

UNESP- Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

GABRIELE MARQUES STUNGES

**ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE UM HORMÔNIO ESTRÓGENO
E MODELOS SIMPLES DE MEMBRANA BIOLÓGICA**

PRESIDENTE PRUDENTE

2015

GABRIELE MARQUES STUNGES

**ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE UM HORMÔNIO ESTRÓGENO
E MODELOS SIMPLES DE MEMBRANA BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais sob a orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

]

PRSIDENTE PRUDENTE

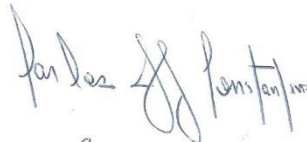
2015

S926i	<p>Stunges, Gabriele Marques. Interação entre um hormônio estrógeno e modelos simples de membrana biológica / Gabriele Marques Stunges. - Bauru: [s.n.], 2015 67 f.</p> <p>Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino Dissertação (Mestrado)–Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru</p> <p>1. 17α-etinilestradiol. 2. Filmes de Langmuir. 3. Modelos de membrana. 4. PM-IRRAS. I. Stunges, Gabriele Marques. II. Constantino, Carlos José Leopoldo. III. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências. IV. Título.</p>
-------	---

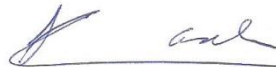
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de GABRIELE MARQUES STUNGES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 17 dias do mês de abril do ano de 2015, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro VI da Unesp de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. LUCIANO CASELI do(a) Departamento de Ciências Exatas e Da Terra / Universidade Federal de São Paulo, Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA do(a) Departamento de Física / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de GABRIELE MARQUES STUNGES, intitulada "Estudos de interação entre um hormônio estrógeno e modelos simples de membrana biológica". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado ----- . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO



Prof. Dr. LUCIANO CASELI



Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA



Dedico esse trabalho aos meus pais Roberto e Silvia, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, meu pai Roberto, minha mãe Silvia, minha irmã Isabela e meus avós Antônio, Aurea e Genia, pelo total apoio, incentivo e dedicação, por não medirem esforços para me ajudar e foram de extrema importância não somente nesta fase como em todas as fases da minha vida.

A minha tia Adriany, por toda motivação, sem todos os seus conselhos eu não teria chegado até aqui. Muito Obrigada.

Ao meu orientador Prof. Casé. Por ter aberto as portas do seu grupo, confiando em mim e em meu trabalho, mas principalmente pela sua paciência comigo. Obrigada por toda atenção e por todo aprendizado.

Aos meus amigos do grupo “NOIX”, Cibely, Sabrina, Rafael, Pedro, Léo, Priscila, João, Diego, Mateusão, Matheus, Mateusinho e Luiz. Não sei nem como agradecer, foram de extrema importância para meu trabalho, desde a parte técnica às discussões de resultados, sem contar todos momentos de descontração e amizade.

Tenho muito a agradecer também aos meus amigos de DFQB, Edilene, Carina, Rebeca, Eliane, Natália e Malú, por toda amizade, conselhos e boas risadas.

Ao Prof Eloi e seu grupo, Gisele, Renata, Monique e Lídia, ao Dr. Felipe Pavinatto, e ao Prof. Dr. Osvaldo N. Oliveira Jr. por terem aberto as portas do seu laboratório e do seu grupo, pelo apoio oferecido. Sua ajuda foi de muita importância para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao meu namorado Gustavo, por todo apoio, carinho e compreensão, por sempre estar por perto fazendo os meus dias melhores.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

Resumo

O 17α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio esteróide sintético com baixa solubilidade em água. A contaminação por esse estrogênio tem sua origem na contínua introdução em ambientes aquáticos através do descarte inadequado de esgoto sanitário e industrial, como também pelo uso do lodo ativado de estações de tratamento de esgoto na agricultura. A exposição a esse composto vem sendo associada a causas de câncer de mama, infertilidade masculina e mutações em pequenos seres vivos, como peixes, cujos efeitos podem estar associados à interação do hormônio com a membrana celular. Assim, o estudo de modelos de membrana biológica na forma de filmes de Langmuir expostos ao EE2 na subfase foi realizado com o objetivo de avaliar a interação membrana/EE2 e gerar subsídios para o desenvolvimento de sensores para detectar tais substâncias em meio aquoso (língua eletrônica). Monocamadas compostas por moléculas anfifílicas de diferentes cargas foram espalhadas sobre subfase de água ultrapura contendo o EE2, sendo a interação membrana/hormônio estudada por meio das isotermas de pressão de superfície vs. área molecular média (isotermas π -A). Neste estudo foram utilizados os fosfolipídios dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), que é zwitteriônico, dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG), que é aniônico, e o surfactante brometo de dioctadecil dimetil amônio (DODAB), que é catiônico. O ácido esteárico (AE) foi utilizado como estudo complementar para se obter um melhor entendimento sobre a interação do DPPC e do DPPG com o EE2. Todas as moléculas utilizadas como modelos de membranas apresentaram interações com o EE2, de acordo com as isotermas π -A, o que foi confirmado por espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS). Os estudos mostraram que as interações ocorrem através de interações eletrostáticas, principalmente na região polar dos lipídios, envolvendo não somente grupos catiônicos e aniônicos, como também os grupos C=O e P=O dos lipídios com os grupos OH do EE2.

Palavras chave: 1. 17α -etinilestradiol. 2. Filmes de Langmuir. 3. Modelos de membrana. 4. PM-IRRAS

Abstract

The 17 α - ethinyl estradiol (EE 2) is a synthetic steroid hormone with poor water solubility. Contamination by that estrogen has the origin in continuous introduction into aquatic environments through the improper disposal of domestic and industrial sewage, as well as the use of activated sludge wastewater treatment plants in agriculture. Exposure to this compound has been linked to breast cancer causes, male infertility and small mutations in living organisms such as fish, whose effects can be associated with the interaction of the hormone with the cell membrane. Thus, the study of membrane models in the form of Langmuir films exposed to EE2 in subphase was carried out to evaluate the interaction membrane/hormone. Monolayers composed of amphiphilic molecules with different charges were spread on ultrapure water subphase containing EE2, and the interaction membrane/hormone studied by surface pressure vs. mean molecular area isotherms (π -A isotherms). This study used the phospholipids dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC), which is zwitterionic, dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG), which is anionic, and the surfactant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DODAB), which is cationic. The stearic acid (SA) was used to obtain a better understanding of the interaction of EE2 with DPPC and DPPG. All molecules used as membrane models presented interactions with EE2, according to π -A isotherms, which was confirmed by spectroscopic reflection and absorption in the infrared polarization modulation (PM-IRRAS). The studies have shown that interactions occur through electrostatic interactions, especially in the polar region of lipids, involving not only cationic and anionic groups but also the groups C=O and P=O the lipids with OH group of EE2.

Keywords: 1. 17 α - ethinyl estradiol. 2. Langmuir. 3. Models membrane. 4. PM-IRRAS

Lista de Figuras

Figura 1: relações biossintéticas das classes de hormônios, esteróides e colesterol	19
Figura 2: representação esquemática da interação tóxica dos estrógenos com as funções coordenadas pelo sistema endócrino.....	20
Figura 3: representação da estrutura molecular do 17 α - estinilestradiol (EE2).	22
Figura 4: representação esquemática de uma membrana plasmática	24
Figura 5: a) diagrama esquemático de uma cuba de Langmuir comercial: (1) cuba de Teflon, (2) dispositivos para compressão (barreiras móveis), (3) balança de pressão (caracterização da monocamada via isothermas π -A), (4) braço mecânico (utilizado para a deposição dos filmes LB e (5) entrada/saída de água para controle da temperatura da subfase. b) representação de uma isoterma π -A com a representação esquemática das três fases de compressão até a formação dos filmes de Langmuir (estados gasoso, líquido expandido e condensado).	25
Figura 6: arranjo experimental da placa de Wilhelmy: (a) vista frontal; (b) vista lateral. Sendo: h: altura da porção da placa que se encontra submersa; L: altura da placa; w: largura da placa; θ : ângulo do menisco da água tocando a placa; t: espessura da placa.	28
Figura 7: representação das forças que atuam sobre a placa de Wilhelmy.....	28
Figura 8: estruturas moleculares do DODAB, do DPPG, do DPPC e do AE.....	33
Figura 9: isothermas π -A para os filmes de Langmuir de DODAB sobre a subfase de água ultrapura e de soluções de EE2 $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL ⁻¹ . Isothermas obtidas em triplicata. A linha pontilhada mostra a extrapolação das isothermas π -A a partir da fase condensada do filme.....	36
Figura 10: espectro PM-IRRAS para filmes de Langmuir de DODAB, obtido na pressão de compressão 30 mN.m ⁻¹ , na ausência (linha preta) e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL ⁻¹ de EE2 na subfase (linha vermelha).....	38

Figura 11: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DODAB na interface ar/água com as moléculas de EE2 presentes na subfase, na pressão 30 mN.m ⁻¹ . Na inserção encontra-se um modelo do filme de Langmuir de DODAB em subfase de água ultrapura.....	39
Figura 12: isotermas π -A para os filmes de Langmuir de DPPC sobre a subfase de água ultrapura e de soluções de EE2 com concentrações de 4,8 x 10 ⁻³ e 4,8 x 10 ⁻⁴ mg/mL. Isotermas obtidas em triplicata.....	40
Figura 13: espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC na ausência (linha preta) e na presença de 4,8 x 10 ⁻³ mg.mL ⁻¹ de EE2 na subfase (linha vermelha), obtidos nas pressões de superfície de 10 mN.m ⁻¹ (A e B) e 30 mN.m ⁻¹ (C e D).....	42
Figura 14: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DPPC na interface água/ar com as moléculas de EE2 presentes na subfase, em diferentes pressões de superfície.....	46
Figura 15: isotermas π -A para os filmes de Langmuir de ácido esteárico (AE) sobre a subfase de água ultrapura e de soluções de EE2 4,8 x 10 ⁻³ e 4,8 x 10 ⁻⁴ mg.mL ⁻¹ . Isotermas obtidas em triplicata.....	47
Figura 16: espectros de PM-IRRAS para as moléculas AE sobre a subfase de água ultrapura (linha preta) e na presença de EE2 4,8 x 10 ⁻³ mg/mL na subfase (linha vermelha). Espectros obtidos nas pressões de superfície de 10 mN.m ⁻¹ (A e B), e 30 mN.m ⁻¹ (C e D) respectivamente.....	48
Figura 17: Esquemas moleculares de um ácido graxo com conformação diferente do grupo carboxílico e conformação diferente do hidrocarboneto cadeia.....	50
Figura 18: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de AE na interface a) água/ar e b) com as moléculas de EE2 presentes na subfase nas pressões 10 e 30 mN.m ⁻¹	52

Figura 19: isotermas π -A do filme de Langmuir de DPPG na interface ar/água, na presença e na ausência de EE2 $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL ⁻¹ na subfase. Isotermas obtidas em triplicata.	53
Figura 20: espectros de PM-IRRAS para filmes de DPPG sobre a subfase de água ultrapura (linha preta) e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL ⁻¹ de EE2 na subfase (linha vermelha). Espectros obtidos nas pressões de superfície 10 mN.m ⁻¹ (A e B) e 30 mN.m ⁻¹ (C e D), respectivamente.	54
Figura 21: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DPPG na interface ar/água com as moléculas de EE2 presentes na subfase em diferentes pressões de superfície.....	58

Lista de Tabela

Tabela 1	atribuições das bandas dos espectros de PM-IRRAS obtidas para as monocamadas de DPPC na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL ⁻¹ de EE2 na subfase nas pressões 10 e 30 mN.m ⁻¹	43
Tabela 2	atribuições das bandas dos espectros de PM-IRRAS obtidas para as monocamadas de AE na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL ⁻¹ de EE2 na subfase nas pressões 10 e 30 mN.m ⁻¹	49
Tabela 3	atribuições das bandas dos espectros de PM-IRRAS obtidas para as monocamadas de DPPG na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL ⁻¹ de EE2 na subfase nas pressões 10 e 30 mN.m ⁻¹	55

Lista de Siglas

AE	Ácido esteárico
Cd	Cádmio
Cu	Cobre
DDT	Diclorodifeniltricloroetan
DODAB	Brometo de Dioctadecil dimetil amônio,
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DPPG	Dipalmitoil fosfatidilglicerol
EE2	17 α - etinilestradiol
EPA	Agência de Proteção Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
Hg	Mercúrio
LB	Langmuir – Blodgett
Pb	Chumbo
PCB	Bifenilas policloradas (<i>Polychorinated biphenyl</i>)
PM-IRRAS	Polarização modulada - espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho
VTG	Vitelogenina

Sumário

1 -	MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	16
1.1	<i>Motivação</i>	16
1.2	<i>Objetivos gerais</i>	17
1.2.1	<i>Objetivos específicos</i>	17
2-	INTRODUÇÃO	19
2.1	<i>1 7α-etinilesestradiol (EE2)</i>	19
2.2	<i>Motivação para o uso de modelos miméticos de membrana celular</i>	23
3 –	CONCEITOS TEÓRICOS	25
3.1	<i>Filmes de Langmuir</i>	25
3.2	<i>Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)</i>	30
4 –	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	<i>Materiais</i>	33
4.2	<i>Preparo das dispersões lipídicas</i>	34
4.3	<i>Técnicas de caracterização</i>	34
4.3.1	<i>Filmes de Langmuir</i>	34
4.3.2	<i>PM-IRRAS</i>	35
5 -	RESULTADOS	36
5.1	<i>Filmes de Langmuir</i>	36
5.1.1	<i>Filmes de Langmuir de DODAB</i>	36
5.1.2	<i>Filmes de Langmuir de DPPC</i>	400
5.1.2.1	<i>Filmes de AE</i>	46
5.1.3	<i>Filmes de DPPG</i>	53
6 –	CONCLUSÕES	59
	<i>Referências Bibliográficas</i>	61

I- MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Motivação

O aumento da população das cidades tem elevado a produção de esgoto residencial e industrial, os quais são comumente despejados nos córregos e rios mais próximos. Além da alta quantidade de carga orgânica despejada, hoje se sabe que nos efluentes domésticos existem inúmeras substâncias que podem atingir rios e córregos receptores. Algumas delas podem alterar várias funções do sistema endócrino e causar efeitos indesejados nos organismos expostos e nos seus descendentes (MARCANTONIO; VIEIRA, 2006).

Várias são as substâncias lançadas nos corpos hídricos, dentre elas estão os pesticidas (DDT, endulsulfan, metoxicloro), organoclorados (PCBs, dioxinas, furano), metais de transição (Hg, Cd, Pb, Cu), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), nanopartículas, plastificantes (bisfenol A, ftalatos) e produtos farmacêuticos. Alguns destes são considerados desreguladores endócrinos (YAMAMOTO, 2011). Portanto, por motivos de saúde ambiental e pública, a detecção destes compostos no meio ambiente é fundamental e de extrema importância, como também compreender as possíveis interações com os organismos vivos.

Assim como os animais, os seres humanos também estão expostos a esses desreguladores endócrinos, uma vez que estes são encontrados tanto em corpos d'água onde são despejados os efluentes domésticos e industriais, como em corpos d'água reservados para abastecimento (VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010). Além disso, por serem continuamente lançados nos corpos d'água, acabam adquirindo características acumulativas (GUIMARÃES, 2008). Foi comprovada que a presença de compostos xenobióticos como, por exemplo, fármacos em ambientes aquáticos, mesmo que em pequenas quantidades, atuam em diferentes tipos de membranas biológicas, assim como em suas organelas (HENDRICH, 2006), podendo alterar a organização em nível molecular. Porém, por falta de estudos mais

aprofundados na área, não se sabe quais serão as consequências da exposição crônica a esses compostos (LEVY, 2006).

