

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

(POSMAT)

**Interação do hormônio 17 α -etinilestradiol e modelos complexos da
membrana celular**

Gilia Cristine Marques Ruiz

Presidente Prudente/SP
2020

Gilia Cristine Marques Ruiz

**Interação do hormônio 17 α -etinilestradiol e modelos complexos da
membrana celular**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor junto à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), área de Ciência dos Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Presidente Prudente/SP
2020

Ruiz, Gilia Cristine Marques

R934i

Interação do hormônio 17α -etinilestradiol e modelos complexos da membrana celular / Gilia Cristine Marques Ruiz. - Presidente Prudente, 2020
127 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente
Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

1. Modelos de membrana. 2. Filmes de Langmuir. 3. Vesículas unilamelares gigantes Lipídios. 4. Lipídios. 5. 17α -etinilestradiol. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE GILIA CRISTINE MARQUES RUIZ, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 27 dias do mês de novembro do ano de 2020, às 14:00 horas, no(a) por videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de GILIA CRISTINE MARQUES RUIZ, intitulada **Interação do hormônio 17-etinilestradiol e modelos complexos da membrana celular**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / UNESP/Câmpus de Presidente Prudente, Profa. Dra. KARIN DO AMARAL RISKE (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biofísica / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP, Prof. Dr. LUCIANO CASELI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Exatas e da Terra / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema, Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual) do(a) Departamento Engenharia de Biossistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã, Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras de Assis. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

“E, sobre tudo isto, revesti-vos de amor, que é o vínculo da perfeição.”

(Colossenses 3:14)

Agradecimentos

Ao meu orientador Casé, por ter me recebido tão bem no grupo e ter confiado em mim. A sua inteligência e seu caráter para conduzir circunstâncias da vida e da ciência nos incentiva, nos inspira e dignifica nossa profissão. Obrigada pelas importantes, raras e indispensáveis lições transmitidas. De fato, este parágrafo não seria suficiente para descrever o privilégio que tenho em ser aluna e amiga do professor Casé.

Aos meus grandes amigos Wally, Diego, Luis, Leo e Mzinho, por me ajudarem em tudo e por estarem sempre comigo. Sempre mesmo. São muitas horas diárias convivendo no laboratório, e mesmo assim, ainda almoçamos juntos, jantamos juntos, saímos juntos, viajamos juntos...ufa! Obrigada por terem cruzado meu caminho.

Aos meus amigos que passaram pelo NOIX nesses anos, aos que permanecem no grupo, e aos que ainda irão fazer parte: Sabrina, Pedro, Mzão, Rafa, Henry, Cibely, Tati, Marcelo, Jaqueline, Malu, Matheus e João. Em especial à Pri, por ser sempre tão carinhosa e estar sempre disposta a ouvir e ajudar.

Ao prof. Chu da USP de São Carlos, pela valiosa colaboração na discussão de trabalhos e pela na disponibilização de seu laboratório.

A todos os professores e funcionários do DFQB e POSMAT/Bauru que contribuíram para minha formação e para a realização desse trabalho.

Ao professor Ludovico Valli, meu orientador durante o doutorado sanduíche. À dra Livia Giotta, por ter me ajudado com a adaptação. Aos amigos de laboratório, Simona, Gabrielle, Rosana, Francesco e Paola, pelos inúmeros cafés e por todo o apoio. Em especial, à minha amiga Simona Giaffreda, por me proporcionar os dias mais incríveis e felizes na Itália. *Grazie tante a tutti voi.*

À toda equipe do colégio Ômega e aos meus alunos tão queridos.

A todos os amigos que fiz na UNESP. Em especial aos amigos do SITRA e da Atlético, que me proporcionaram bons momentos no esporte, fundamentais para minha saúde física e mental.

Aos meus amigos antigos, que permanecem fazendo parte da história da minha vida, Tutti, Marcos, Tabata, Bruna e Gabi.

Aos meus pais e toda minha família, pelas orações, todo amor e os momentos de alegria que vivo com vocês.

Ao Bruno, pelo seu amor e pela sua dedicação a mim. Obrigada pela força e tranquilidade que você me transmite. Obrigada por ficar feliz com os passos que dou na vida.

À Lisa, Tica e Polaca, que alegram tanto os meus dias.

Ao meu Deus, que é o meu refúgio, e aquele me sustenta.

