos reforçam que o pesticida não promove efeitos significativos nos filmes de Langmuir de POPC.

A fim de se estudar as mudanças morfológicas de bicamadas lipídicas que se encontram em fase fluida, GUVs de POPC foram analisadas por meio de microscopia por contraste de fase na ausência e presença do pesticida ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L). A Figura 39 mostra essas estruturas em triplicatas nos tempos de 0, 15 e 30 minutos.

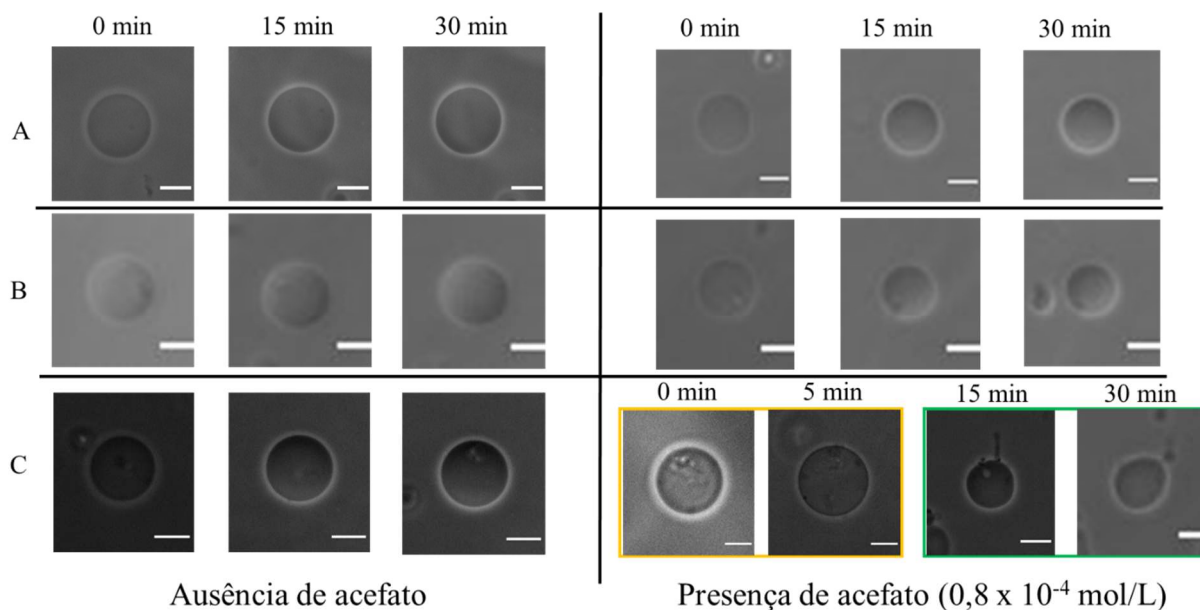


Figura 39: GUVs de POPC na ausência (esquerda) e presença (direita) de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L). Cada linha corresponde à uma formação (A- primeira; B- segunda; e C- terceira formação). A barra de escala equivale a $10 \mu\text{m}$. Os destaques em amarelo e verde (linha C, presença de acefato) remetem a duas GUVs diferentes, uma vez que a primeira perdeu o contraste de fase em cerca de 5 minutos de observação.

Observa-se inicialmente que as GUVs de POPC na ausência de acefato (à esquerda) possuem o formato esférico já esperado [148,149]. O contraste de fase em todas as medidas A, B e C também permanecem até o final da observação. Na presença do pesticida ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L), apenas a GUV do experimento C foi afetada, sendo que a primeira perdeu o contraste de fase nos primeiros 5 minutos de observação e a segunda, que começou a ser visualizada em 15 minutos, já possuía a presença de protruções [149], permanecendo assim até o fim da aquisição dos vídeos. Como dito anteriormente, faz-se necessária uma contagem das GUVs total e a comparação, em porcentagem, de quantas foram afetadas. A Figura 40 mostra tal análise para as vesículas gigantes de POPC.