A interação dos fármacos com os componentes celulares pode alterar a organização da membrana biológica. Portanto, é essencial para a caracterização da interação entre fármacos e membranas, a obtenção de informação em nível molecular (SILVA, M.D., 2011). Porém, como existem dificuldades em estudar membranas *in vivo*, este estudo pode ser feito, como uma primeira abordagem, incorporando fármacos a monocamadas lipídicas na forma de filmes de Langmuir. Tais monocamadas representam modelos simples de membranas biológicas e podem apresentar diferentes respostas dependendo da estrutura molecular dos lipídios e dos fármacos em análise (SILVA, M.D., 2011). Além disso, hoje se sabe que os fosfolipídios utilizados nos modelos de monocamadas também servem como materiais para biossensores na detecção de fármacos (AOKI, et al., 2008).

É neste contexto que se insere e se desenvolve este mestrado: interação entre um hormônio estrógeno e modelos simples de membranas biológicas, via filmes de Langmuir.

1.2 Objetivos gerais

O objetivo geral deste mestrado foi investigar a interação entre o hormônio estrógeno EE2 e modelos simples de membrana biológica formados por monocamadas lipídicas estruturadas na interface ar/água na forma de filmes de Langmuir. O projeto tem como objetivo mais amplo, além da interação, gerar subsídios para o desenvolvimento de sensores para detectar tais substâncias em meio aquoso (língua eletrônica).

1.2.1 Objetivos específicos

1) Estudo da interação entre um representante da classe dos esteroides, o hormônio estrógeno EE2, e modelos simples de membranas biológicas via monocamadas de lipídios com distinta natureza elétrica, além do ácido esteárico. Isto foi realizado em quatro etapas:

A) Verificar as condições experimentais para otimizar o processo de formação de monocamadas do ácido esteárico na interface água/ar, via isotermas de pressão de superfície vs. área molecular média (isotermas π -A) de filmes de Langmuir, na ausência e na presença do hormônio na subfase em diferentes concentrações.

B) Estudar o comportamento da monocamada do lipídio catiônico brometo de dioctadecildimetil amônio (DODAB) na interface ar/água via isotermas π -A, na ausência e na presença do hormônio na subfase em diferentes concentrações.

C) Investigar a interação da monocamada do fosfolipídio zwitteriônico dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) na interface ar/água via isotermas π -A, com o hormônio na subfase em diferentes concentrações.

D) Analisar por isotermas π -A a interação do fosfolipídio aniônico dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) na interface ar/água na presença e ausência do hormônio na subfase em diferentes concentrações.

2) Determinar a natureza das interações dos filmes de Langmuir dos lipídios DODAB, DPPC e DPPG com EE2, por espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS, do inglês *Polarisation modulated infrared reflection-absorption spectroscopy*).

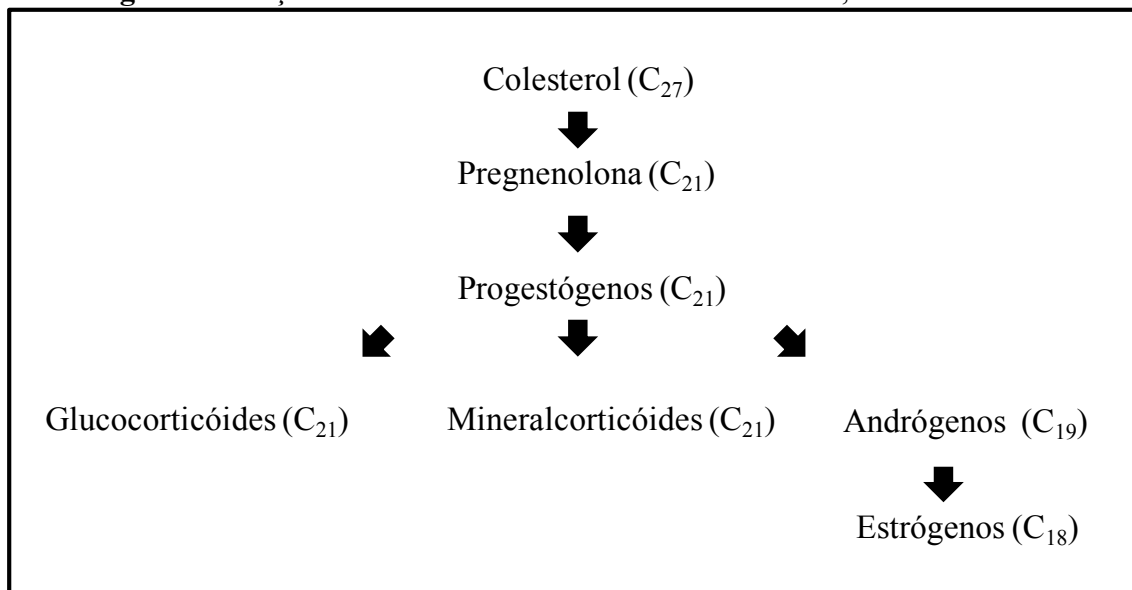
Esta dissertação de mestrado aborda os resultados obtidos ao longo dos últimos 24 meses (março/2013 a fevereiro/2015) e está assim estruturada: inicialmente são apresentados no item I a motivação e os objetivos desse projeto de mestrado, o item II traz uma revisão da literatura sobre o hormônio 17α - etinilestradiol (EE2), molécula alvo deste projeto, bem como de modelos miméticos de membranas biológicas. O item III aborda os conceitos teóricos referentes às técnicas de caracterização utilizadas neste estudo. No item IV estão relatados os materiais e métodos usados nesta pesquisa, enquanto que os resultados e discussão estão apresentados no item V. Enfim, o item VI descreve as conclusões.

II- INTRODUÇÃO

2.1 17 α -etinilesestradiol (EE2)

Os estrogênios são produzidos naturalmente pelos organismos ou sintetizados industrialmente para serem utilizados como fármacos (LOPES *et al.*, 2010). Nos seres humanos e em outros vertebrados, os hormônios naturais são produzidos primariamente nos ovários femininos e nos testículos masculinos (além de outros órgãos), originários do colesterol ou da acetilcoenzima-A e são lipossolúveis (DAY; HAWKINS, 1999). Essa relação pode ser vista na Figura 1.

Figura 1: relações biossintéticas das classes de hormônios, esteróides e colesterol.



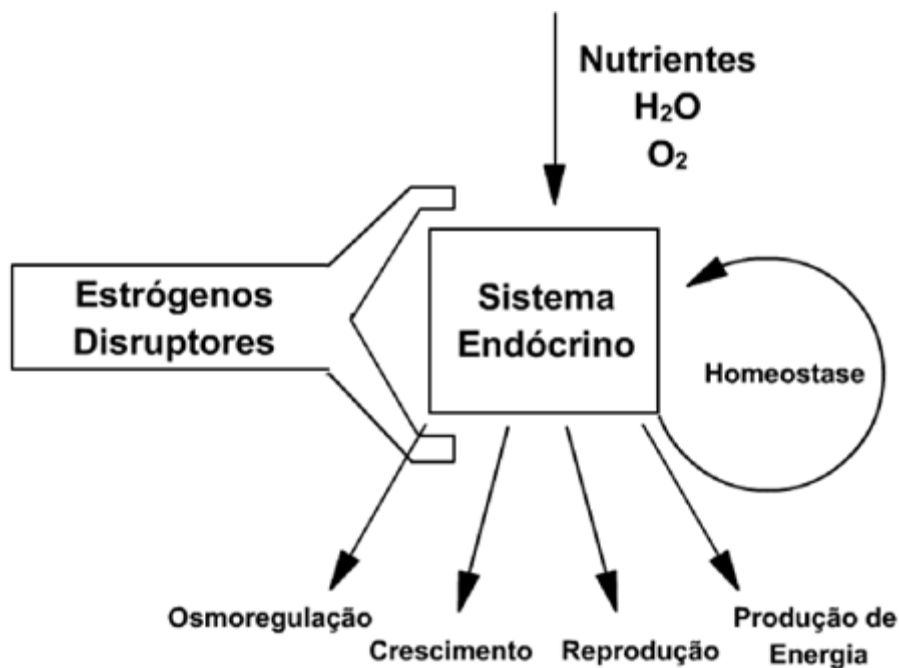
Fonte: Figura adaptada de Berg; Tymoczko; Stryer, 2002.

Estes compostos são responsáveis por induzir a proliferação do epitélio vaginal e a secreção de muco pelas glândulas cervicais, no período menstrual, além de outras características femininas secundárias como a proliferação das glândulas mamárias, redistribuição do tecido gorduroso, a ossificação das epífases e calcificação dos ossos longos com descalcificação da pélvis. Atuam como metabólicos, com retenção de nitrogênio, e são

responsáveis por manter as características secundárias, que são as sinalizações de fertilidade, os ferônômios (REY, 1969); (PARISOTTO et al., 2003).

Os hormônios femininos naturais 17- β estradiol, estriol, estrona e o sintético EE2, foram desenvolvidos para terapias de reposição e métodos contraceptivos. Os estrogênios são os compostos xenobióticos que despertam maior preocupação ambiental, pois sua conformação é melhor reconhecida pelos receptores, resultando em respostas máximas do organismo (REIS FILHO; ARAUJO; VIEIRA, 2006). Os estrógenos agem nos mecanismos de controle do sistema endócrino, causando perturbações ao sistema, incluindo a homeostase que é essencial para a manutenção do equilíbrio metabólico do organismo. A Figura 2 ilustra as interações tóxicas dos estrógenos com as funções coordenadas pelo sistema endócrino (REIS FILHO; ARAUJO; VIEIRA, 2006).

Figura 2: representação esquemática da interação tóxica dos estrógenos com as funções coordenadas pelo sistema endócrino.



Fonte: Reis Filho; Araújo; Vieira, 2006.

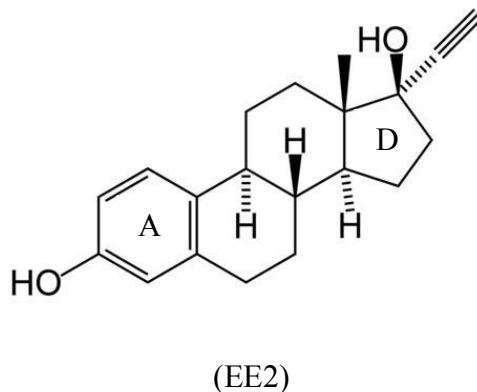
Esses compostos são eliminados diariamente e podem ser encontrados no ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} . Estudos mostram que a exposição a esses desreguladores endócrinos causam efeitos adversos à saúde de peixes, afetando seu sistema endócrino em concentrações de 1 ng.L^{-1} (VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010). Além da alteração nos peixes, a exposição prolongada aos estrogênios vem sendo associada a casos de infertilidade masculina e câncer de mama e ovário (GUIMARÃES, 2008). Apesar de terem uma meia vida curta comparado a outros poluentes, como praguicidas, são continuamente introduzidos nos ambientes aquáticos, que lhes confere um caráter acumulativo (GUIMARÃES, 2008).

O EE2, representado na Figura 3, é considerado um desregulador endócrino quando introduzido no meio e é capaz de induzir a produção de vitelogenina (VTG) em machos, além de desencadear outros efeitos (YAMAMOTO, 2011). A indução da produção de VTG ocorre devido a compostos, como o EE2, que são capazes de se ligarem a receptores estrogênicos. A VTG é uma fosfoglicoproteína produzida no fígado, secretada na corrente sanguínea, onde é transportada até os ovários, se acumulando nos ovócitos em crescimento para ser utilizada como percussor das reservas nutricionais necessárias para o desenvolvimento subsequente dos embriões. A codificação do gene para esta proteína não existe ou é pouco expressada em machos e em indivíduos imaturos. Desta forma, a presença desta proteína no sangue destes organismos representa um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de xenoestrógenos (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006); (MARCANTÔNIO; VIEIRA, 2011); (MARIN; MATOZZO, 2004).

A produção da VTG em machos ovíparos, além de proporcionar resultados qualitativos a exposição de agentes estrogênicos, envolve prejuízos ao desenvolvimento destes organismos, como a sobrecarga das funções hepáticas e a disrupção metabólica devido

ao desvio na produção de proteínas essenciais para a produção da VTG, além de diminuir a imunidade e retardar o crescimento (SOLÉ et al., 2000), (FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Figura 3: representação da estrutura molecular do 17 α - estinilestradiol (EE2).



Fonte: Próprio autor.

Conforme a *Environmental Protection Agency* (EPA), um desregulador endócrino é definido como “agente exógeno que interfere com síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação do hormônio natural no corpo responsável pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (GULTEKIN; INCE, 2007), (BILA; DEZOTTI, 2007). Portanto, as alterações que ocorrem no sistema endócrino podem por em risco a reprodução de uma população que está exposta a ele (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2001). A maior parte dos desreguladores endócrinos tem seus mecanismos relacionados à sua interferência a receptores estrogênicos. A substância pode se ligar ao receptor gerando uma resposta agonista, ou também pode bloquear a ligação do estrógeno (antagonista) prejudicando a atividade celular, podendo induzir a produção de células, amplificando as respostas do organismo (ARUKWE, 2001).

Em 1960 foram descobertos os receptores intracelulares de esteroides. Estes receptores carregam os hormônios para dentro da célula para que possam interagir com o núcleo. Este

transporte é conhecido como efeito genômico. Alguns estudos de modelos de membrana com esteroides mostraram que, além desses receptores, o hormônio interage isoladamente com a membrana celular (MCEWEN, 1991), (NAKATA et al., 2011) e (DIMITROV e LALCHEV, 1998). Raw, Mennucci e Maia (1969), afirmam que os hormônios tem efeitos sobre a permeabilidade celular. O estradiol, por exemplo, aumenta a retirada de aminoácidos pelo útero.

Nas últimas décadas a preocupação com a presença de desreguladores endócrinos em ambientes aquáticos tem crescido. Para que seja possível detectar esses compostos no ambiente são necessárias técnicas sensíveis, uma vez que estes compostos são encontrados em quantidades ínfimas. As técnicas mais utilizadas são as de cromatografia líquida e gasosa, acopladas a espectrômetros de massa e outras fundamentadas em testes toxicológicos (TORRES, 2009); (NOPPE et al., 2008), (KUCH; BALLSCHMITER, 2001); (SANFILIPPO et al., 2010); (PALUMBO; KAIVUNEM; TJEERDEM, 2009).

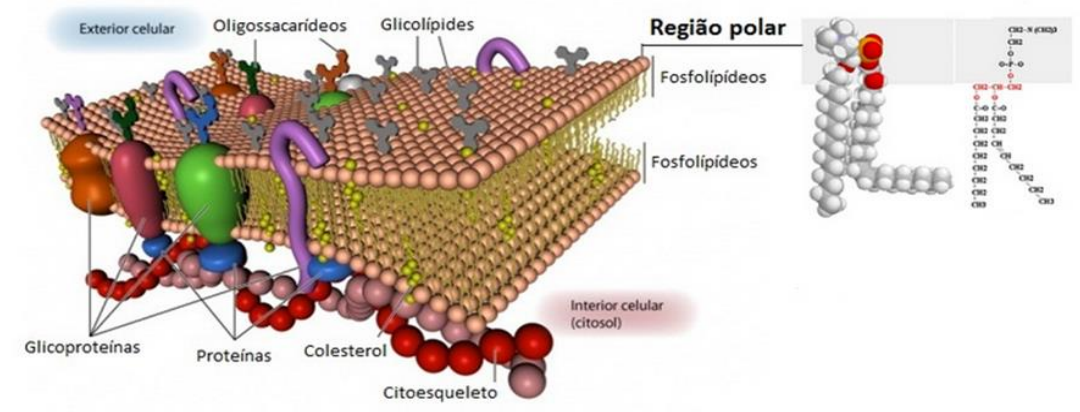
2.2 Motivação para o uso de modelos miméticos de membrana celular

Todos os seres vivos, exceto alguns vírus, dependem das membranas lipídicas, que envolvem as células e seu conteúdo separando-as do ambiente externo. Dentro do citoplasma as membranas formam compartimentos separando várias estruturas celulares. Além disso, a membrana tem um papel muito importante no transporte de substâncias específicas para dentro e para fora da célula (CAMPBELL, 2007).