Ao suporte financeiro dado pela FAPESP, CNPq e INCT/INEO.

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

Resumo

Os danos causados à saúde humana pela exposição prolongada a contaminantes emergentes, como hormônios, são ligados à ação em nível molecular desses compostos na membrana plasmática. Portanto, este trabalho investigou o efeito (causas e consequências) do hormônio 17 α -etinilestradiol (EE2) em mono- e bi-camadas lipídicas: filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs), respectivamente. Tais sistemas são formados por misturas binárias e ternárias de componentes que representam os principais grupos lipídicos das células: 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DPPC), colesterol (Chol), esfingomielina (SM) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilocolina (POPC). As isothermas π -A mostraram que o EE2 interage na interface líquido/ar com todas as composições de monocamadas, com maior efeito para as binárias contendo 30% de Chol (DPPC/Chol e SM/Chol) e para as monocamadas puras de POPC e SM. No caso das ternárias de DPPC/Chol/SM, em regiões de altas pressões superficiais, a presença do hormônio causou o deslocamento da isoterma π -A para menores áreas. As medidas de PM-IRRAS indicaram que as interações eletrostáticas do EE2 com grupos polares da cabeça do DPPC e SM foram mantidas nas misturas binárias e ternárias, causando mudanças no ordenamento das caudas de tais lipídios nestas monocamadas mistas. As bandas referentes à região da cauda do POPC sofreram grandes mudanças na presença do EE2, indicando a presença do hormônio nas cadeias hidrofóbicas do fosfolípido. Nas GUVs, o EE2 causou uma alteração no formato esférico das vesículas de DPPC e a perda de contraste de fase nas vesículas compostas por DPPC/Chol e DPPC/SM. Estes dois efeitos foram verificados simultaneamente nas GUVs compostas por SM/Chol. Efeitos como ruptura das vesículas e formação de novas estruturas (*buds* e cordões lipídicos) foram verificados para as GUVs de DPPC/SM/Chol 1/1/1 e POPC, respectivamente. Este trabalho contribui para uma melhor compreensão dos efeitos interfaciais do hormônio EE2 sobre estruturas lipídicas e permite uma correlação com os processos biológicos que ocorrem *in-vitro* ou *in-vivo*.

Palavras chave: Modelos de membrana; filmes de Langmuir; vesículas unilamelares gigantes; lipídios; 17 α -etinilestradiol.

Abstract

The damages in human health caused by the prolonged exposure to emerging contaminants, such as hormones, is related to the action of these compounds at the molecular level on the plasma membrane. Therefore, this work investigated the effect (causes and consequences) of the hormone 17 α -ethinylestradiol (EE2) in mono and lipid bilayers, composed of Langmuir films and giant unilamellar vesicles (GUVs), respectively. Such systems were formed using binary and ternary mixtures of the components that represent the main lipid groups of cells: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol (Chol), sphingomyelin (SM) and 1-palmitoyl -2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC). The π -A isotherms showed that EE2 interacts at the liquid/air interface with all monolayer compositions, with the higher effect on binary mixtures containing 30% Chol (DPPC/Chol and SM/Chol) and for both neat monolayer of POPC and SM. In the case of the ternaries of DPPC/Chol/SM, at high surface pressures, the presence of the hormone caused the displacement of the π -A isotherm to smaller areas. The PM-IRRAS measurements indicated that the electrostatic interactions of EE2 with groups of the polar head of DPPC and SM were kept in the binary and ternary mixtures, causing changes in the ordering of the tails of such lipids in the mixed monolayers. The bands referring to the POPC tail region underwent the major changes in the presence of EE2, indicating the presence of the hormone in the hydrophobic phospholipid chains. In GUVs, EE2 caused changes in the spherical shape of the neat DPPC vesicles and the loss of phase contrast in the vesicles composed of DPPC/Chol and DPPC/SM. These two effects were verified simultaneously in the GUVs composed by SM/Chol. Other effects such as rupture of vesicles and formation of new structures (buds and lipid protrusion) were verified for the DPPC/SM/Chol 1/1/1 and POPC GUVs, respectively. This work brings an understanding of the interfacial behavior of the hormone EE2 on lipid structures and allows correlations with biological processes that take place *in-vitro* and *in-vivo*.

Keywords: Membrane models; Langmuir films; giant unilamellar vesicles; lipids; 17 α -ethinylestradiol.