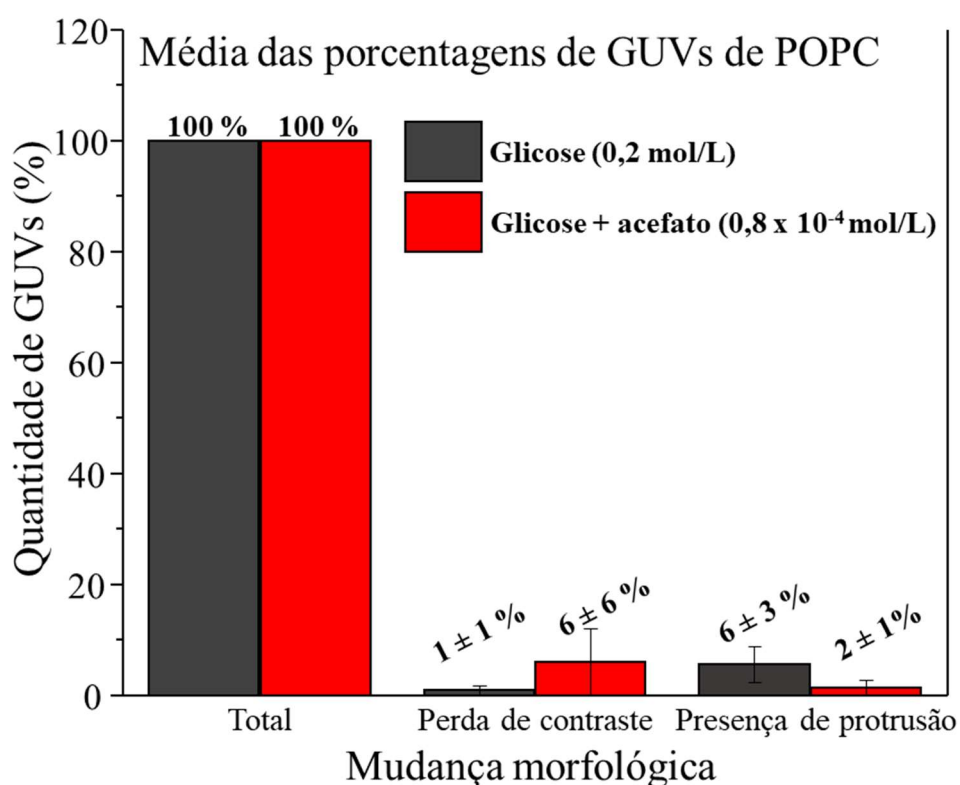


Figura 40: análise quantitativa (em média de porcentagem) das GUVs de POPC na ausência (barra cinza) e presença de acefato ($0,8 \times 10^{-4}$ mol/L – barra vermelha). Cada conjunto de barras cinza/vermelha corresponde a um conjunto de GUVs sendo: total, perda de contraste de fase e presença de protrusão.

Por meio da Figura 40, nota-se que, assim como para os outros lipídios, há a presença de GUVs sem o contraste de fase e com protrusões mesmo na ausência do pesticida para o POPC. Já na presença do analito, as porcentagens de GUVs sem contraste de fase aumentam de 1 ± 1 % para 6 ± 6 %. Tal mudança, porém, não é suficiente para determinar mudanças morfológicas significativas observáveis por microscópio, uma vez que remetem a apenas uma das formações das triplicatas.

Em resumo, tanto para as monocamadas quanto para as bicamadas de POPC (fosfolipídio zwitteriônico insaturado), o pesticida na concentração de $0,8 \times 10^{-4}$ mol/L não afetou os sistemas miméticos, revelando que em questão de estruturas mais fluidas, sejam elas

mono ou bicamadas, não há diferença em comparação com fosfolipídios zwitteriônicos saturados (DPPC).

Capítulo 6

Conclusões

Capítulo 6 – Conclusões

Foram observados efeitos do pesticida acefato em isothermas π -A de DODAB e DPTAP, deslocando a área extrapolada referente à pressão de 30 mN/m para menores valores em ambas as concentrações do analito. Além disso, um aumento na pressão de colapso para o DODAB e o DPTAP indica que a atração do acefato preferencialmente por cargas positivas também estabiliza a monocamada. Os módulos de compressibilidade revelam um aumento significativo para as medidas referentes aos lipídios DODAB e DPTAP. Tais mudanças indicam que o pesticida promove o empacotamento das monocamadas, tornando as mesmas mais rígidas. Os espectros de PM-IRRAS indicam interação íon-dipolo com a cabeça positiva dos lipídios DODAB, DPTAP e DPPC. Além disso, há um ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos do DPTAP quando na presença do pesticida em relação à monocamada na ausência do mesmo. Com relação ao DPPC, o acefato também afeta a porção negativa (fosfato) da cabeça, além de aumentar a desordem das cadeias hidrofóbicas. Os resultados de cálculo teórico corroboram com o fato de que o acefato interage, por meio de interação eletrostática, com as regiões positivas dos lipídios, uma vez que possui uma alta densidade eletrônica (altamente reativa) próxima ao átomo de oxigênio. Além disso, há carga positiva distribuída ao longo da molécula do pesticida, indicando que o mesmo pode interagir com o fosfato no caso do DPPC, porém de forma menos localizada. Para os lipídios DHP e DPPA (cabeças negativamente carregadas), sugere-se que o acefato encontra-se sob a monocamada, sem modificar as isothermas π -A das mesmas. As imagens de BAM revelam que as morfologias das monocamadas de DODAB e DPTAP são alteradas na presença do pesticida. Para ambos, os domínios lipídicos se tornam

menores, mais arredondados e mais espaçados entre si, principalmente para o DPTAP. Tal mudança indica a redução da repulsão eletrostática entre as moléculas do lipídio promovida pela aproximação entre moléculas de acefato e as regiões positivas das moléculas de DODAB ou DPTAP presentes na interface ar/água. Entretanto, a morfologia das monocamadas de DPPC na presença de acefato (10^{-4} mol/L) não revela mudanças significativas em comparação à monocamada em água ultrapura.

Com relação às bicamadas lipídicas, nenhuma mudança morfológica foi observada nas GUVs de DODAB, DPTAP ou DPPC na presença do pesticida. Porém, os estudos de DLS e potencial zeta das LUVs dos lipídios indicam que o acefato afeta as vesículas de DODAB e DPTAP, principalmente quando em concentrações próximas ou iguais as da suspensão lipídica. A diminuição da carga superficial dessas vesículas indica a adsorção do pesticida nas cabeças polares, promovendo o aumento do diâmetro das mesmas. Para os estudos realizados com o fosfolipídio POPC, nenhum efeito foi observado na presença de acefato (10^{-4} mol/L), sejam eles em mono ou bicamadas, resultado da maior fluidez destas estruturas lipídicas.