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica com aproximadamente 6 nm de espessura, onde solubilizam vários tipos de proteínas para cada tipo de célula. Os lipídios celulares mais comuns são os fosfolipídios, que apresentam uma parte polar, “cabeça” hidrofílica e outra parte apolar, a “cauda”, com características hidrofóbicas (PETTY, 1996). Os fosfoglicerídeos constituem os principais componentes lipídicos das membranas e são excelentes exemplos de moléculas anfipáticas. O colesterol, assim como os fosfolipídios, está

presente em grande quantidade na membrana (VIDIGAL, 2008). A maneira como os materiais se organizam para formar a membrana depende de como eles interagem com a água. Os fosfolipídios, por exemplo, por terem longas cadeias alquílicas formam bicamadas ligando as partes hidrofóbicas das moléculas, como mostrado na Figura 4. Essa estrutura é muito estável quando se fecha formando o contorno da membrana celular (TANFORD, 1973); (MAYERS, 1999).

Figura 4: representação esquemática de uma membrana plasmática



Fonte: Martins, 2012.

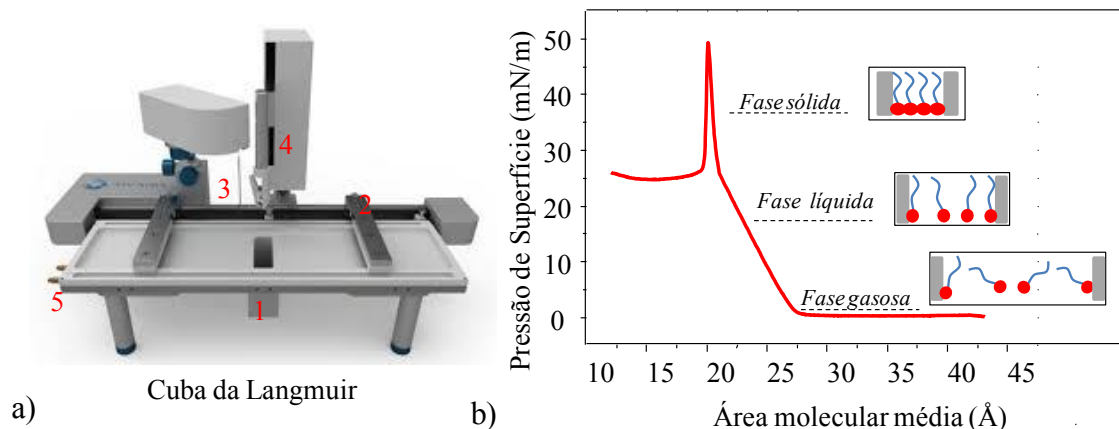
Bicamadas lipídicas são utilizadas como modelos de membrana por apresentarem a capacidade de transportar pequenas moléculas e íons e por possuírem um interior hidrofóbico, características também observáveis nas membranas celulares. Além disso, bicamadas lipídicas são simples de se trabalhar em laboratório. A diferença mais importante entre a bicamada lipídica (utilizada como modelo de membrana) e a membrana celular é que estas últimas apresentam proteínas e outros compostos, além de lipídios em sua composição estrutural (CAMPBELL, 2007).

III – CONCEITOS TEÓRICOS

3.1 Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir são fabricados em um sistema conhecido como Cuba de Langmuir (Figura 5a), constituída basicamente por uma cuba de teflon, onde é vertida uma subfase líquida, barreiras móveis para a compressão do filme, cuja velocidade pode ser controlada, um sensor para determinar a pressão de superfície e um braço mecânico empregado na deposição do filme sobre um substrato sólido. Os filmes formados na interface ar/água são usualmente compostos por moléculas anfífilas. Como exemplo, a isoterma π -A do filme de ácido esteárico é mostrada na Figura 5b (LANGMUIR, 1917); (PETTY, 1996); (FERREIRA *et al.*, 2005). Na fabricação do filme monomolecular utiliza-se uma solução que é obtida dissolvendo um composto anfílico adequado em um solvente orgânico bastante volátil, como por exemplo o clorofórmio. A solução é espalhada sobre a superfície de água ultrapura com uma microsseringa.

Figura 5: a) diagrama esquemático de uma cuba de Langmuir comercial: (1) cuba de Teflon, (2) dispositivos para compressão (barreiras móveis), (3) balança de pressão (caracterização da monocamada via isotermas π -A), (4) braço mecânico (utilizado para a deposição dos filmes LB e (5) entrada/saída de água para controle da temperatura da subfase. b) representação de uma isoterma π -A com a representação esquemática das três fases de compressão até a formação dos filmes de Langmuir (estados gasoso, líquido expandido e condensado).



Fontes: a) KSV NIMA; b) Produção próprio autor.

Após a evaporação do solvente as barreiras móveis comprimem as moléculas. Para moléculas anfifílicas com caudas hidrofóbicas e cabeças hidrofílicas bem definidas, estas se orientam de forma que seus eixos fiquem perpendiculares à superfície da água, com suas partes hidrofóbicas para cima e sua extremidade hidrofílica para baixo, em contato com a água, formando o filme de Langmuir. Para moléculas mais complexas como fitocianinas, perilenos e ligninas, o filme não necessariamente terá essa orientação. Quando o filme atinge o máximo de empacotamento e a monocamada continua sendo comprimida, ocorre o colapso, com formação de camadas desordenadas ou bicamadas onde as moléculas estão sobrepostas umas às outras (FERREIRA, 2005), (PETTY, 1996).

As medidas de pressão de superfície (isotermas π -A) para os filmes de Langmuir podem ser utilizadas para obter informações quanto à estruturação da monocamada. A Figura 5b mostra as fases gasosa, líquida e sólida, as quais se referem ao grau de empacotamento e interação das moléculas na interface ar/água. Na fase gasosa as moléculas estão distantes umas das outras, por esta razão, a interação entre elas é muito pequena. Conforme as barreiras vão se fechando, a área do filme é reduzida e as cadeias hidrofóbicas começam a interagir, mas ainda não estão alinhadas. Nesta fase dizemos que o filme está no estado líquido. A fase condensada ocorre quando as moléculas estão alinhadas lado a lado de modo que a interação entre as moléculas é máxima. Aumentando a compressão das monocamadas, acima da pressão de equilíbrio, ocorre o colapso do filme. (FERREIRA, 2005). Durante a compressão, transições de fase também podem ser identificadas e relacionadas às reorientações moleculares.

A pressão de superfície representa a variação na tensão superficial da água ultrapura pela presença da monocamada, seguindo a equação 1:

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

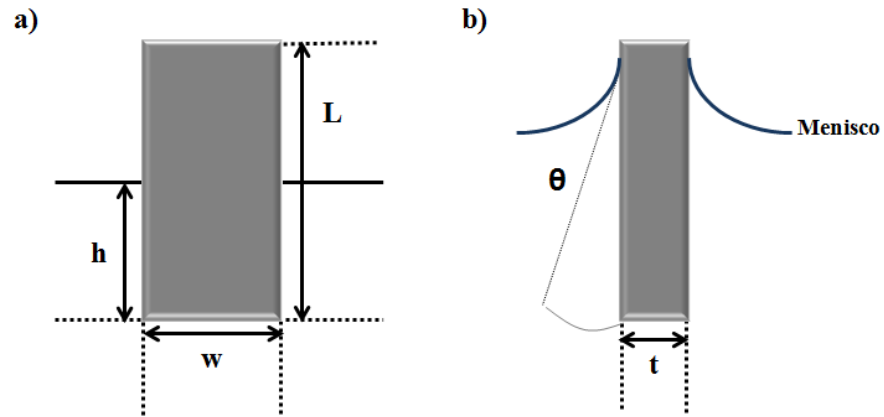
γ_0 : tensão superficial da água ultra pura

γ : tensão superficial da água ultra pura + monocamada

A isoterma π -A é medida a partir da variação da área da interface ar/água ocupada pelo filme. Essa curva recebe o nome de isoterma uma vez que a temperatura da subfase é mantida constante durante todo experimento.

Pode-se obter a pressão de superfície pelo método de Wilhelmy, que mede a força por unidade de comprimento em uma placa de Wilhelmy, a qual é feita de um material inerte e hidrofílico (normalmente papel filtro ou platina). A placa é suspensa por um fio muito fino ligado a uma balança eletrônica. Sobre o sensor de Wilhelmy agem as forças da gravidade e da tensão superficial que o puxam para baixo e o empuxo deslocando a placa para cima, além da tração do fio (GERALDO, 2013). Na Figura 6 é representado um desenho esquemático da placa que compõe o sensor de Wilhelmy. No método de Wilhelmy a medida de pressão de superfície é obtida através da variação na tensão superficial da água em virtude da presença da monocamada. Em última análise mede-se a variação na força de tração que sustenta a placa, que está parcialmente imersa na subfase. Com a formação da monocamada, a tensão superficial da subfase muda e conseqüentemente varia a tração do fio. A variação na tração está relacionada à variação da tensão superficial da subfase e com a geometria da placa.

Figura 6: arranjo experimental da placa de Wilhelmy: (a) vista frontal; (b) vista lateral. Sendo: h : altura da porção da placa que se encontra submersa; L : altura da placa; w : largura da placa; θ : ângulo do menisco da água tocando a placa; t : espessura da placa.



Fonte: Próprio autor.

A placa que compõe o sensor de Wilhelmy tem uma espessura muito pequena (décimos de milímetros). Esta placa está parcialmente submersa na subfase e é suspensa por um fio muito fino ligado a uma eletrobalança, e esta registra a tração do fio. Sobre a placa agem quatro forças que estão demonstradas na Figura 7. As forças descendentes referem-se à gravidade (P) e a tensão superficial (T_s). O empuxo (E) relacionado ao volume da água deslocado pela placa e a tração (T) sofrida pelo fio são forças ascendentes.

Figura 7: representação das forças que atuam sobre a placa de Wilhelmy.



Fonte: Próprio autor.

Para uma placa retangular, como a utilizada em uma cuba KSV, determina-se a tração no fio a partir das equações descritas a seguir, sendo: P_{placa} : peso da placa, g : aceleração da gravidade, ρ_{placa} : densidade da placa, ρ_{liq} : densidade do líquido, D : perímetro da placa, $V_{\text{liq.desl}}$: volume do líquido deslocado, V_{placa} : volume da placa e γ_{liq} : tensão superficial do líquido.

$$E = \rho_{\text{liq}} \cdot g \cdot V_{\text{liq.desl}} \text{ sendo } V_{\text{liq.desl}} = w \cdot h \cdot t$$

$$P_{\text{placa}} = m_{\text{placa}} \cdot g \quad \text{sendo} \quad m_{\text{placa}} = \rho_{\text{placa}} \cdot V_{\text{placa}} \text{ e } V_{\text{placa}} = w \cdot L \cdot t$$

$$T_s = \gamma_{\text{liq}} \cdot D \cdot \cos \theta \quad (2)$$

Assume-se o ângulo θ como zero, uma vez que o menisco da água toca a placa, como mostrado na Figura 6, formando uma curva bem acentuada, sendo que a parte em contato direto com a placa encontra-se tangenciando a placa. Como a subfase “molha” o sensor, temos:

$$T = P + T_s - E \quad (3)$$

$$T = g \cdot \rho_{\text{placa}} \cdot (w \cdot L \cdot t) + \gamma_{\text{liq}} \cdot 2 \cdot (w+t) - \rho_{\text{liq}} \cdot g \cdot (w \cdot t \cdot h)$$

O peso da placa (P) e o empuxo (E) são forças constantes, pois dependem da massa da placa, da aceleração da gravidade, da densidade do líquido (água) e do volume de água deslocada pela placa. Portanto, a variação das forças de tração no filme, com e sem a monocamada na subfase aquosa é dada por:

T_a : tração do fio para a placa parcialmente na água pura

T_{a+m} : tração no fio para a placa parcialmente imersa na água pura + monocamada

$$\Delta T = T_a - T_{a+m} \quad (4)$$

$$\Delta T = \gamma_o \cdot 2 \cdot (w+t) - \gamma \cdot 2 \cdot (w+t)$$

$$\Delta T = 2 \cdot (w+t) \cdot (\gamma_o - \gamma)$$

$$\Delta \gamma = \frac{\Delta T}{2 \cdot (w+t)} \quad (5)$$

A partir da equação (1) obtemos:

$$\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma = \pi = \frac{\Delta T}{2w} \quad (5)$$

Com isso temos que a medida de pressão de superfície via sensor de Wilhelmy envolve a variação na tração do fio devido à presença da monocamada e da geometria da placa, uma vez que a largura $w \gg t$.

Para o cálculo da área molecular, a , divide-se a área A entre as barreiras, pelo número de moléculas na superfície aquosa de acordo com a equação:

$$a = \frac{A.M}{C.N_A.V} \quad (6)$$

onde M é a massa molar da substância, C é a concentração da solução espalhada em massa por unidade de volume, V é o volume espalhado e N_A o número de Avogadro.

3.2 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

A radiação no infravermelho foi descoberta há mais de dois séculos por Herschel, porém seu uso como espectroscopia só se consolidou quando Gerhard Herzberg, em 1945, publicou seu livro intitulado *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*. A espectroscopia de radiação no infravermelho (IR) é uma técnica sensível a vibrações que provocam alterações no momento de dipolo da molécula. Quando a energia da radiação no IR coincide com a frequência de oscilação de uma dada ligação ou grupo químico, ocorre o fenômeno de ressonância e, conseqüentemente, a absorção dessa radiação. Considerando que cada molécula apresente ligações ou grupos químicos particulares, e que os grupos químicos e ligações vizinhas afetam esses modos vibracionais, os espectros de IR são característicos de cada molécula em um determinado sistema. Sendo assim, a espectroscopia de radiação no IR é eficaz na identificação das estruturas e alterações conformacionais das moléculas

(GREMILICH; YAN, 2001); (MENDELSON; FLACH, 2002); MENDELSON et al., 2010); (ARIMA, 2014).

O método de espectroscopia de reflexão e absorção infravermelha (IRRAS) foi elaborado em 1966 por Robert G. Greenler. Essa técnica é uma variante da espectroscopia IR tradicional, realizada por transmissão, e se destacou por permitir a análise de filmes finos depositados sobre uma superfície metálica. Devido à superfície metálica, o campo elétrico na superfície refletora é polarizado, pois a componente da luz refletida interfere com a luz incidente (em ângulos de incidência rasantes, próximos a 80°). Dessa forma é possível obter medidas para filmes extremamente finos (da ordem de alguns nanômetros). A regra da seleção de superfície também determina que somente a luz polarizada em p (paralela ao plano de incidência = plano que contém os raios incidentes, refletidos e a reta normal) apresenta refletividade na superfície. Por essa razão, apenas momentos de dipolo com componentes de vibração nessa direção podem ser detectados. A luz polarizada em s (perpendicular ao plano de incidência) possui um atraso de fase de 180° em relação ao feixe incidente. Assim a interferência dos feixes (incidente e refletido) gera um campo superficial resultante nulo. Essa regra é aplicável apenas em substratos metálicos.