Lista de Figuras

Figura 1: a) representação esquemática da modelo de proteína-lipídio-proteína de Danielli e Davson (1935) e b) micrografias eletrônicas de células, retirada do artigo de Michael Edidin⁴⁶, que reproduz o trabalho de Robertson⁵⁰, no qual ele se utilizou de vários exemplos para evidenciar que todas as membranas das organelas celulares têm uma estrutura comum. Imagem usada com permissão da revista.23

Figura 2: representação da estrutura básica das membranas biológicas: uma bicamada lipídica na qual as proteínas integrais de membrana estão incorporadas. Fonte: figura adaptada de Nelson e Cox⁵⁴ e usada com permissão da editora.24

Figura 3: ilustração das estruturas moleculares dos constituintes da membrana plasmática das células eucariontes animais.25

Figura 4: distribuição lipídica nas diferentes organelas das células dos mamíferos. Os principais lipídios são listados em porcentagem, do mais abundante para o menos abundante de acordo com sua contribuição para o total de lipídios de cada organela. BMP: bis-monoacilglicerol-fosfato; Chol: colesterol; CL: cardiolipina; PtdCho: fosfatidilcolina; PtdEtn: fosfatidiletanolamina; PtdIns: fosfatidilinositol; PtdSer: fosfatidilserina; SM: esfingomielina. As ilustrações não se encontram em escala. Adaptado de Rosselló et al⁷¹. Imagem usada com permissão da revista.27

Figura 5: ilustração das fases de uma bicamada composta por um único lipídio e com a adição do colesterol.....28

Figura 6: estruturas de diferentes organizações lipídicas em soluções e em superfícies. Adaptado de Lee⁸⁰, com permissão da editora.29

Figura 7: texto extraído da revista *Nature*, de 12 de março de 1891, acompanhado de uma tradução para o português. Imagem usada com permissão da revista.31

Figura 8: representação esquemática da obtenção das monocamadas de Langmuir. A) composto organizado na interface ar/água em uma cuba de Langmuir; B), C) e D) estágios de compressão da monocamada e as correspondentes isotermas de pressão por área de superfície (π -A).33

Figura 9: esquema ilustrativo das diferentes vesículas que podem ser formadas a partir de bicamadas lipídicas. Adaptado de Pazin¹⁰⁵, com permissão do autor.34

Figura 10: estruturas químicas dos materiais utilizados.38

Figura 11: fotografia digital do aparato acoplado ao gerador de função para a realização da eletroformação, com um aumento para mostrar suporte de teflon com os fios de platina.	43
Figura 12: ilustração do processo de formação de GUVs pelo método gel.	44
Figura 13: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ$ C para as monocamadas de DPPC, colesterol e misturas de DPPC/Chol (nas frações molares de colesterol $x_{\text{Chol}} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura. A área molecular média dos filmes mistos é dada considerando somente a área ocupada pelo DPPC.	45
Figura 14: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ$ C para as monocamadas de DPPC, colesterol e misturas de DPPC Chol (nas frações molares $x_{\text{Chol}} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura ou EE2 $10 \mu\text{M}$	47
Figura 15: (A) curvas do C_s^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPC, Chol e mistas ($X_{\text{Chol}} 0,3; 0,5$ e $0,7$) obtidas das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras C_s^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ (cinza).	48
Figura 16: área de excesso (A_{exc}) em função da fração molar de Chol em monocamadas de DPPC formadas em água ultrapura (A) e água ultrapura contendo $10 \mu\text{M}$ EE2 (B)..	49
Figura 17: espectros de PM-IRRAS registrados para as monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} em água ultrapura como subfase para DPPC (linha preta) e DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ (linha azul) ou subfase contendo $100 \mu\text{M}$ de EE2: linha preta tracejada para DPPC e linha azul tracejada para a mistura binária. ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.	51
Figura 18: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas puras de DPPC, Chol e da mistura binária DPPC/Chol.	54
Figura 19: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ$ C para as monocamadas de DPPC, esfingomielina e misturas de DPPC/SM (nas frações molares $x_{\text{SM}} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura.	55
Figura 20: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ$ C para as monocamadas de DPPC, SM e misturas de DPPC/SM (nas frações molares $x_{\text{SM}} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura ou EE2 $10 \mu\text{M}$. A área molecular média dos filmes mistos é dada considerando somente a área ocupada pelo DPPC.	57