Apesar de não serem observadas mudanças significativas nas monocamadas e bicamadas formadas por fosfolipídios zwitteriônicos, presentes na membrana celular dos mamíferos, foi constatada a interação eletrostática entre o acefato e as cargas positivas dos lipídios. No geral, o pesticida interage preferencialmente com as cargas positivas do DODAB e do DPTAP (catiônicos), e DPPC (zwitteriônicos). Também com o último, há interação com a porção negativa da cabeça polar. Portanto, uma perspectiva a ser explorada é o estudo da interação do acefato com biomoléculas de caráter catiônico ou com grupos positivos espacialmente definidos, como as porções positivas dos aminoácidos presentes na acetilcolinesterase, por exemplo, uma vez que na literatura há trabalhos que consideram a interação eletrostática do acefato como possível mecanismo de inibição desta enzima, a qual está presente em insetos, mas também em humanos.

Referências

- [1] R.W.R. Filho, R. Luvizotto-Santos, E.M. Vieira, Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos, *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* 2 (2007) 283–288. <https://doi.org/10.5132/jbse.2007.03.012>.
- [2] F. B.S., O que são Contaminantes Emergentes?, (2018). <https://www.saneamentobasico.com.br/contaminantes-emergentes/> (accessed October 1, 2019).
- [3] I. Ivanov, Poluentes emergentes: mais um desafio para o meio ambiente, (2018). <https://limnonews.wordpress.com/2018/04/05/poluentes-emergentes-mais-um-desafio-para-o-meio-ambiente/> (accessed October 1, 2019).
- [4] L.X. Nascimento, R.T. Araújo, L.D.G. Alvarez, Contaminantes Orgánicos Emergentes : Impactos y Soluciones para la Salud Humana y el Medio Ambiente, *RECyT.* 17 (2015) 28–34.
- [5] J.O.M. Menten, M.C. Canale, H.A. Calaça, D. Flôres, M. Menten, Legislação ambiental e uso de defensivos agrícolas, *Citrus Res. Technol.* 32 (2011) 109–120. <https://doi.org/10.5935/2236-3122.20110013>.
- [6] G1, Brasil é o país que mais consome agrotóxicos no mundo, (2017). <https://g1.globo.com/bemestar/noticia/brasil-e-o-pais-que-mais-consome-agrotoxicos-no-mundo.ghtml> (accessed January 11, 2018).
- [7] I.P. Monteiro, Revolução Verde : reflexões acerca da questão dos agrotóxicos, 1 (2016) 2–25.
- [8] C. Campanhola, W. Bettiol, Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário, in: C. Campanhola, W. Bettiol (Eds.), Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna - SP, 2003: p. 279.
- [9] Y. Vasconcelos, Agrotóxicos na berlinda, in: *Pesqui. Fapesp*, 217th ed., 2018: pp. 18–19.
- [10] N.M.X. Faria, A.G. Fassa, L.A. Facchini, Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos, *Cien. Saude Colet.* 12 (2007) 25–38. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100008>.
- [11] M. da Saúde, Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, Brasília, DF, 2018. <http://portalsaude.saude.gov.br/index>.
- [12] Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Intoxicações agudas por Agrotóxicos, 2018.
- [13] I. Mangas, E. Vilanova, J. Estévez, T.C.C. França, Neurotoxic Effects Associated with Current Uses of Organophosphorus Compounds, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 809–

825. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160084>.
- [14] ANVISA, Índice monográfico: A02 - Acefato, (2017). <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A02+-+Acefato/651fe170-9e1f-409f-93a3-b31b99e426b2> (accessed October 2, 2017).
- [15] Ascom/ANVISA, Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos, (2019). http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US (accessed October 1, 2019).
- [16] V.G. Barth, A.C.B. Biazon, Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados, *Rev. Saúde E Biol.* 5 (2010) 27–33.
- [17] Instituto Nacional de Câncer (INCA), Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente, (2010) 11–12.
- [18] K. Gholivand, A.A. Ebrahimi Valmoozi, H.R. Mahzouni, S. Ghadimi, R. Rahimi, Molecular Docking and QSAR Studies: Noncovalent Interaction between Acephate Analogous and the Receptor Site of Human Acetylcholinesterase, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 6776–6785. <https://doi.org/10.1021/jf401092h>.
- [19] R. Palkhade, S. Yadav, S. Mishra, J. Muhamed, Acute oral toxicity of pesticide combination (acephate 50% and imidacloprid 1.8% as active ingredients) in Sprague-Dawley rats, *Vet. World.* 11 (2018) 1291–1297. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1291-1297>.
- [20] E.D.C. Petronilha, A.C. Pintob, J.D.F. Villara, Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química, *Ciência e Tecnol.* (2011) 3–14. http://rmct.ime.eb.br/arquivos/revistas/RMCT_3_tri_2011.pdf#page=5.
- [21] S. Ghadimi, S.L. Mousavi, Z. Rahn timer, M. Rahimi, Synthesis and Characterization of O,S-Dimethylphosphoramidothioate and N-Acetyl O,S-Dimethylphosphoramidothioate, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* 185 (2010) 347–354. <https://doi.org/10.1080/10426500902797079>.
- [22] Assessoria de comunicação (ASCOM) - ANVISA, Agrotóxico acefato terá regras mais restritas, (2013). http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/agrotoxico-acefato-tera-regras-mais-restritas/219201?inheritRedirect=false (accessed October 2, 2017).
- [23] ANVISA, Programa de análise de resíduos agrotóxicos em alimentos (PARA) -

- Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015, 2016.
- [24] ANVISA, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018, Agência Nac. Vigilância Sanitária. (2019) 136. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [25] L.M. Bombardi, GEOGRAFIA DO USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E CONEXÕES COM A UNIÃO EUROPEIA, 1st ed., São Paulo, SP, 2017.
- [26] G. Karp, The Structure and Function of the Plasma Membrane, in: Cell Mol. Biol. Concepts Exp., 7th ed., Wiley, 2013: pp. 120–177.
- [27] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, J. Wilson, T. Hunt, Biologia molecular da célula, 6th ed., Artmed, Porto Alegre, RS, 2017.
- [28] N. Kučerka, M.P. Nieh, J. Katsaras, Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 2761–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.022>.
- [29] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*. 387 (1997) 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- [30] I. Langmuir, THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS., *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>.
- [31] I. Langmuir, THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS. 1, *J. Am. Chem. Soc.* 39 (1917) 1848–1906. <https://doi.org/10.1021/ja02254a006>.
- [32] M.C. Petty, Langmuir-Blodgett films: an introduction, 1st ed., Press Syndicate of the University of Cambridge, Melbourne, Australia, 1996.
- [33] R. A. Hann, Langmuir-Blodgett Films, A Division of Plenum Publishing Corporation, New York, 1990.
- [34] M. Ferreira, W. Caetano, R. Itri, M. Tabak, O.N. Oliveira Jr., Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB), *Quim. Nova*. 28 (2005) 502–510. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300024>.
- [35] S.A. Camacho, Síntese de nanopartículas de ouro para amplificação do espalhamento Raman (SERS) e da fluorescência (SEF) visando aplicações sensoriais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2018.

- [36] J.V.N. Ferreira, S.D.S. Grecco, J.H.G. Lago, L. Caseli, Ultrathin films of lipids to investigate the action of a flavonoid with cell membrane models, *Mater. Sci. Eng. C*. 48 (2015) 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.061>.
- [37] J.W. Sammon, Nonlinear Mapping Structure Analysis, *Ieee Trans. Comput.* 18 (1969) 401–409.
- [38] F.V. Paulovich, Mapeamento de dados multi-dimensionais - integrando mineração e visualização, Universidade de São Paulo (USP), 2008. http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/55/55134/tde-04032009-145018/publico/tese_paulovich.pdf.
- [39] P.H.B. Aoki, Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2014.
- [40] R.J.G. Rubira, Detecção do herbicidas Atrazina e Prometrina via Espalhamento Raman Amplificado em Superfície (SERS), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2016.
- [41] F.V. Paulovich, R. Minghim, HiPP: A Novel Hierarchical Point Placement Strategy and its Application to the Exploration of Document Collections, *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 14 (2008) 1229–1236. <https://doi.org/10.1109/TVCG.2008.138>.
- [42] R.J.G. Rubira, S.A. Camacho, P.H.B. Aoki, M.D. Maximino, P. Alessio, C.S. Martin, O.N. Oliveira, F.M. Fatore, F. V. Paulovich, C.J.L. Constantino, Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization, *Colloid Polym. Sci.* 292 (2014) 2811–2820. <https://doi.org/10.1007/s00396-014-3332-7>.
- [43] D. Blaudez, T. Buffeteau, J.C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, M. Turllet, Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 869–874.
- [44] H. Nakahara, S. Lee, O. Shibata, Specific interaction restrains structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems: An in situ PM-IRRAS investigation, *BBA - Biomembr.* 1798 (2010) 1263–1271. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.018>.
- [45] Biolin Scientific, PM-IRRAS (FTIR), (2016). <http://www.biolinscientific.com/product/pm-irras/> (accessed October 2, 2017).
- [46] M.D. Maximino, Interação entre modelos de membrana biológica e poluentes emergentes, Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Presidente Prudente, 2018.