Esta regra de seleção não existe na interface ar/água, por isso é possível detectar as vibrações em todas as direções de forma simultânea. Porém, isso impede a identificação precisa da orientação das moléculas presentes na superfície aquosa. Outra desvantagem é que as moléculas de água presentes na forma de vapor interferem, pois sobrepõe bandas no intervalo de $1400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, o que dificulta o estudo de importantes substâncias biológicas que são muito estudadas no sistema de interface ar/água. Com o desenvolvimento da técnica de espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS), em 1993, as dificuldades foram superadas para os estudos de filmes de Langmuir (BLAUDEZ et al., 1993); (BLAUDEZ et al., 1994).

O PM-IRRAS é uma técnica baseada na alternância da polarização da luz incidente (s-perpendicular e p-paralelo ao plano de incidência), com uma frequência da ordem de dezenas de kHz. Assim os espectros podem ser medidos quase que simultaneamente em ambas as polarizações e a refletividade diferencial (S) pode ser calculada pela equação 7, a partir da refletividade das polarizações, R_s e R_p .

$$S = \frac{R_s - R_p}{R_p + R_s} \quad (7)$$

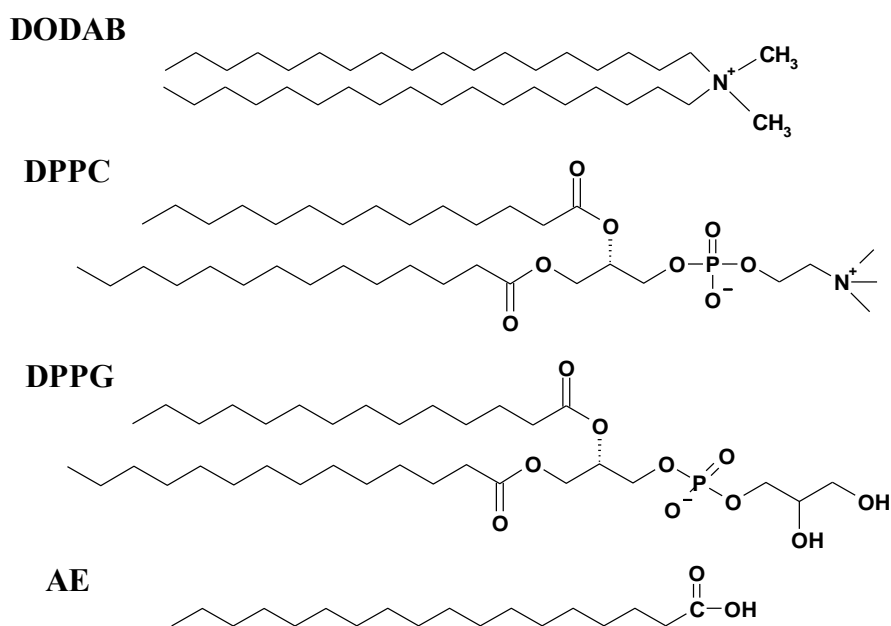
Para filmes de Langmuir, é possível estimar a orientação relativa dos grupos químicos componentes das moléculas a partir da refletividade diferencial. A absorção do feixe de luz polarizado paralelamente ao plano de incidência é sensível principalmente a dipolos orientados verticalmente, enquanto que o feixe polarizado perpendicularmente é sensível aos orientados horizontalmente (GERALDO, 2013). Como os espectros foram medidos simultaneamente e o espectro de IR foi dividido pelo espectro correspondente à subfase, reduzindo a influência do vapor d'água (BARNER et al., 1991); (GREEN et al., 1991).

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Este projeto teve seu estudo focado nos sistemas de membranas biológicas, constituídas por monocamadas do lipídio positivo DODAB (brometo de dioctadecildimetil amônio), do fosfolipídio negativo DPPG (dipalmitoil fosfatidil glicerol), do fosfolipídio zwitteriônico DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina) e do AE (ácido esteárico), e suas interações com o hormônio estrógeno EE2. A Figura 8 apresenta a estrutura molecular dos compostos estudados. Em particular vale ressaltar que na literatura o composto DODAB não tem uma definição clara como lipídio, em muitos casos ele é tratado apenas como um surfactante. Entretanto, neste projeto, o que nos interessa é seu caráter anfifílico, característica necessária para utilizá-lo como modelo simples de membrana biológica.

Figura 8: estruturas moleculares do DODAB, do DPPG, do DPPC e do AE.



Fonte: Próprio autor.

4.2 Preparo das dispersões lipídicas

Para os estudos da interação hormônio/membrana celular simples via filmes de Langmuir foram utilizados o hormônio EE2 (Sigma-Aldrich) e o DODAB, DPPC, DPPG (Avanti Polar Lipids Inc) e o AE (Sigma-Aldrich) como possíveis modelos de membrana celular. Todos os reagentes utilizados são de alto grau de pureza, não sendo necessária a realização de purificações. As soluções de DODAB, DPPC e do AE foram preparadas em clorofórmio (Merck), enquanto as soluções de DPPG foram preparadas em clorofórmio e metanol (Merck) na proporção 9:1 mL. Soluções aquosas de EE2 foram preparadas utilizando água ultrapura (18,2 M Ω .cm) adquirida no sistema Milli-Q, modelo Simplicity.

4.3 Técnicas de caracterização

4.3.1 *Filmes de Langmuir*

Os filmes de Langmuir foram obtidos utilizando a cuba de Langmuir KSV modelo 2000, com volume de 40 mL. A formação dos filmes de Langmuir foi feita pelo espalhamento de 15 mL da solução 0,5 mg/mL de AE, DPPC, DODAB e DPPG. As membranas foram caracterizadas por isotermas π -A a 23°C usando o método Wilhelmy, com o sensor posicionado perpendicularmente à superfície da cuba e às barreiras. As monocamadas foram comprimidas simetricamente a uma velocidade constante de 5 mm/min. Foram esperados 10 min entre o espalhamento da solução e o início da compressão para a evaporação do solvente orgânico.

Para investigar a interação entre o hormônio EE2 e modelos simples de membranas foram realizados estudos de isotermas π -A. Os filmes de Langmuir foram obtidos através do espalhamento de 15 μ L de soluções de DODAB, DPPC, DPPG ou de AE sobre a interface ar/água ultrapura, como também contendo solução do EE2 na subfase. Para o estudo na presença do hormônio, foram utilizadas concentrações de $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹ de

EE2. Concentrações superiores não foram utilizadas devido à baixa solubilidade do hormônio na água. (YING; KOOKANA; RU, 2002); (TORRES, 2009).

4.3.2 *PM-IRRAS*

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas com o auxílio do Dr. Felipe José Pavinatto no laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP – São Carlos em um equipamento modelo PMI550 da KSV Instruments (Finlândia), que conta com lâmpada de carbeto de silício (Globar) como fonte de luz IR, um modulador de polarização foto elástico composto por um cristal de ZnSe (operando em 50 KHz), e um detector de HgCdTe (MCT) modelo PCI-3TE-10.6 com área ativa de $1 \times 1 \text{ mm}^2$. Todas as medidas foram realizadas com ângulo da luz incidente de 80° e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Para cada espectro, uma média de 6000 varreduras foram feitas à taxa de 10 varreduras/segundo. O sinal coletado pelo detector é amplificado por um *lock-in* e dividido nas componentes s e p pelo programa do próprio equipamento, o qual calcula a refletividade diferencial pela equação 7. A resolução espectral do equipamento é de 8 cm^{-1} e a correção da linha de base (*baseline*) foi feita usando o programa Origin® 8.5.

No estudo de interação entre modelos de membrana biológica e o EE2 através de medidas de PM-IRRAS, os filmes de Langmuir de ácido esteárico, DPPC, DODAB e DPPG e foram preparados na presença de EE2 na subfase, na concentração de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$. Os espectros foram obtidos em três pressões distintas: 0, 10 e 30 mN.m^{-1} .

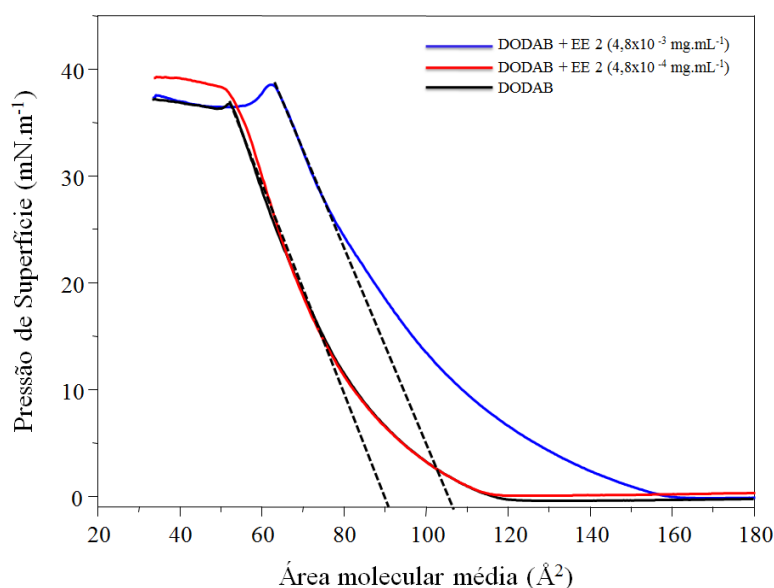
V – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Filmes de Langmuir

5.1.1 Filmes de Langmuir de DODAB

A Figura 9 apresenta as isotermas π -A obtidas para os filmes de Langmuir de DODAB formados sobre água ultrapura e contendo solução de $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹ de EE2 na subfase.

Figura 9: isotermas π -A para os filmes de Langmuir de DODAB sobre a subfase de água ultrapura e de soluções de EE2 $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹. Isotermas obtidas em triplicata. A linha pontilhada mostra a extrapolação das isotermas π -A a partir da fase condensada do filme.



Fonte: Próprio autor.

Apenas na presença da solução $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ de EE2 na subfase observa-se um deslocamento para maiores áreas da isoterma π -A em relação à isoterma π -A de DODAB sobre água ultrapura. O deslocamento foi de aproximadamente 13 Å de acordo com a extrapolação da região do colapso no eixo da abscissa (Figura 9). Não foi observado deslocamento para maiores áreas para $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹ de EE2 na subfase. Este fato pode

indicar a não interferência do EE2 na formação da monocamada de DODAB quando exposto a este nível de concentrações de EE2.

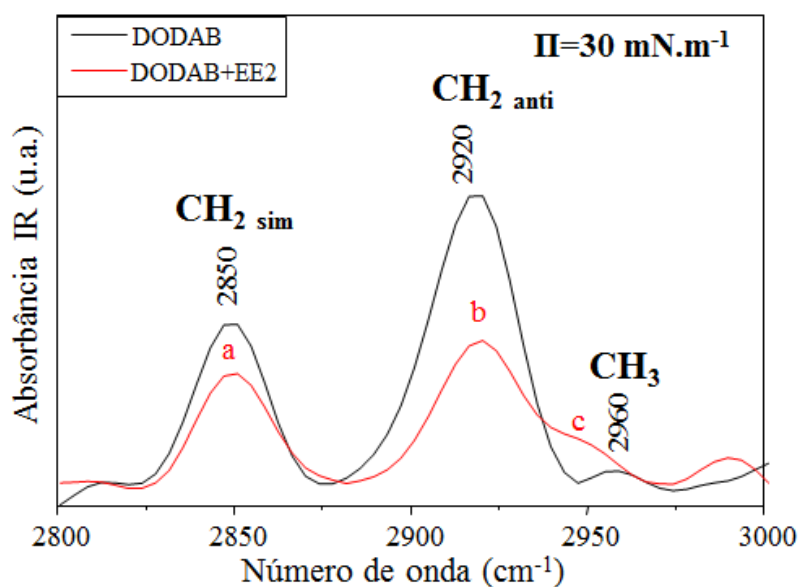
O deslocamento para maiores áreas das isothermas π -A com o hormônio na subfase em concentração de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ sugere uma interação DODAB-EE2, com as moléculas de EE2 posicionando-se entre moléculas de DODAB na interface ar/água. Em nível molecular, o que pode estar acontecendo é uma atração entre o grupo OH (negativo) do anel-A (fenol), ou do anel-D, e a cabeça hidrofílica da molécula do lipídio (positivo). Scheidt et al. (2010), através de cálculos quânticos, reportam que a hidroxila do anel-A é mais hidrofílica do que a do anel-D e, portanto, tende a ser mais reativa. Assim, a interação DODAB-EE2 ocorreria preferencialmente entre a hidroxila do anel-A e a cabeça hidrofílica do DODAB. De qualquer forma, a interação DODAB-EE2 é relativamente forte, pois as isothermas π -A continuam deslocadas mesmo na fase condensada do filme, indicando que as moléculas de EE2 continuam entre as moléculas de DODAB na interface ar/água.

A interação entre lipídios catiônicos e grupos fenólicos já é reportada na literatura. Paiva et al., (2008) descreve a produção de cerâmicas organofílicas a partir da adição de lipídios catiônicos com aplicação no tratamento de águas. Tais lipídios atuam como tensoativos e aumentam a adsorção de moléculas contendo grupos fenólicos. Isto fortalece a hipótese da interação DODAB-EE2 por meio dos grupos OH do anel-A e a cabeça hidrofílica do lipídio. Outra evidência da interação DODAB-EE2 é que as moléculas de EE2 não são capazes de formar filmes de Langmuir, ou seja, por si só não se mantêm na interface ar/água.

A fim de averiguar tal interação utilizou-se da técnica de PM-IRRAS, para estudo do sistema DODAB-EE2 dos filmes de Langmuir. A Figura 10 apresenta os espectros de PM-IRRAS obtidos para os filmes de DODAB na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase, no intervalo de frequência entre 2800 e 3000 cm^{-1} , obtidos durante a etapa de compressão. As análises foram realizadas nas pressões 10 e 30 mN.m^{-1} , porém, como

observado nas isothermas π -A de DODAB, o deslocamento na presença do EE2 foi praticamente o mesmo. Portanto, foi escolhida a pressão de 30 mN.m^{-1} com o intuito de avaliar as possíveis interações entre as moléculas de DODAB na pressão característica da membrana celular (BLUME, 1979).

Figura 10: espectro PM-IRRAS para filmes de Langmuir de DODAB, obtido na pressão de compressão 30 mN.m^{-1} , na ausência (linha preta) e na presença de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase (linha vermelha).



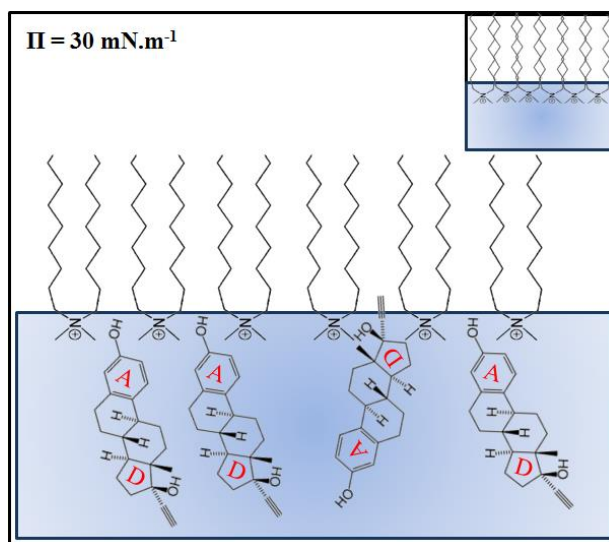
Fonte: Próprio autor.

De acordo com a literatura (LEWIS et al., 1994), as bandas observadas em 2850 e 2920 cm^{-1} são características dos estiramentos CH_2 simétrico e antissimétrico respectivamente, e a banda em 2960 cm^{-1} é característica do estiramento CH_3 . Para a pressão 30 mN.m^{-1} (Figura 10) nenhum deslocamento foi observado para bandas do CH_2 simétrico (2850 cm^{-1}) e CH_2 antissimétrico (2920 cm^{-1}) quando expostos ao EE2. Observou-se um deslocamento para o estiramento CH_3 de 2960 para 2951 cm^{-1} . O grupo CH_3 observado pode ser referente a duas regiões de DODAB: extremidade da cadeia ou na cabeça hidrofílica.