Figura 21: (A) curvas Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPC, SM e mistas (x_{SM} 0,3; 0,5 e 0,7) obtida das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ (cinza).58

Figura 22: área de excesso (A_{exc}) em função da fração molar de SM em monocamadas de DPPC formadas em água ultrapura (A) e água ultrapura contendo $10 \mu\text{M}$ EE2 (B).58

Figura 23: espectros de PM- para as monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} para SM em água ultrapura como subfase (linha preta) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha vermelha). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.60

Figura 24: espectros de PM-IRRAS para as monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} para a mistura binária DPPC/SM, $x_{SM} = 0,3$ em água ultrapura como subfase (linha verde escuro) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha verde claro). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.63

Figura 25: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas pura de DPPC, SM e da mistura binária DPPC/SM.65

Figura 26: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ para as monocamadas de SM, colesterol e misturas de SM/Chol (nas frações molares de colesterol $x_{Chol} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) em subfase contendo água ultrapura.....66

Figura 27: grupos funcionais de moléculas biológicas envolvidas na ligação de hidrogênio. Estrutura molecular da SM e DPPC: os grupos aceptores de ligações de hidrogênio estão indicados com setas azuis e os doadores com setas vermelhas. Adaptado de Slotte¹⁵¹.68

Figura 28: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ para as monocamadas de SM, Chol e misturas de SM/Chol (nas frações molares $x_{SM} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura ou EE2 $10 \mu\text{M}$. A área molecular média dos filmes mistos é dada considerando somente a área ocupada pela SM.....68

Figura 29: (A) curvas Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de SM, Chol e mistas (x_{Chol} 0,3, 0,5 e 0,7) obtida das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ (cinza).70

Figura 30: área de excesso (A_{exc}) em função da fração molar de Chol em monocamadas de SM formadas em água ultrapura (A) e em água ultrapura contendo 10 μ M EE2 (B).
.....71

Figura 31: espectros de PM-IRRAS das monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} para a mistura binária SM/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ em água ultrapura como subfase (linha rosa) ou subfase contendo 10 μ M de EE2 (linha rosa claro). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.72

Figura 32: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas pura de SM, Chol e da mistura binária SM/Chol.74

Figura 33: isothermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ na subfase contendo água ultrapura (linha sólida) ou água ultrapura contendo 10 μ M EE2 (linha pontilhada) para as monocamadas mistas de DPPC/Chol/SM, nas proporções molares 1/1/1 (A) e 7/2/1 (B).75

Figura 34: (A) curvas Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas formadas pela mistura ternária de DPPC/Chol/SM nas proporções molares 1/1/1 e 7/2/1, obtidas das isothermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isothermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de 10 μ M (cinza).76

Figura 35: espectros de PM-IRRAS das monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} formadas pela mistura ternária DPPC/Chol/SM na proporção molar 7/2/1 em água ultrapura como subfase (linha roxa) ou subfase contendo 10 μ M de EE2 (linha roxo-claro). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.
.....77

Figura 36: ilustração da organização da monocamada mista de DPPC/Chol/SM em (A) água ultrapura, (B) na presença de EE2 na subfase, mostrando a diferença na organização do colesterol na presença do EE2. O tamanho das moléculas e as áreas ocupadas na interface não estão em escala.....79

Figura 37: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas de DPPC/Chol/SM.
.....79

Figura 38: isothermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para as monocamadas de POPC na subfase contendo água ultrapura ou EE2 10 μ M.80

Figura 39: (A) curvas de Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de POPC obtidas das isothermas π -A na subfase contendo água ultrapura (linha preta) ou 10 μ M de EE2 (linha cinza). (B) Gráfico de barras Cs^{-1} obtido das isothermas π -A de POPC