- [47] G.M. Stunges, C.S. Martin, G.C.M. Ruiz, O.N. Oliveira, C.J.L. Constantino, P. Alessio, Interaction between 17 α -ethynylestradiol hormone with Langmuir monolayers: The role of charged headgroups, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 158 (2017) 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.034>.
- [48] R. Mendelsohn, G. Mao, C.R. Flach, Infrared reflection-absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798 (2010) 788–800. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.024>.
- [49] A.H. Kycia, Z.F. Su, C.L. Brosseau, J. Lipkowski, In Situ PM-IRRAS Studies of Biomimetic Membranes Supported at Gold Electrode Surfaces, *Vib. Spectrosc. Electrified Interfaces*. (2013) 345–417. <https://doi.org/10.1002/9781118658871.ch11>.
- [50] L. Frederico, Planejamento racional no desenvolvimento de novos derivados de chalcona como agentes anti-Candida albicans, 2012.
- [51] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, Conceptual Density Functional Theory, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1793–1874. <https://doi.org/10.1021/cr990029p>.
- [52] W. Yang, W.J. Mortier, The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5708–5711. <https://doi.org/10.1021/ja00279a008>.
- [53] E.G. Lewars, *Computational Chemistry*, 2nd ed., Springer Netherlands, Dordrecht, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3862-3>.
- [54] F. Neese, F. Wennmohs, D. Aravena, M. Atanasov, U. Becker, D. Bykov, V.G. Chilkuri, D. Datta, A.K. Dutta, D. Ganyushin, Y. Guo, A. Hansen, L. Huntington, R. Izsák, C. Kollmar, S. Kossmann, M. Krupicka, D. Lenk, D.G. Liakos, D. Manganas, D.A. Pantazis, T. Petrenko, P. Pinski, C. Reimann, M. Retegan, C. Riplinger, T. Risthaus, M. Roemelt, M. Saitow, B. Sandhöfer, I. Schapiro, K. Sivaligam, G. Stoychev, B. Wezislá, M. Kállay, S. Grimme, E. Valeev, G. Chan, J. Pittner, M. Brehm, G. Bistoni, W. Schneider, Orca - an ab initio, DFT and semiempirical SCF-MO package - Version 4.0.1, (n.d.).
- [55] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, X. Nakatsuji, H.; Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J. V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, N. Gao, J.; Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J.

- Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. Montgomery, J. A., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian 16, Revision C.01, (2016). <http://gaussian.com/> (accessed September 1, 2020).
- [56] D. Hoenig, D. Moebius, Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 4590–4592. <https://doi.org/10.1021/j100165a003>.
- [57] K.A. Riske, Comportamento térmico peculiar de dispersões aquosas do fosfolípido aniônico DMPG, Universidade de São Paulo, Instituto de Física, 2001.
- [58] S. Dutt, P.F. Siril, S. Remita, Swollen liquid crystals (SLCs): a versatile template for the synthesis of nano structured materials, *RSC Adv.* 7 (2017) 5733–5750. <https://doi.org/10.1039/C6RA26390A>.
- [59] A. Sharma, Liposomes in drug delivery: Progress and limitations, *Int. J. Pharm.* 154 (1997) 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X).
- [60] B. Maherani, E. Arab-Tehrany, M. R. Mozafari, C. Gaiani, M. Linder, Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies, *Curr. Nanosci.* 7 (2011) 436–452. <https://doi.org/10.2174/157341311795542453>.
- [61] R. Jelinek, S. Kolusheva, Membrane Interactions of Host-defense Peptides Studied in Model Systems, *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (2005) 103–114. <https://doi.org/10.2174/1389203053027511>.
- [62] Y.P. Patil, S. Jadhav, Novel methods for liposome preparation, *Chem. Phys. Lipids.* 177 (2014) 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>.
- [63] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 303. <https://doi.org/10.1039/dc9868100303>.
- [64] A. Weinberger, F.C. Tsai, G.H. Koenderink, T.F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.* 105 (2013) 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.024>.
- [65] L.S. Martins, D.A. Nomura, E.L. Duarte, K.A. Riske, M.T. Lamy, J.H.K. Rozenfeld, Structural characterization of cationic DODAB bilayers containing C24:1 β -glucosylceramide, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861 (2019) 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.018>.

- [66] H. Stein, S. Spindler, N. Bonakdar, C. Wang, V. Sandoghdar, Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations, *Front. Physiol.* 8 (2017) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00063>.
- [67] C. Chatgililoglu, C. Ferreri, M. Ballestri, Q.G. Mulazzani, L. Landi, cis-trans Isomerization of monounsaturated fatty acid residues in phospholipids by thiyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 4593–4601. <https://doi.org/10.1021/ja994169s>.
- [68] A. Seelig, J. Seelig, Effect of a Single Cis Double Bond on the Structure of a Phospholipid Bilayer, *Biochemistry.* 16 (1977) 45–50. <https://doi.org/10.1021/bi00620a008>.
- [69] M. Eeman, M. Deleu, From biological membranes to biomimetic model membranes, *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 14 (2010) 719–736.
- [70] M. Abramowitz, M.W. Davidson, Introduction to Phase Contrast, (2012). <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phase.html> (accessed June 19, 2017).
- [71] M.B. Barioni, Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti-Leishmania miltefosina, Universidade de São Paulo - USP, 2014.
- [72] W.M. Pazin, Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo, Universidade de São Paulo - USP, 2012.
- [73] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.* 8 (2016) 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- [74] G.L. PLAUTZ, Caracterização Óptica E Estrutural De Pontos Quânticos a Base De Silício Obtidos Por Ablação a Laser Em Água, Universidade do Paraná, 2016.
- [75] R.M.A. Cessa, Atributos físicoquímicos e adsorção de fósforo na fração argila de latossolos vermelhos em presença de ácido fúlvico, Universidade Federal da Grande Dourados, 2008.
- [76] M. Freire, M.M. Domingues, J. Matos, M.N. Melo, A.S. Veiga, N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 481–487. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0661-4>.
- [77] R. Lipowsky, E. Sackmann, *Handbook of Biological Physics*, Amsterdã, 1995.
- [78] M.M. Wright, A.G. Howe, V. Zaremborg, Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues, *Biochem. Cell Biol.* 82 (2004) 18–26. <https://doi.org/10.1139/o03-092>.