Como não foram observados deslocamentos dos grupos CH_2 da cadeia acredita-se que o CH_3 observado seja o presente na cabeça hidrofílica. Isto é consistente com a interação entre a cabeça hidrofílica (positiva) do DODAB $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$ e os grupos OH (negativos) do EE2, principalmente o anel-A. De acordo com a Figura 10 é possível notar que a presença do EE2 também interferiu na intensidade dos sinais das bandas CH_2 simétrico e antissimétrico. Analisando a relação $[\nu_s(\text{CH}_2)/\nu_{as}(\text{CH}_2)]$ observa-se que o EE2 aumenta a razão de 0,55 para 0,8, indicando que o EE2 influencia no alinhamento do DODAB (GOTO e CASELI, 2014).

A Figura 11 ilustra um possível modelo da estruturação da monocamada de DODAB na interface ar/água na presença do EE2, considerando os resultados obtidos via isotermas π -A e espectros PM-IRRAS na pressão $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Figura 11: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DODAB na interface ar/água com as moléculas de EE2 presentes na subfase, na pressão $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Na inserção encontra-se um modelo do filme de Langmuir de DODAB em subfase de água ultrapura.

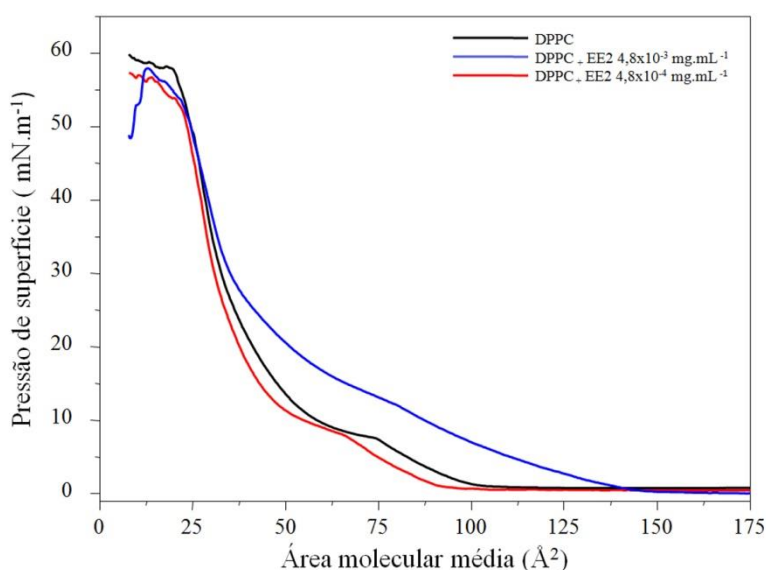


Fonte: Próprio autor.

5.1.2 Filmes de Langmuir de DPPC

A Figura 12 apresenta as isotermas π -A obtidas para os filmes de Langmuir de DPPC, na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL^{-1} de EE2 na subfase.

Figura 12: isotermas π -A para os filmes de Langmuir de DPPC sobre a subfase de água ultrapura e de soluções de EE2 com concentrações de $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg/mL . Isotermas obtidas em triplicata.



Fonte: Próprio autor.

É possível notar um deslocamento das isotermas π -A para maiores valores de área molecular média com o aumento da concentração de EE2. Isto sugere que a presença de EE2 afeta a organização das moléculas de DPPC na interface ar/água, semelhante ao observado no estudo com DODAB (Figura 9). Porém, as moléculas de DPPC apresentaram uma maior sensibilidade à presença de EE2, uma vez que para a concentração mais baixa do hormônio foi observado deslocamento da isoterma π -A. Além do deslocamento da isoterma π -A, o EE2 afetou o patamar da transição líquido-expandido para líquido-condensado do DPPC. Na concentração de $4,8 \times 10^{-3}$ mg.mL^{-1} , o patamar não foi apenas deslocado para maiores áreas

como também se tornou menos definido, o que é termodinamicamente esperado para misturas não ideais (CASELI e GOTO, 2014).

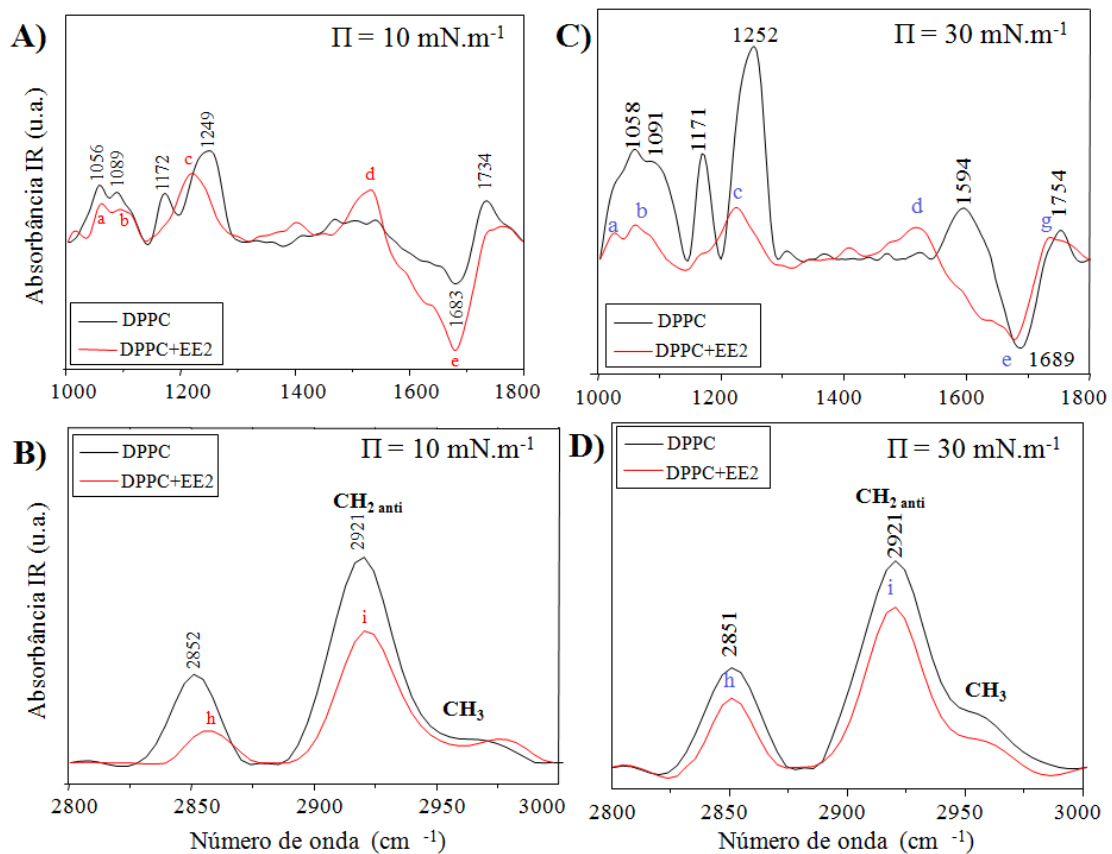
O deslocamento da isoterma π -A (linha vermelha) para maiores áreas em pressões até 30 mN.m^{-1} sugere que as moléculas de EE2 estão na interface ar/água interagindo com DPPC. Porém, para pressões acima de 30 mN.m^{-1} as isotermas π -A praticamente se sobrepõem, indicando uma expulsão das moléculas de EE2 presentes entre as moléculas de DPPC. Isto revela uma interação DPPC-EE2 relativamente mais fraca quando comparada com DODAB-EE2. Em nível molecular, considerando apenas o caráter zwitteriônico do DPPC, o grupo OH (negativo) do EE2 pode ser atraído pelo grupo positivo da cabeça hidrofílica do DPPC (NH_4^+) e, simultaneamente, pode ser repellido pelo grupo negativo (PO_2^-), o que possivelmente enfraquece a interação atrativa entre DPPC e EE2.

Dimitrov e Lalchev (1998), em filmes coespalhados de 17β -estradiol e DPPC, descreveram que deslocamentos das isotermas π -A ocorrem devido às ligações de hidrogênio entre a hidroxila do anel-A do E2 e o grupo C=O do DPPC, assim como ocorre para o colesterol e DPPC. Tais autores chegaram a essa conclusão estudando as interações de diferentes esteroides na presença do DPPC, sendo observado que os esteroides contendo grupos hidroxila no anel-A apresentam interação mais significativa com as moléculas de DPPC do que os esteróis com hidroxilas no anel-D. Kwon, Liljestrang e Katz (2006) justificam que isso ocorre devido à diferença de pKa dos anéis dos esteroides, e concluem que como o pKa do anel-A é menor que do anel-D (10,2 e 12 respectivamente), o anel-A tem seu hidrogênio mais suscetível a uma interação de hidrogênio do que o hidrogênio do anel-D. Consistente com estes resultados, Scheidt *et al.* (2010), através de cálculos quânticos, notaram que a hidroxila do anel-A é de fato mais hidrofílica e, portanto, tende a ser mais reativa. Tais resultados sustentam a hipótese da interação do DPPC, por meio dos grupos carregados da cabeça, com o grupo OH do anel A do EE2. Porém, de acordo com Arima (2014), outro

possível mecanismo de interação seria entre o grupo P=O do DPPC e o grupo OH do anel-A do EE2, uma vez que o grupo P=O é sensível a interações de hidrogênio.

Para melhor compreensão do comportamento dos filmes de Langmuir de DPPC na presença do EE2, foram obtidos espectros de PM-IRRAS dos filmes de DPPC com e sem EE2 na subfase, nas pressões 10 e 30 mN.m^{-1} , como apresenta a Figura 13. Nesse estudo foram obtidos espectros de PM-IRRAS em duas regiões espectrais, a fim de avaliar as ligações presentes: na cabeça polar (1000-1800) e na cauda do lipídio (2800-3000 cm^{-1}). A Tabela 1 lista os valores de bandas observados nos espectros de PM-IRRAS de filmes de Langmuir na ausência e na presença de EE2, como também as respectivas atribuições.

Figura 13: espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC na ausência (linha preta) e na presença de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase (linha vermelha), obtidos nas pressões de superfície de 10 mN.m^{-1} (A e B) e 30 mN.m^{-1} (C e D).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 1: atribuições das bandas dos espectros de PM-IRRAS obtidas para as monocamadas de DPPC na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase nas pressões 10 e 30 mN.m^{-1} . As letras a, b, c, d, e, f, g, h, i e j, indicam pontos no gráfico da Figura 13.

10 mN m ⁻¹		30 mN m ⁻¹		Atribuições
DPPC	DPPC/EE2	DPPC	DPPC/EE2	
-	-	-	1027(a)	PO ₂ simétrico ¹
1056	1059(b)	1058	1060(b)	C-O-P ²
1086	1093(c)	1091	-	PO ₂ simétrico ¹⁵
1172	-	1171	-	CO-O-C antissimétrico ²
1249	1219(d)	1252	1223(d)	PO ₂ antissimétrico ¹⁵
1541	1532(e)	1594	1522(e)	Deformação angular do OH da água ³⁴
1683	1680(f)	1689	1677(f)	Deformação angular do OH da água ³⁴
1734	-	1754	1735(g)	C=O ³⁵
2852	2858(h)	2851	2850(h)	CH ₂ simétrico ¹²³
2921	2920(i)	2921	2920(i)	CH ₂ antissimétrico ¹²³
2972	2979(j)	2959	2960(j)	CH ₃ ³

1 – (NAKAHARA; LEE; SHIBATA, 2010); 2 – (SANDRINO et al., 2014); 3- (GOTO; CASELI, 2014); 4- (LOPEZ et al.,2013); 5- (GERALDO, 2013)

Obs: As letras b, c, d, e, f, ,h, i e j (em vermelho) representam as bandas observadas nas figuras 13A e 13B. As letras a, b, d, e, f, ,h, i e j (em azul) representam as bandas observadas nas figuras 13C e 13D. Fonte: Próprio autor.

Como observado nos espectros da Figura 13C, pressão 30 mN.m^{-1} , na presença de EE2 a banda referente ao C=O é deslocada para menor número de onda (1754 para 1735 cm^{-1}). Esse resultado indica que as moléculas de EE2 interferem nas ligações de hidrogênio ao redor da cabeça polar do DPPC. Em estudo de interação entre filmes de DMPC com EE2, o deslocamentos, da banda do grupo C=O para menor número de onda significa o aumento das interações de hidrogênio, devido à interação C=O do DMPC e o grupo OH do anel-A do EE2

(NAKATA et al., 2011). Resultados semelhantes também foram observados e descritos nos trabalhos de Dimitrov e Lenchev (1998), Wagner et al. (2008), Pinheiro et al. (2013).

Semelhante ao estiramento C=O, o estiramento P=O também é sensível às ligações de hidrogênio (ARIMA, 2014). Deslocamentos para menores números de onda podem também estar relacionados a mudanças nas ligações de hidrogênio do grupo P=O (GERALDO, 2013); (ARRONDO;GONI; MACARULLA, 1984); (PINHEIRO et al., 2013); (WAGNER; DESBAT; BREZESINSKI, 2008); (HUBNER; BLUME, 1998). Nas Figuras 13A e 13C é possível observar deslocamentos para menores números de onda do grupo P=O causados pela presença do EE2, nas pressões 10 e 30 mN.m⁻¹, de 1249 para 1219 cm⁻¹ e de 1252 para 1223 cm⁻¹, respectivamente. Este resultado indica que as moléculas de EE2 interferem nas ligações de hidrogênio do grupo P=O com as moléculas de água da vizinhança. Além disso, o EE2 pode realizar ligações de hidrogênio através do grupo hidroxila do anel-A do EE2.

Complementar às análises das vibrações C=O e P=O dos espectros de PM-IRRAS obtidos a 10 e 30 mN.m⁻¹, foi observado que a banda atribuída ao estiramento antissimétrico do grupo CO–O–C (~1171 cm⁻¹) desaparece na presença do EE2 em ambas as pressões (10 e 30 mN.m⁻¹). Este resultado é consistente com a interação entre EE2 e o grupo C=O. Uma vez que o grupo C=O é parte do grupo CO-O-C. Ainda é possível notar que, na presença de EE2, em ambas as pressões, 10 e 30 mN.m⁻¹, uma nova banda atribuída ao estiramento PO₂⁻ (1027 cm⁻¹) é observada. Este resultado é mais uma evidência da perturbação causada por EE2 na monocamada de DPPC.