- [79] S.E. Horvath, G. Daum, Lipids of mitochondria, *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>.
- [80] G. van Meer, A.I.P.M. de Kroon, Lipid map of the mammalian cell, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.
- [81] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238–IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- [82] C. Billerit, I. Wegrzyn, G.D.M. Jeffries, P. Dommersnes, O. Orwar, A. Jesorka, Heat-induced formation of single giant unilamellar vesicles, *Soft Matter.* 7 (2011) 9751. <https://doi.org/10.1039/c1sm05444a>.
- [83] T. Bhatia, P. Husen, J. Brewer, L.A. Bagatolli, P.L. Hansen, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848 (2015) 3175–3180. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.020>.
- [84] PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acephate>, Acephate, (2005). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acephate#section=Top> (accessed January 11, 2018).
- [85] J. Nam, T.K. Vanderlick, P.A. Beales, Formation and dissolution of phospholipid domains with varying textures in hybrid lipo-polymersomes, *Soft Matter.* 8 (2012) 7982. <https://doi.org/10.1039/c2sm25646k>.
- [86] L. Hammarstrom, I. Velikian, G. Karlsson, K. Edwards, Cryo-TEM Evidence: Sonication of Dihexadecyl Phosphate Does Not Produce Closed Bilayers with Smooth Curvature, (1995) 408–410.
- [87] M. Khvedelidze, T. Mdzinashvili, E. Shekiladze, M. Schneider, D. Moersdorf, Structure of drug delivery DPPA and DPPC liposomes with ligands and their permeability through cells, 2104 (2014) 1–12. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.911316>.
- [88] A.E. Regelin, S. Fankhaenel, L. Grtesch, C. Prinz, G. von Kiedrowski, U. Massing, Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1464 (2000) 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00126-7).
- [89] E. Feitosa, P.C.A. Barreleiro, G. Olofsson, Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods, 105 (2000) 201–213.

- [90] K.L. Koster, M.S. Webb, G. Bryant, D. V. Lynch, Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1193 (1994) 143–150. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90343-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90343-3).
- [91] A. Tsanova, A. Jordanova, T. Dzimbova, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev, Interaction of methionine–enkephalins with raft-forming lipids: monolayers and BAM experiments, *Amino Acids.* 46 (2014) 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1647-1>.
- [92] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623–11627. <https://doi.org/10.1021/j100096a001>.
- [93] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200–1211. <https://doi.org/10.1139/p80-159>.
- [94] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B.* 37 (1988) 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- [95] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
- [96] T. Yanai, D.P. Tew, N.C. Handy, A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP), *Chem. Phys. Lett.* 393 (2004) 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.06.011>.
- [97] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum Mechanical Continuum Solvation Models, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2999–3094. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [98] F. Neese, The ORCA program system, *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2 (2012) 73–78. <https://doi.org/10.1002/wcms.81>.
- [99] R.A. Maia, G. Ventrone, A. Batagin-Neto, Reactivity of lignin subunits: the influence of dehydrogenation and formation of dimeric structures, *J. Mol. Model.* 25 (2019) 228. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4130-4>.
- [100] G.G.B. Alves, F.C. Lavarda, C.F.O. Graeff, A. Batagin-Neto, Reactivity of eumelanin building blocks: A DFT study of monomers and dimers, *J. Mol. Graph. Model.* 98 (2020) 107609. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107609>.
- [101] L.E. Chirlian, M.M. Francl, Atomic charges derived from electrostatic potentials: A detailed study, *J. Comput. Chem.* 8 (1987) 894–905.

- <https://doi.org/10.1002/jcc.540080616>.
- [102] F. De Proft, C. Van Alsenoy, A. Peeters, W. Langenaeker, P. Geerlings, Atomic charges, dipole moments, and Fukui functions using the Hirshfeld partitioning of the electron density, *J. Comput. Chem.* 23 (2002) 1198–1209. <https://doi.org/10.1002/jcc.10067>.
 - [103] R.K. Roy, S. Pal, K. Hirao, On non-negativity of Fukui function indices, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 8236–8245. <https://doi.org/10.1063/1.478792>.
 - [104] S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors, *Mol. Phys.* 19 (1970) 553–566. <https://doi.org/10.1080/00268977000101561>.
 - [105] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 303. <https://doi.org/10.1039/dc9868100303>.
 - [106] A.K. de Brito, C.S.F. Nordi, L. Caseli, Polarization Modulation Reflection-Absorption Spectroscopy applied in ultrathin films of algal biomacromolecules may explain the mechanism associated to the removal of pollutant metals, *Vib. Spectrosc.* 92 (2017) 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.04.008>.
 - [107] A.K. de Brito, C.S.F. Nordi, L. Caseli, Algal polysaccharides as matrices for the immobilization of urease in lipid ultrathin films studied with tensiometry and vibrational spectroscopy: Physical–chemical properties and implications in the enzyme activity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 135 (2015) 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.033>.
 - [108] W. Probst, D. Möbius, H. Rahmann, Modulatory effects of different temperatures and Ca²⁺ concentrations on gangliosides and phospholipids in monolayers at air/water interfaces and their possible functional role, *Cell. Mol. Neurobiol.* 4 (1984) 157–176. <https://doi.org/10.1007/BF00711002>.
 - [109] K. Hąc-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, Interactions between dialkyldimethylammonium bromides (DXDAB) and sterols—a monolayer study, *J. Colloid Interface Sci.* 286 (2005) 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.01.094>.
 - [110] B. Gzyl-Malcher, M. Filek, E. Rudolphi-Skórska, A. Sieprawska, Studies of Lipid Monolayers Prepared from Native and Model Plant Membranes in Their Interaction with Zearalenone and Its Mixture with Selenium Ions, *J. Membr. Biol.* 250 (2017) 273–284. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9958-x>.
 - [111] D. Marsh, Lateral pressure in membranes, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1286 (1996) 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3).
 - [112] Q. Le, M. Ropers, H. Terrisse, B. Humbert, Interactions between phospholipids and