As bandas negativas apresentadas nas Figuras 13A e 13C por volta de 1680 cm⁻¹ estão relacionadas à deformação angular (*bending*) das moléculas de água na superfície da subfase no estado *close-packing*, e as bandas observadas em 1523 cm⁻¹ estão relacionadas ao modo de deformação angular da água que não apresentam ligações de hidrogênio. Essas bandas são resultantes da diferença da refletividade da interface ar/água coberta e não coberta com a

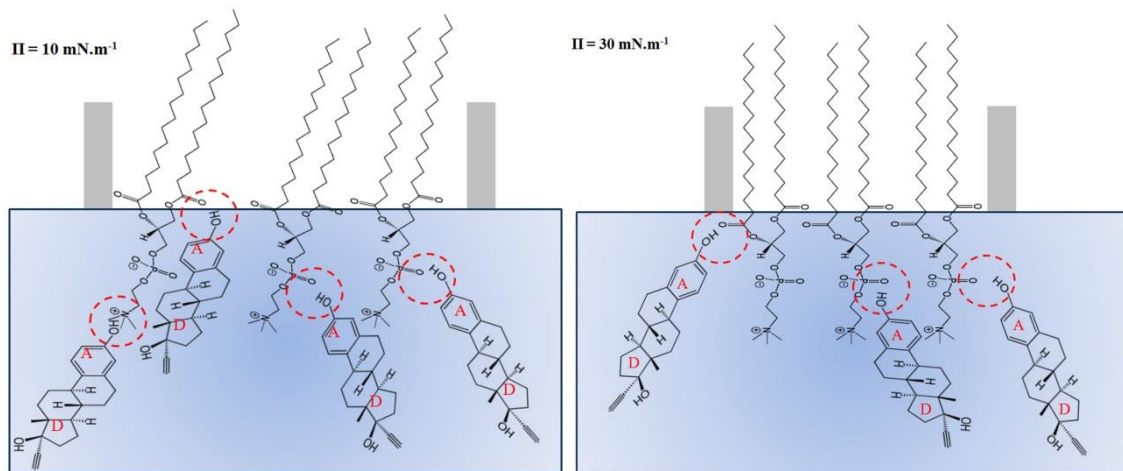
monocamada, e indicam que embora as informações relativas às vibrações do vapor de água da subfase sejam removidas dos espectros de PM-IRRAS, a orientação das moléculas de água na interface ar/água pode sofrer variações pela presença da monocamada espalhada (SACCANI et al., 2004). Observando a banda em 1680 cm^{-1} é possível notar um alargamento desta banda causado pela presença do EE2. Esse resultado sugere um aumento da espessura da monocamada, que deve também estar relacionado à presença do EE2 (BUFFETEAU et al., 1999).

Para os espectros obtidos no intervalo $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, apresentados nas Figuras 13B e 13D, observam-se os estiramentos referentes aos modos CH_2 simétrico e antissimétrico em 2851 e 2920 cm^{-1} . Na presença do EE2 não foi observada nenhuma alteração nas bandas CH_2 simétrica e antissimétrica. Tais resultados mostram que não há interações do EE2 com a cauda do DPPC. Assim como no DODAB, pequenos deslocamentos foram observados para o CH_3 , de 2972 para 2979 cm^{-1} , na pressão 10 mNm^{-1} , sugerindo que possivelmente as interações do EE2 passam a ocorrer com a região positiva do DPPC ($\text{N}-(\text{CH}_3)_3$) e o OH do anel-A do EE2, já que ele apresenta uma eletronegatividade maior que o OH do anel-D. Isso sugere que as interações DPPC-EE2 são mais fortes na região hidrofílica do lipídio.

Sumariamente pode-se resumir a interação DPPC-EE2 como preferencial pela cabeça hidrofílica. As alterações nos estiramentos $\text{C}=\text{O}$ e do $\text{P}=\text{O}$, observadas nas pressões estudadas, indicam essa afinidade. As mudanças nas ligações de hidrogênio existentes entre os grupos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{P}=\text{O}$ com as moléculas de água podem estar relacionadas com o desordenamento do filme de DPPC decorrente da interação do grupo OH do anel-A do EE2 presente na subfase com os grupos $\text{P}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{O}$, através das ligações de hidrogênio. Além dessas interações foi possível observar a interação entre ($\text{N}-(\text{CH}_3)_3$) do DPPC e os grupos OH do EE2 na pressão 10 mN.m^{-1} , através do deslocamento observado no estiramento CH_3 . As possíveis

organizações entre a membrana de DPPC e o EE2 em diferentes pressões foram ilustradas na Figura 14.

Figura 14: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DPPC na interface água/ar com as moléculas de EE2 presentes na subfase, em diferentes pressões de superfície.

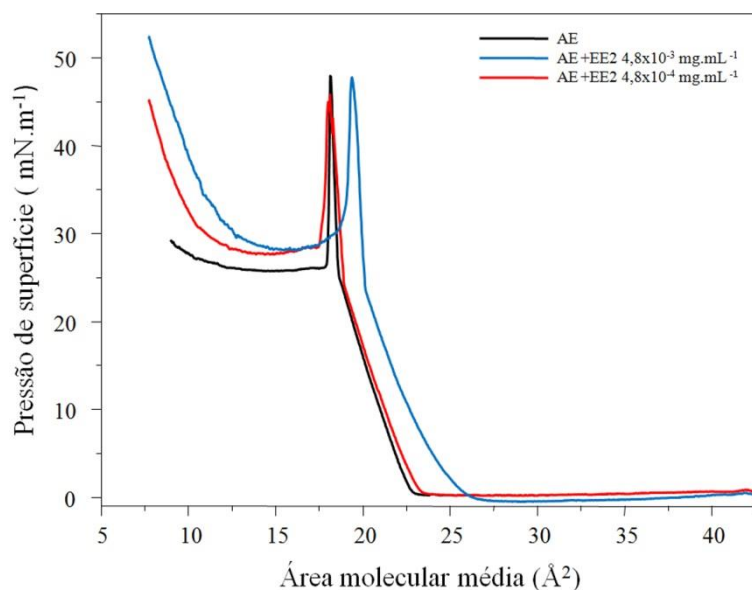


Fonte: Próprio autor.

5.1.2.1 Filmes de AE

O AE é um ácido graxo que apresenta apenas os grupos C=O e OH em sua região hidrofílica. Portanto, foram estudadas monocamadas de Langmuir de AE formadas na presença e na ausência de EE2 na subfase. Com o propósito de averiguar a interação do grupo C=O com o grupo OH do EE2 e a ausência de interação hidrofóbica. A Figura 15 apresenta a isoterma π -A de AE na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase.

Figura 15: isotermas π -A para os filmes de Langmuir de ácido esteárico (AE) sobre a subfase de água ultrapura e de soluções de EE2 $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹. Isotermas obtidas em triplicata.



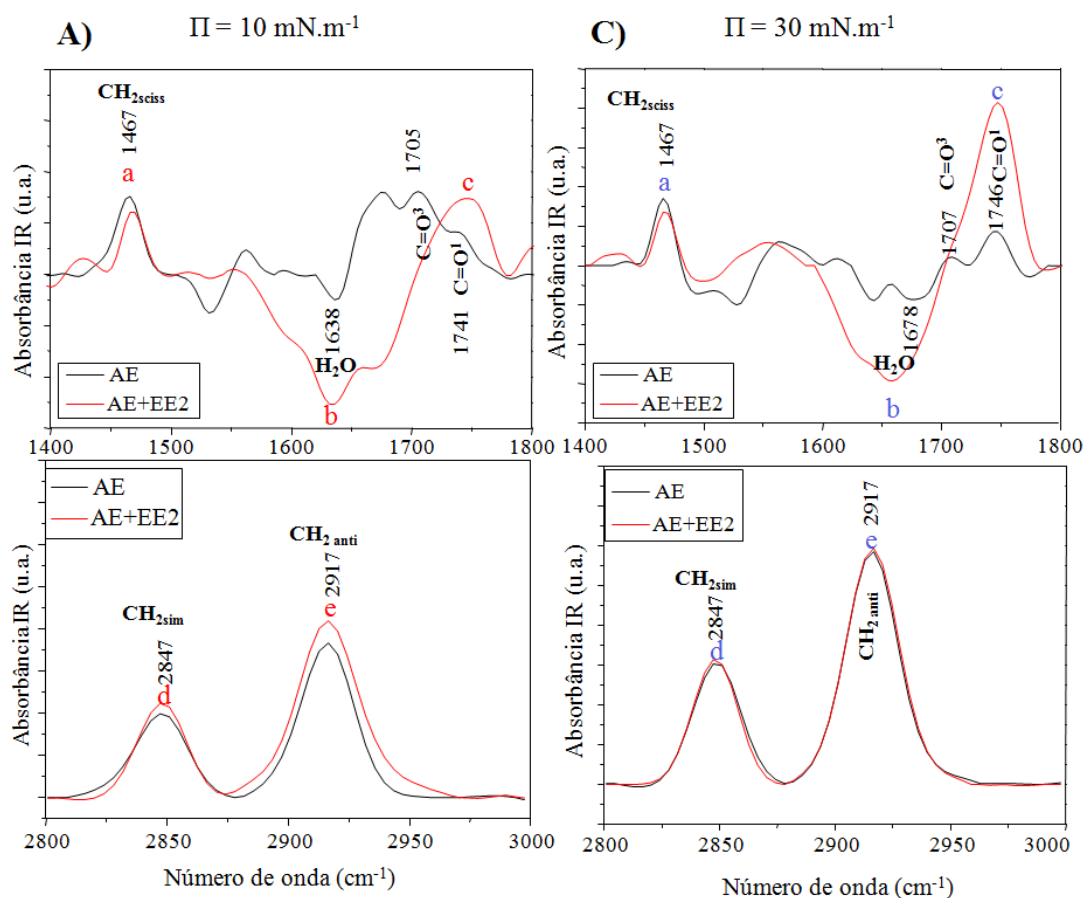
Fonte: Próprio autor.

A partir das isotermas π -A (Figura 15) pode ser observado o efeito de EE2 na subfase aquosa no filme de Langmuir de AE. Um deslocamento para maior área molecular média foi observado com o aumento da concentração do hormônio dissolvido na subfase. Esse deslocamento sugere que as moléculas de EE2 são atraídas para a superfície de modo que afastam as moléculas do AE. Assim como para o DPPC, EE2 pode estabelecer ligações de hidrogênio a partir do seu grupo hidroxila do anel-A com o grupo C=O do AE. Tal interação é sugerida também por Nakata *et al.*, (2013), em filmes de DMPC coespalhados com EE2. A interação também pode ocorrer através do grupo C-O⁻, pois o filme de AE foi formado sobre uma subfase em que o pH da água se encontra por volta de 5,6, de modo que cerca da metade das moléculas de AE podem estar ionizadas. Portanto, nessa condição, C-O⁻ se torna sensível a ligações de hidrogênio.

A Figura 16 apresenta os espectros de PM-IRRAS para filmes de AE na ausência e na presença de EE2 na subfase, os quais foram obtidos em duas pressões de superfície (10 e 30

$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Os espectros obtidos na região de 1400 a 1800 cm^{-1} apresentam os estiramentos CH_2 *scissoring* (1466 cm^{-1}), os modos de deformação angular da água, resultados da diferença de refletividade entre as superfícies cobertas e descobertas (aparecem entre 1510 e 1690) e os estiramentos $\text{C}=\text{O}$. Os valores de banda e as respectivas atribuições foram listados na Tabela 2. A Figura 16 também apresenta os estiramentos referentes à cadeia hidrofóbica do AE, onde, de acordo com os espectros 16B e 16D, os estiramentos CH_2 simétrico e antissimétrico foram observados em 2847 e 2916 cm^{-1} , respectivamente. (MURO; ITOH; HASEGAWA, 2010); (GOTO; CASELI, 2014).

Figura 16: espectros de PM-IRRAS para as moléculas AE sobre a subfase de água ultrapura (linha preta) e na presença de EE2 $4,8 \times 10^{-3}\text{ mg/mL}$ na subfase (linha vermelha). Espectros obtidos nas pressões de superfície de $10\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (A e B), e $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (C e D) respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 2: atribuições das bandas dos espectros de PM-IRRAS obtidas para as monocamadas de AE na ausência e na presença de EE2 $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ na subfase, nas pressões 10 e 30 mN.m^{-1} .

10 mN. m^{-1}		30 mN. m^{-1}		Atribuições
AE	AE/EE2	AE	AE/EE2	
1467	1469(a)	1467	1467(a)	CH_2 <i>scissoring</i> ^{1,2}
1638	1637(b)	1678	1658(b)	Deformação angular do OH da água ³⁴
1705	-	1707		C=O(tipo II) ¹
1741	1742(c)	1746	1748(c)	C=O (tipo III) ^{1,2}
2847	2847(d)	2847	2847(d)	CH_2 simétrico ^{1,2}
2917	2917(e)	2917	2917(e)	CH_2 antissimétrico ^{1,2}

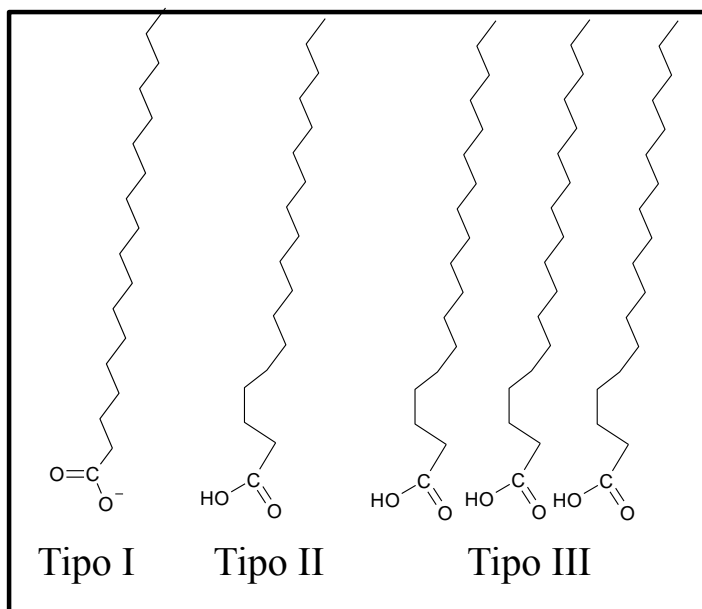
1-(MURO; ITOH; HASEGAWA, 2010); 2- (GOTO; CASELI, 2014); 3- (LIN-VIEN et al., 1991);

Obs: As letras a, b, c, d, e (em vermelho) representam as bandas observadas nas figuras 13A e 13B. As letras a, b, c, d, e (em azul) representam as bandas observadas nas figuras 13C e 13D.

Analisando os espectros PM-IRRAS de AE na presença de EE2 obtidos nas duas pressões foi possível observar alterações no estiramento C=O. De acordo com a literatura o estiramento C=O pode apresentar três Tipos de bandas (MURO; ITOH; HASEGAWA, 2010):

- Tipo I: grupo da carbonila paralelo à superfície da água. Banda intensa em torno de 1736 cm^{-1} .
- Tipo II: Os grupos C=O e C-OH estão igualmente confrontados com água. Banda em torno de 1724 cm^{-1} e quase nenhuma diferença é esperada por rotação do grupo carboxílico;
- Tipo III: Grupo C=O envolvidos em uma rede de ligações de hidrogênio entre as moléculas de AE e são mais hidratados na superfície da água. Este Tipo de conformação é o mais estável e com menores valores de números de onda, aparecendo por volta de 1705 cm^{-1} .

Figura 17: Esquemas moleculares de um ácido graxo com conformação diferente do grupo carboxílico e conformação diferente do hidrocarboneto cadeia.



Fonte: Adaptado de Muro; Itoh; Hasegawa, 2010.

As bandas negativas apresentadas nas Figuras 16A e 16C em 1637 e 1678 cm^{-1} , respectivamente, estão relacionadas à deformação angular (*bending*) das moléculas de água na superfície da subfase no estado *close-packing*. Essas bandas são resultantes da diferença da refletividade da interface ar/água coberta e não coberta com a monocamada, e indicam que a orientação das moléculas de água na interface ar/água pode sofrer variações pela presença da monocamada espalhada (SACCANI *et al.*, 2004). Observando as bandas 1637 e 1678 cm^{-1} na presença do EE2, é possível notar que ocorre um aumento na largura das bandas. De acordo com Buffeteau *et al.*, (1999) esse resultado indica um aumento da espessura da monocamada. Tal resultado sugere a incorporação do EE2 na monocamada.