- titanium dioxide particles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 123 (2014) 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.010>.
- [113] W. Wang, J. Pleasants, W. Bu, R.Y. Park, I. Kuzmenko, D. Vaknin, Amorphous iron-(hydr) oxide networks at liquid/vapor interfaces: In situ X-ray scattering and spectroscopy studies, *J. Colloid Interface Sci.* 384 (2012) 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.06.024>.
- [114] T. Zhang, M.G. Cathcart, A.S. Vidalis, H.C. Allen, Cation effects on phosphatidic acid monolayers at various pH conditions, *Chem. Phys. Lipids*. 200 (2016) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.06.001>.
- [115] P.H.B. Aoki, L.F.C. Morato, F.J. Pavinatto, T.M. Nobre, C.J.L. Constantino, O.N. Oliveira, Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin, *Langmuir*. 32 (2016) 3766–3773. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00693>.
- [116] J.T. Davies, E.K. Rideal, *Interfacial Phenomena*, in: *Interfacial Phenom.*, Elsevier, 1961: p. 265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395609-5.50015-4>.
- [117] A.C.T. Teixeira, A.M.P.S. Gonçalves da Silva, A.C. Fernandes, Phase behaviour of stearic acid-stearonitrile mixtures. A thermodynamic study in bulk and at the air-water interface, *Chem. Phys. Lipids*. 144 (2006) 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.09.001>.
- [118] L.T. Gew, M. Misran, Albumin-fatty acid interactions at monolayer interface, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-218>.
- [119] K. Hac-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Latka, A study of the interaction between dialkyldimethylammonium bromides and tri-n-octylphosphine oxide (topo) in mixed monolayers at the air/water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 278 (2004) 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.014>.
- [120] T.E. Goto, L. Caseli, The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition, *J. Colloid Interface Sci.* 431 (2014) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.050>.
- [121] L.S.A. Pereira, S.A. Camacho, A.A. Malfatti-Gasperini, K. Jochelavicius, T.M. Nobre, O.N. Oliveira, P.H.B. Aoki, Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 171 (2018) 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.002>.
- [122] X. Bin, S.L. Horswell, J. Lipkowski, Electrochemical and PM-IRRAS Studies of the Effect of Cholesterol on the Structure of a DMPC Bilayer Supported at an Au (111)

- Electrode Surface, Part 1: Properties of the Acyl Chains, *Biophys. J.* 89 (2005) 592–604. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058347>.
- [123] K. Sugat, J.F. Rusling, Structural Characterization of Surfactant and Clay-Surfactant Films of Micrometer Thickness by FT-IR Spectroscopy, *Langmuir*. (1993) 3649–3655. <https://doi.org/10.1021/la00036a048>.
- [124] L.S.A. Pereira, S.A. Camacho, A.A. Malfatti-gasperini, K. Jochelavicius, T.M. Nobre, O.N. Oliveira, P.H.B. Aoki, Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 171 (2018) 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.002>.
- [125] R.L. Cruz Gomes da Silva, H.F. Oliveira da Silva, L.H. da Silva Gasparotto, L. Caseli, How the interaction of PVP-stabilized Ag nanoparticles with models of cellular membranes at the air-water interface is modulated by the monolayer composition, *J. Colloid Interface Sci.* 512 (2018) 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.091>.
- [126] F. Korkmaz, F. Severcan, Effect of progesterone on DPPC membrane: Evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics, *Arch. Biochem. Biophys.* 440 (2005) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.06.013>.
- [127] R.F. Vázquez, M.A. Daza, F.J. Pavinatto, M.L. Fanani, Impact of sphingomyelin acyl chain (16 : 0 vs 24 : 1) on the interfacial properties of Langmuir monolayers : A PM-IRRAS study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 173 (2019) 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.018>.
- [128] A.M. Gonçalves da Silva, R.S. Romão, A. Lucero Caro, J.M. Rodríguez Patino, Memory effects on the interfacial characteristics of dioctadecyldimethylammonium bromide monolayers at the air–water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 270 (2004) 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2003.11.002>.
- [129] B. Gzyl-Malcher, M. Filek, G. Brezesinski, Influence of Cadmium and Selenate on the Interactions between Hormones and Phospholipids, *Langmuir*. 25 (2009) 13071–13076. <https://doi.org/10.1021/la901653y>.
- [130] M.E. Mariani, M.E. Sánchez-Borzone, D.A. García, Effects of bioactive monoterpene ketones on membrane organization. A langmuir film study, *Chem. Phys. Lipids*. 198 (2016) 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.002>.
- [131] W.M. Pazin, G.C.M. Ruiz, O.N. de Oliveira, C.J.L. Constantino, Interaction of Artepillin C with model membranes: Effects of pH and ionic strength, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861 (2019) 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.008>.
- [132] L. Zou, J. Wang, P. Basnet, E.K. Mann, Line tension and structure of smectic liquid-