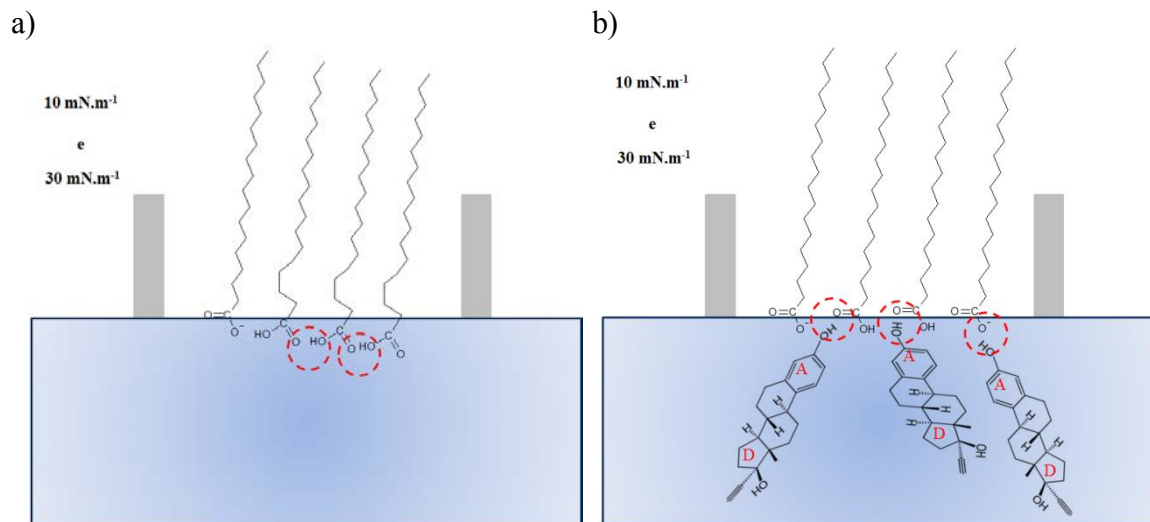
À pressão $10\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a banda 1705 cm^{-1} referente ao tipo III do estiramento $\text{C}=\text{O}$ do AE não é observada na presença do EE2. Apenas a banda em 1741 cm^{-1} referente ao tipo I do grupo $\text{C}=\text{O}$ é observada. O mesmo comportamento ocorre para a pressão de 30 mN m^{-1} em que a banda em 1707 cm^{-1} (tipo III) desaparece e intensifica a banda em 1747 cm^{-1} (tipo I).

Analisando o sistema geral pode-se concluir que na presença do EE2 a monocamada de AE tem a conformação tipo I favorecida, onde as moléculas de AE não estão fazendo ligações de hidrogênio umas com as outras, estando separadas e com o grupo C=O paralelo a água. Este resultado está de acordo com o observado pelas isotermas π -A (Figura 16), em que o deslocamento para maiores áreas é devido à presença de EE2 entre as moléculas de AE. Portanto, de acordo com o observado sugere-se que as ligações de hidrogênio passam a ocorrer entre o EE2 e grupo C=O do AE, diminuindo as interações entre as moléculas de AE.

Analisando as Figuras 16B e 16D é possível notar que a região hidrofóbica do AE não foi afetada pela presença do EE2, uma vez que nenhuma alteração foi observada nos estiramentos CH₂ simétrico e antissimétrico. Isto nos permite concluir que os estiramentos do grupo CH₃ (~2960 cm⁻¹) que aparece nos espectros de DODAB (Figura 10) e de DPPC (Figura 13) são referentes ao CH₃ da cabeça polar desses lipídios, e não da cauda, uma vez que o AE também apresenta um CH₃ na extremidade da região hidrofóbica e nenhuma banda foi observada no seu espectro.

Na Figura 18a observamos as possíveis conformações das moléculas de AE na subfase ar/água de acordo Muro, Itoh e Hasegawa, (2010). A Figura 18b ilustra as possíveis interações entre AE e o EE2, destacando a preferência da interação do grupo OH do anel-A com o grupo C=O da cabeça polar do AE.

Figura 18: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de AE na interface a) água/ar e b) com as moléculas de EE2 presentes na subfase nas pressões 10 e 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

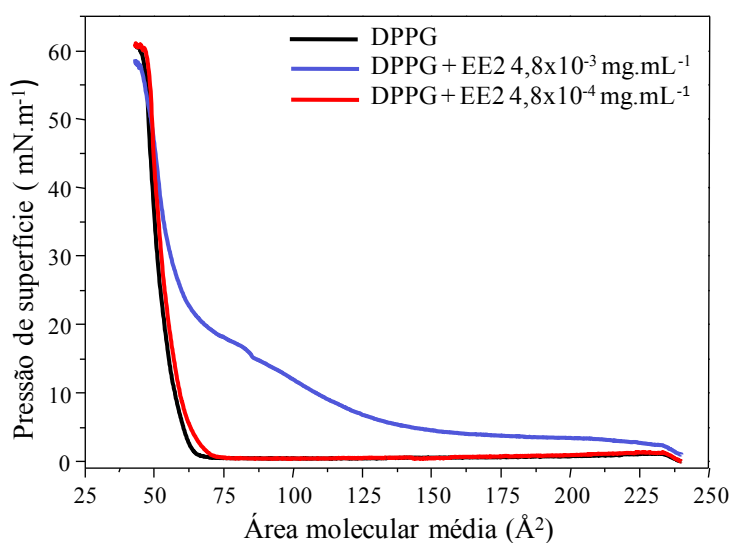


Fonte: Próprio autor.

5.1.3 Filmes de DPPG

A Figura 19 apresenta as isotermas π -A de DPPG na presença e na ausência de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ e $4,8 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase.

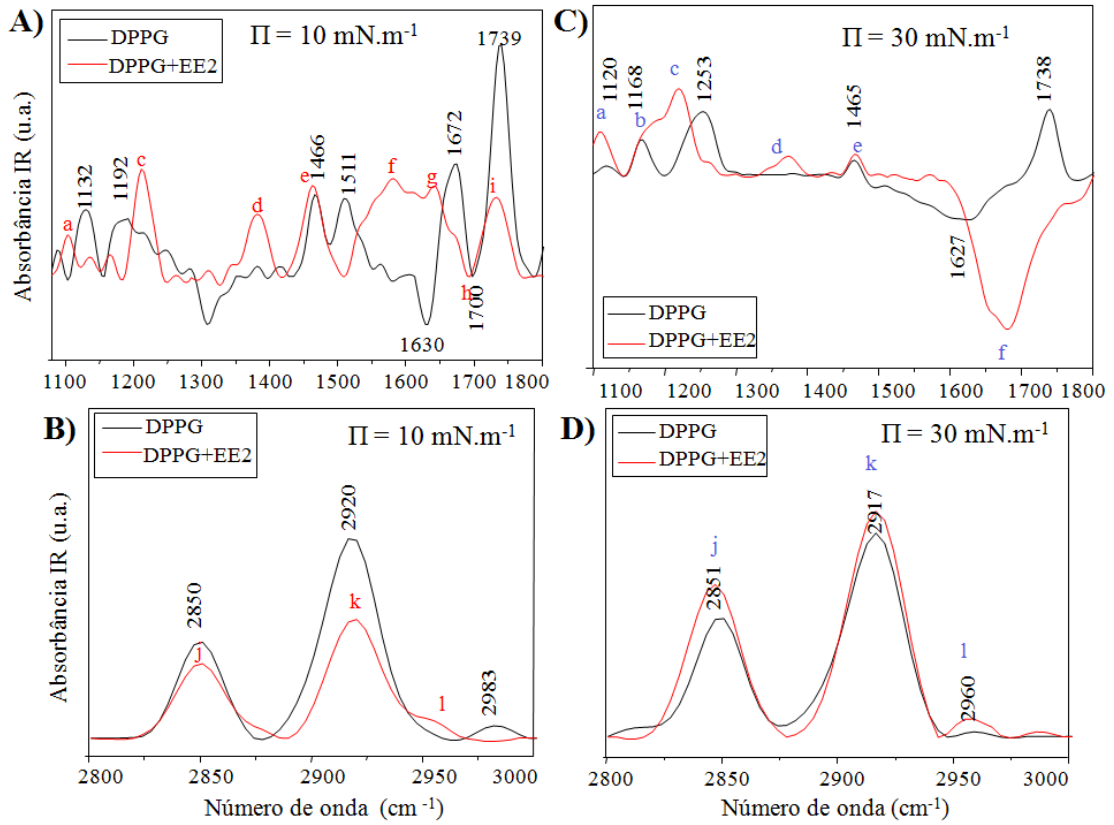
Figura 19: isotermas π -A do filme de Langmuir de DPPG na interface ar/água, na presença e na ausência de EE2 $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$ na subfase. Isotermas obtidas em triplicata.



Fonte: Próprio autor.

O deslocamento da isoterma π -A indica que o hormônio está presente na interface ar/água somente na fase líquida expandida. Esse deslocamento tem como possível causa a interação entre o OH do anel-A do EE2 com os grupos C=O e P=O do DPPG, assim como observado no estudo com DPPC. Porém, DPPG apresenta a cabeça polar com caráter negativo e EE2 apresenta dois grupos OH em suas extremidades. Portanto, com a compressão das barreiras, a repulsão entre as moléculas DPPG e EE2 pode expulsar o EE2 presente entre as moléculas de DPPG. A Figura 20 apresenta os espectros de PM-IRRAS dos filmes de DPPG (linha preta) e de DPPG na presença do EE2 (linha vermelha), nos intervalos de 1100 -1800 cm^{-1} e de 2800-300 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos nas pressões de superfície 10 e 30 mN.m^{-1} , cujos valores de bandas e as respectivas atribuições foram listadas na Tabela 3.

Figura 20: espectros de PM-IRRAS para filmes de DPPG sobre a subfase de água ultrapura (linha preta) e na presença de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase (linha vermelha). Espectros obtidos nas pressões de superfície 10 mN.m^{-1} (A e B) e 30 mN.m^{-1} (C e D), respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3: atribuições das bandas dos espectros de PM-IRRAS para as monocamadas de DPPG, na ausência e na presença de $4,8 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ de EE2 na subfase nas pressões 10 e 30 mN.m^{-1}

10 mN m^{-1}		30 mN m^{-1}		Atribuições
DPPG	DPPG/EE2	DPPG	DPPG/EE2	
1132	1103(a)	1120	1109(a)	P=O ¹
1192	-	1168	1187(b)	CO-O-C antissimétrico ²
-	1212(c)	1253	1218(c)	P=O antissim ^{1,9,10}
	1382(d)	-	1372(d)	C-O-H (fenol) ⁹
1466	1463(e)	1465	1469(e)	CH ₂ scissoring ^{1,2,3}
1511	-	1510	-	Deformação angular da água OH ^{3,4}
-	1579 (f)	-	-	C=C do anel
1630	1642(g)	1627	1681(g)	Deformação angular da água OH ^{3,4}
1739	1732(h)	1738	-	C=O ^{3,5,6,7}
2850	2851(i)	2851	2851(i)	CH ₂ simétrico ^{11,5}
2920	2917(j)	2917	2917(j)	CH ₂ antissimétrico ^{11,5}
2983	2958(k)	2960	2960(k)	CH ₃ ³

1-(NAKAHARA, LEE e SHIBATA, 2010); 2 – (SANDRINO *et al.*, 2014); 3- (GOTO e CASELI, 2014); 4- (CASELI *et al.*, 2013); 5- (GERALDO, 2013); 6-(CZAPLA;KORCHOWIEC; ROGALSKA, 2010); 7- (ALLOUCHE *et al.*, 2007); 8-(HUBNER; BLUME, 1998); 9- (LIN-VIEN *et al.*, 1991); 10- (ARRONDO, GOÑI e MACARULLA, 1984); 11- (LEWIS *et al.*, 1994).

Obs: As letras a, c, d, e, f, g, h, i, j e k (em vermelho) representam as bandas observadas nas figuras 13A e 13B. As letras a, b, c, d, e, g, i, j e k (em azul) representam as bandas observadas nas figuras 13C e 13D. Fonte Próprio autor.

Os espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPG na presença do EE2 na subfase apresentaram variações significativas nas bandas relacionadas à região hidrofílica do lipídio, como pode ser observado nas Figuras 20A e 20C. De especial relevância, foram observadas mudanças na banda correspondente à vibração do estiramento P=O, sensível a interações de hidrogênio (ARIMA, 2014). Na pressão 10 mN m⁻¹ Figura 20A a banda referente ao estiramento P=O do DPPG não aparece bem definida, mas na presença do EE2 esta banda aparece em 1212 cm⁻¹. Na pressão 30 mN m⁻¹ (Figura 20C) o estiramento P=O, quando exposto ao EE2, apresenta um deslocamento de 1253 para 1218 cm⁻¹. Deslocamentos para menores números de onda podem estar relacionados a mudanças nas ligações de hidrogênio do grupo P=O (GERALDO, 2013); (ARRONDO; GONI; MACARULLA, 1984); (PINHEIRO *et al.*, 2013); (WAGNER; DESBAT; BREZESINSKI, 2008); (HUBNER; BLUME, 1998). De acordo com os deslocamentos observados para DPPG e DPPC e (discutido previamente), podemos afirmar que EE2 realiza interações de hidrogênio com P=O, possivelmente por meio do grupo OH do anel-A, causando uma desorganização da monocamada.

Nas Figuras 20A e 20C é possível observar o estiramento C=O que aparece em 1739 e 1732 cm⁻¹, respectivamente na ausência e na presença de EE2 à pressão de 10 mN.m⁻¹. À 30 mN.m⁻¹, quando o DPPG é exposto ao EE2, observamos uma forte diminuição na intensidade da banda correspondente ao estiramento C=O. Assim como para o DPPC, a diminuição do número de onda do estiramento C=O, observado em 10 mN.m⁻¹, pode estar relacionada à hidratação desse grupo (PINHEIRO, 2013); (HÜBNER; BLUME, 1998); (ALLOUCHE *et al.*, 2007). Provavelmente essa hidratação ocorre através da interação de hidrogênio do C=O com as moléculas de água da subfase e/ou do grupo OH do anel-A do EE2. Em 30 mN.m⁻¹, a diminuição da intensidade da banda do C=O causada pela presença do EE2 tem como possível explicação a diminuição da repulsão entre as moléculas de DPPG. Provavelmente a

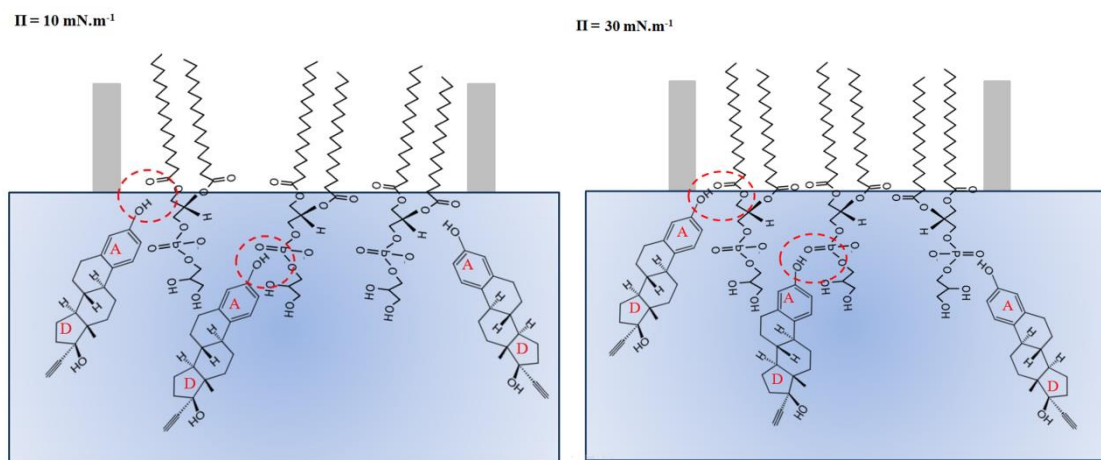
presença das moléculas de EE2 entre as moléculas de DPPG causam uma diminuição da repulsão entre as moléculas de DPPG tornando o filme estruturalmente semelhante ao DPPC na interface ar/água. Essa hipótese tem como fundamento a semelhança apresentada entre a banda do C=O do DPPC sem EE2 (Figura 13C) e do DPPG na presença do EE2 (Figura 20C). Outros fatores que comprovam a presença do EE2 na monocamada são as bandas que aparecem em ~ 1380 e em ~ 1580 cm^{-1} . Essas bandas são referentes ao C-O-H (fenol) do EE2 e ao C=C do anel A, respectivamente (LIN-VIEN et al., 1991); (SILVA, V.B., 2012).

As bandas referentes ao estiramento das cadeias alquílicas do DPPG aparecem em aproximadamente 2850 e 2920 cm^{-1} (Figura 20B e 20D), atribuídas respectivamente ao CH_2 simétrico e antissimétrico, as quais estão de acordo com a literatura (LEWIS et al, 1994)(GERALDO, 2013). Poucas variações foram observadas nos espectros referentes às cadeias alquílicas, resultado semelhante ao observado para DPPC, em que somente deslocamentos dos estiramentos CH_3 foram observados. No caso do DPPG, quando exposto a EE2, o estiramento CH_3 em 10 mN m^{-1} sofre um deslocamento de 2983 para 2958 cm^{-1} . Porém, a possibilidade de uma possível interação entre a cadeia alquílica do DPPG e o EE2 não é clara porque a esta pressão, 10 mN.m^{-1} , as moléculas de DPPG estão mais dispersas na monocamada (Figura 18) tornando difícil a análise de centros de interação. Além disso, na presença de EE2 não foi observada nenhuma alteração nos estiramentos CH_2 simétrico e antissimétrico. Em 30 mN.m^{-1} não foram observados deslocamentos dos grupos CH_2 (simétrico e antissimétrico) e CH_3 , confirmando que EE2 não interage com a cauda do lipídio.

A Figura 21 apresenta uma possível representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DPPG na interface ar/água com as moléculas de EE2 na subfase. Os resultados de PM-IRRAS mostraram que as perturbações observadas nas isotermas de Langmuir de DPPG ocorreram devido a interações do EE2 com a região hidrofílica do lipídio. Foi observado que os principais deslocamentos ocorrem na região do

C=O e do P=O através de interações de hidrogênio do grupo OH do anel-A do EE2, resultado semelhante ao observado para o DPPC.

Figura 21: representação esquemática das possíveis orientações e interações das moléculas de DPPG na interface ar/água com as moléculas de EE2 presentes na subfase em diferentes pressões de superfície.



Fonte: Próprio autor.

VI – CONCLUSÃO

Neste trabalho foram estudadas interações entre monocamadas compostas por moléculas anfifílicas e um hormônio estrógeno, EE2, por meio das técnicas de Langmuir e PM-IRRAS. Obteve-se isothermas π -A de DODAB, DPPC, DPPG e AE, na ausência e na presença de EE2 $4,8 \times 10^{-3}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹ na subfase.

Os resultados para filmes de Langmuir e PM-IRRAS de DODAB mostraram que a interação DODAB/EE2 ocorre basicamente por interação atrativa entre a cabeça polar (positiva) de DODAB e os grupos OH (negativos) dos anéis A e D do hormônio, principalmente o anel A.

As interações DPPC/EE2 ocorreram, principalmente, por interações de hidrogênio entre a hidroxila do anel-A do EE2 com os grupos C=O e P=O do fosfolípido. Porém, à pressão de 10 mN.m⁻¹ foi possível observar também interação entre a região positiva do DPPC (N-(CH₃)₃) e as hidroxilas dos anéis A e D do EE2.

A interação DPPG/EE2 também foi mais significativa na região hidrofílica de DPPG. Analogamente ao DPPC, houve uma perturbação na membrana devido a interação da hidroxila do anel-A de EE2 e os estiramentos C=O e P=O do DPPG. Devido à extremidade negativa da cabeça polar do DPPG (PO₂⁻), as repulsões entre as hidroxilas de EE2 e o DPPG se mostraram mais significativas na fase condensada do filme.

Na interação AE/EE2 observou-se uma preferência do EE2 em interagir com a cabeça polar do ácido graxo ao invés da cauda, resultado semelhante aos outros lipídios estudados. Os resultados mostraram que o anel-A da hidroxila do EE2 interage com o grupo C=O do AE, formando ligações de hidrogênio.

Portanto, de modo geral, os resultados obtidos para o DPPC, o DPPG e o AE mostraram que as interações EE2/lipídio foram moduladas pela natureza química dos lipídios,

dependendo pouco da carga da cabeça. Além disso, foi observado que o EE2 não interage com a cadeia hidrofóbica. Como complementação deste trabalho propõe-se análises dos filmes de Langmuir de DODAB, DPPG e DPPC variando-se o pH da subfase, de preferência, em tampão. Em seguida estudar a interação com colesterol.

Referências

ALLOUCHE, M.; CASTANO S, COLIN D, DESBAT B, KERFELEC B. Structure and orientation of pancreatic colipase in a lipid environment: PM-IRRAS and brewster angle microscopy studies. **Biochemistry**, v. 46, p. 15188-15197, 2007.

AOKI, P. H. B.; CAETANO, W ; VOLPATI, D ; RIUL, A., JR.; CONSTANTINO, C. J. L. Sensor Array Made with Nanostructured Films to Detect a Phenothiazine Compound, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 8, p. 4341-4348, 2008.

ARIMA, A.A.; Estudo da interação da Natamicina com membranas fosfolipídicas incorporadas de esteróis. Dissertação, 2014.

ARRONDO, J. L. R.; GONI, F. M.; MACARULLA, J. M. Infrared spectroscopy of phosphotidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 794, p. 165-168, 1984.

ARUKWE, A. Cellular and molecular responses to endocrine: modulators and the impact on fish reproduction. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 643-655, 2011.

BARNER, B. J.; GREEN, M. J; SBEZ, E. I.; CORN, R. M. Polarization modulation Fourier transform infrared reflectance measurements of thin films and monolayers at metal surfaces utilizing real-time sampling electronics. **Analytical Chemistry**, v.63, p. 55-60, 1991.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22339/#3664>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

BUFFETEAU, T.; BLAUDEZ, D.; PERE, E.; DESBAT, B. Optical Constant Determination in the Infrared of Uniaxially Oriented Monolayers from Transmittance and Reflectance Measurements. **Journal Physical Chemistry B**, v. 103, n. 24, p. 5020-5027, 1999

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p.651-666, May/June 2007.

BLAUDEZ, D.; BUFFETEAU, T.; CORNUT, J. C.; DESBAT, B.; ESCAFRE, N.; PEZOLET, M.; TURLET. J. M. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied Spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 869-874, 1993.

BLAUDEZ, D.; BUFFETEAU, T.; CORNUT, J. C.; DESBAT, B.; ESCAFRE, N.; PEZOLET, M.; TURLET. J. M. Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air -water interface. **Thin Solid Films**, v. 242, n. 1-2, p. 146-150, 1994.

BLUME, A. A comparative study of the phase transition of phospholipid bilayer and monolayers. *Bioquímica Biophysica Acta*, v. 557, n. 1, p. 32-44, 1979.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. São Paulo: Artmed, 2000.

CZAPLA, K.; KORCHOWIEC, B.; ROGALSKA, E. Differentiating oxicam nonsteroidal anti-inflammatory drugs in phosphoglyceride monolayers. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3485-3492, 2010.

DAY, C.; HAWKINS, M. **O estrogênio através do ciclo da vida: função e disfunção endócrinas. Nosso futuro roubado**, 1999. Tradução livre de Luiz Jacques Saldanha, fev. 2002, revisada em jan. 2004. Disponível em: <<http://www.nossofuturoroubado.com.br/old/ciclo.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

DIMITROV, O. A.; LALCHEV, Z. I. Interaction of sex hormones and cholesterol with monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine in different phase state. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, n. 1-2, p. 55-61, July 1998.

FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA, O. N. Characterization techniques to investigate molecular-level interactions in Langmuir and Langmuir-Blodgett. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 502-510, May/June 2005.

GERALDO, V. P. N. **Interação do ibuprofeno e capsaicnóides com filmes de Langmuir e Langmuir Blodgett contendo fosfolipídios**. 2013. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

GOTO, T. E.; CASELI, L. The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 431, p. 24-30, Oct. 2014.

GREEN, M.; BARNER, B. J.; ARN, R. M. Real-time sampling electronics for double modulation experiments with Fourier transform infrared spectrometers. **Reviews in Science and Instrumentation**. v. 62, n. 6 , p. 1426-1430, 1991.

GUIMARÃES, T. S. **Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17 B-estradiol (E2), Estriol (E3), Estrona (E1) E 17 A- Etinilestradiol (EE2) em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos-SP**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, p. 27-40, 2006.

HÜBNER, W.; BLUME, A. Interactions at the lipid: water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1-2, p. 99-123, Nov. 1998.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the bandagram per liter range. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 15, p. 3201-3206, 2001.

KWON, J. H.; LILJESTRAND, H. M.; KATZ, L. E. Partitioning of moderately hydrophobic endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1984-1992, Aug. 2006.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917.

LEVY, C. Outro alerta sobre a água que bebemos. **Jornal da Unicamp**, Campinas, 4 dez. 2006. Disponível em:
<http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/dezembro2006/ju346pag03.html>.
Acesso em: 08 out. 2012.

LEWIS, R. N.; MCELHANEY, R.N.; POHLE, W.; MANTSCH, H. H. Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. **Biophysical Journal**, v. 67, n. 6, p. 2367-2375, 1994.

LIN-VIEN, D. et al. **The handbook of infrared and raman characteristics frequencies of organic moleculars**. Boston: Academic Press, 1991.

LOPES, L.G. MARCH, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A.. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região do Jaboticabal-São Paulo. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.
MACPHAIL, R. A. et al. C-H stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 2. Long, all-trans chains. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 334-341, 1984.

LOPEZ, R.F.; NOBRE, T.M.; ACCARDO, C.M; FILHO, P.C.P.; NADER, H.B.; LOPES, C.C., CESELI, L. Effect of carrageenans of different chemical structures in biointerfaces: A Langmuir film study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 111, p. 530-535, 2013.

MACPHAIL, R. A.; STRAWS, H. L.; SNYDER R. G.; ELLIGER, C. A. C-H Stretching Modes and the Structure of n-Alkyl Chains. 2. Long, All-Trans Chains. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 334-341, 1984.

MARCANTONIO, A. S.; VIEIRA, E. M. Hormônio feminino pode ser uma ameaça aos peixes. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 107, dez. 2011. Disponível em:
<http://www.aptaregional.sp.gov.br/index.php/component/docman/doc_view/1248-hormonio-feminino-pode-ser-uma-ameaca-aos-peixes?Itemid=284>. Acesso em: 08 out. 2012.

MARIN, M. G.; MATOZZO, V. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 9-10, p. 835-839, May 2004.

MARTINS, A. C. **Membrana plasmática**: o que é? Texto publicado no blog Primeiro Ano A, 5 dez. 2012. Disponível em:
<<http://bilogiaprimeiroano.blogspot.com.br/2012/12/membrana-plasmatica-o-que-e-e-uma.html>>. Acesso em: 30 jul. 2014.

MCEWEN, B. S. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 141-147, 1991.

MENDELSON, R.; FLACH, C. R. *Infrared Reflection–Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air–Water Interface*. Newark, 2002

MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, n. 4, p. 8788-800, Apr. 2010.

MURO, M.; ITOH, Y.; HASEGAWA, T. A Conformation and Orientation Model of the Carboxylic Group of Fatty Acids Dependent on Chain Length in a Langmuir Monolayer Film Studied by Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. . **Journal of Physical Chemistry B**. v. 114, n. 35, p. 11496-11501, 2010.

NAKAHARA, H.; LEE, S.; SHIBATA, O. Specific interaction restrains structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems: An in situ PM-IRRAS investigation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1798, n. 6, p. 1263-1271, 2010.

NAKATA, S. et al. Inter actions between sex hormones and a 1,2-Di-O-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine molecular layer: characteristics of the liposome, surface area versus surface pressure of the monolayer, and microscopic observation. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**,v. 84, n.3, p. 283-289, 2011.

NOPPE, H.; LE BIZEC, B.; VERHEYDEN, K.; DE BRABANDER, H. F. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, n. 1, p. 1-16, Mar. 2008.

PAIVA, L. B.; MORELES, A. R.; DÍAS, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, São Paulo, v. 54, n. 330, Apr./June 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0366-69132008000200012>>. Acesso em: 15 out. 2013.

PALUMBO, A.J.; KOIVUNEN, M.; TJEERDEMA, R. S. Optimization and validation of a California halibut environmental estrogen bioassay using a heterologous ELISA. *Science of the total environment*. v. 407, n. 2, p. 953-961, 2009.

PARISOTTO, L. Diferenças de gênero no desenvolvimento sexual: integração dos paradigmas biológicos, psicanalítico e evolucionista. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 25, Apr. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81082003000400009>>. Acesso em: 10 out. 2012.

PETTY, M. C. **Langmuir-blodgett films**: an introduction. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

PINHEIRO, M. et al. Effects of a novel antimycobacterial compound on the biophysical, 2013. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1-2, p. 268-277, June 2013.

RAW, I.; MENNUCCI, L.; MAIA, J. C. C. **Hormônios**: mecanismo em ação. São Paulo: Edart, 1969.

- REIS FILHO, R. W.; ARAUJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 817-822, July/Aug. 2006.
- REY, P. **Os hormônios**. São Paulo: Difusão Europeia do Livro, 1964.
- SANDRINO, B.; TOMINAGA, T. T.; NOBRE, T. M.; SCORSIN, L.; WROBEL, E. C.; FIORIN, B. C.; DE ARAUJO, M. P.; CASELI, L.; OLIVEIRA JR, O. N.; WOHNATH, K. Correlation of [RuCl₃(dppb)(Vpy)] Cytotoxicity with its Effects on the Cell Membranes: An Investigation Using Langmuir Monolayers as Membrane Models. **Journal Physical Chemistry B**. 2014, v. 118, n.36, p. 10653–1066, 2014.
- SACCANI, J.; CASTANO, S.; BEAURAIN, F.; LAGUERRE, M.; DESBAT, B. Stabilization of phospholipid multilayers at the air-water interface by compression beyond the collapse: A BAM, PM-IRRAS and Molecula Dynamics. **Langmuir**. v.20, n. 21, p. 9190-9197, 2004.
- SHEIDT, A. H.; BANDEAU, R. M.; HUSTER, D. Investigating the membrane orientation and transversal distribution of 17 β - estradiol in lipid membrane by solid-state NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 4-5, p. 356-361, 2010.
- SILVA, M. D. **Desenvolvimento e avaliação de um gerador programável ou pulsos monofásicos de campo elétrico para eletroporação**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- SILVA, V.B. Determinação simultânea de etinilestradiol e drospirenona em contraceptivos orais por cromatografia em fase líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. 2012. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamento) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- SOLÉ, M., CASTILLO, M.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Estrogenicity determination in carp, *Cyprinus carpio*: a laboratory and field approach. **Analisis**, v. 28, n. 9, p. 783-788, 2000.
- TANFORD, C. **The hydrophobic effect of formation of micelles and biological membranes**. Wiley. New York. 1973
- TORRES, N. H. **Monitoramento de resíduos dos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e estriol em águas de abastecimentos urbano na cidade de Piracicaba-SP**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Removal of endocrine disruptor chemicals using water treatment processes**. Washington, 2001.
- VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD, (2010). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000900003>>. Acesso em: 08 out. 2012.
- VIDIGAL, K. F. **Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

YAMAMOTO, F. Y. **Efeitos do 17 α -etinilestradiol em *geophagus brasiliensis* e expressão da vitelogenina como um biomarcador de desregulação endócrina em peixes**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

YING, G.; KOOKANA, R. S.; AND RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545-551, Dec. 2002.