- crystal multilayers at the air-water interface, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 76 (2007) 1–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.031602>.
- [133] S. Rivière, S. Hénon, J. Meunier, G. Albrecht, M.M. Boissonnade, A. Baszkin, Electrostatic pressure and line tension in a Langmuir monolayer, *Phys. Rev. Lett.* 75 (1995) 2506–2509. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.2506>.
- [134] M. Saeedimazine, A. Montanino, S. Kleiven, A. Villa, Role of lipid composition on the structural and mechanical features of axonal membranes: a molecular simulation study, *Sci. Rep.* 9 (2019) 8000. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44318-9>.
- [135] S. Attwood, Y. Choi, Z. Leonenko, Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 3514–3539. <https://doi.org/10.3390/ijms14023514>.
- [136] V. Kralj-Iglič, G. Gomišček, J. Majhenc, V. Arrigler, S. Svetina, Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 181 (2001) 315–318. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00802-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00802-5).
- [137] B. Babnik, D. Miklavčič, M. Kandušer, H. Hägerstrand, V. Kralj-Iglič, A. Iglič, Shape transformation and burst of giant POPC unilamellar liposomes modulated by non-ionic detergent C12E8, *Chem. Phys. Lipids.* 125 (2003) 123–138. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00084-7](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00084-7).
- [138] V. Šuštar, J. Zelko, P. Lopalco, S. Lobasso, A. Ota, N.P. Ulrih, A. Corcelli, V. Kralj-Iglič, Morphology, Biophysical Properties and Protein-Mediated Fusion of Archaeosomes, *PLoS One.* 7 (2012) e39401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039401>.
- [139] P. Maity, B. Saha, G. Suresh Kumar, S. Karmakar, Effect of Zwitterionic Phospholipid on the Interaction of Cationic Membranes with Monovalent Sodium Salts, *Langmuir.* 34 (2018) 9810–9817. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01792>.
- [140] G.A.T. Kaminski, M.R. Sierakowski, R. Pontarolo, R.A. De Freitas, Comparison between the interactions of the cationic surfactant DODAB with xanthan and galactomannan, *Carbohydr. Polym.* 115 (2015) 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.111>.
- [141] M.A. Morini, M.B. Sierra, V.I. Pedroni, L.M. Alarcon, G.A. Appignanesi, E.A. Disalvo, Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 131 (2015) 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.054>.

- [142] N.B. Leite, D. dos Santos Alvares, B.M. de Souza, M.S. Palma, J. Ruggiero Neto, Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia-MP1 to anionic lipid vesicles, *Eur. Biophys. J.* 43 (2014) 121–130. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0945-1>.
- [143] A.L. Rubio, M.J.F. Rovira, M.M. Sanz, L.G. Gómez-Mascaraque, eds., *NANOMATERIALS FOR FOOD APPLICATIONS*, Academic Press, an imprint of Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2019.
- [144] A.B. Ouweneel, M.J. Thomas, M.G. Sorci-Thomas, The ins and outs of lipid rafts: functions in intracellular cholesterol homeostasis, microparticles, and cell membranes, *J. Lipid Res.* 61 (2020) 676–686. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000383>.
- [145] L. Qiao, A. Ge, Y. Liang, S. Ye, Oxidative Degradation of the Monolayer of 1-Palmitoyl-2-Oleoyl- sn -Glycero-3-Phosphocholine (POPC) in Low-Level Ozone, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 14188–14199. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08985>.
- [146] K. Węder, M. Mach, K. Hąc-Wydro, P. Wydro, Studies on the interactions of anticancer drug - Minerval - with membrane lipids in binary and ternary Langmuir monolayers, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 2329–2336. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.019>.
- [147] E.J. Grasso, R.G. Oliveira, B. Maggio, Surface interactions, thermodynamics and topography of binary monolayers of Insulin with dipalmitoylphosphatidylcholine and 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine at the air/water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 464 (2016) 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.034>.
- [148] C. Toro, S.A. Sanchez, A. Zanoeco, E. Lemp, E. Gratton, G. Gunther, Solubilization of lipid bilayers by myristyl sucrose ester: effect of cholesterol and phospholipid head group size, *Chem. Phys. Lipids.* 157 (2009) 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.11.004>.
- [149] L.N. Furini, L.F.C. Morato, D.S. Olivier, M. Lemos, E. Feitosa, C.J.L. Constantino, Interactions of Lipid Polar Headgroups with Carbendazim Fungicide, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 19 (2019) 3734–3743. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16739>.