em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ (cinza).	82
Figura 40: espectros de PM-IRRAS das monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} formadas pelo POPC em água ultrapura como subfase (linha preta) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha cinza). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico.	83
Figura 41: resumo dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas de POPC.	85
Figura 42: microscopias de contraste de fase obtidas para GUVs DPPC na presença de $100 \mu\text{M}$ EE2 após 1 (A), 5 (B) e 20 (C) minutos de exposição ao hormônio.	86
Figura 43: diferenças entre a forma da fase de gel- $\text{P}\beta'$ para GUVs de DPPC (A) e o formato adquirido na presença de EE2 (B).	87
Figura 44: micrografias de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol, $X_{\text{Chol}}=0,3$; expostas ao EE2 e coletadas com 0 minutos (A) e depois de 10 minutos (B) de aquisição.	87
Figura 45: imagens de contraste de fase de GUVs de SM que mostram as vesículas intactas mesmo após 30 minutos da adição do EE2.	89
Figura 46: imagens de microscopia de fluorescência de GUVs, com diferentes tamanhos, da mistura binária DPPC/SM, contendo $X_{\text{SM}}=0,3$; coletadas ao longo de 30 minutos, na ausência do EE2.	90
Figura 47: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/SM, $X_{\text{SM}}=0,3$; expostas ao EE2 e coletadas com 0 minutos (A), 7 minutos (B) e depois de 20 (C) minutos de aquisição.	91
Figura 48: imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs da mistura binária SM/Chol contendo $x_{\text{Chol}}=0,3$; coletadas ao longo de 30 minutos, na ausência do EE2.	92
Figura 49: imagem de microscopia de contraste de fase das GUVs da mistura binária SM/Chol, contendo $X_{\text{Chol}}=0,3$; coletadas 10 minutos após a adição do EE2. As setas azuis indicam o formato não esférico adquirido pelas vesículas e as setas vermelhas mostram a perda de contraste de fase.	93
Figura 50: (A) imagens de contraste de fase e (B) de fluorescência com o marcador rodanina-B, (0,5% em mol) de GUVs de DPPC/Chol/SM, 7/2/1, analisadas na ausência do EE2; (C) imagens de contraste de fase das GUVs de DPPC/Chol/SM, 7/2/1 após a adição de $10 \mu\text{M}$ de EE2 ao meio contendo as GUVs.	94

Figura 51: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas no momento do rompimento da GUV, após 6 min de aquisição em uma temperatura de 23° C. As setas indicam a formação de uma abertura na membrana, antes do rompimento total.95

Figura 52: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas no momento do rompimento da GUV, após 8 min de aquisição em uma temperatura de 23° C. As setas indicam a formação de uma abertura na membrana, antes do rompimento total.95

Figura 53: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas no momento da “explosão” da GUV, após 11 min de aquisição em uma temperatura de 23° C.95

Figura 54: (A) imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas na ausência do EE2 após 1 hora e 30 min e (B) 35 minutos após a adição do EE2.97

Figura 55: (A) imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de POPC coletadas na ausência do EE2 após 30 min de análise.97

Figura 56: diferentes efeitos em GUVs de POPC expostas ao EE2 (10 μ M): (A) formato pera e esférico, (B) criação de *buds* e (C) formação de protrusões tubulares. O tempo de análise é mostrado na parte superior de cada imagem capturada.98

Figura 57: ocorrência simultânea dos efeitos do EE2 (10 μ M) causados em GUVs de POPC. A seta verde indica a mudança das GUVs do formato pera para o formato esférico; a seta laranja indica a formação dos *buds* (GUVs “filhas”) e a seta azul a criação da protrusão lipídica. O tempo de análise é mostrado na parte superior de cada imagem capturada.99

Figura 58: (A) imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de POPC coletadas 40 minutos após a adição do EE2. (B) Representação esquemática do mecanismo de formação do cordão de vesículas como resultado da exposição das GUVs de POPC ao EE2 (10 μ M).100

Figura 59: resumo dos efeitos do EE2 sobre as bicamadas lipídicas.102

Lista de Tabelas

Tabela 1: características dos hormônios estrógenos.....	20
Tabela 2: parâmetros de empacotamento determinados pela forma dos lipídios e tipos de estruturas agregadas formadas. Adaptado de IOP ⁸² , com permissão do site.....	30
Tabela 3: massa molar, pureza e marca dos materiais utilizados	37
Tabela 4: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas de DPPC e DPPC/X _{Chol} =0,3, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2 ..	51
Tabela 5: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas de DPPC e DPPC/X _{SM} =0,3, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2....	63
Tabela 6: condensação do Chol em monocamadas mistas de DPPC e SM.....	67
Tabela 7: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas de SM e SM/X _{Chol} =0,3, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2.....	72
Tabela 8: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas DPPC/Chol/SM, na proporção 7/2/1, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2.....	77
Tabela 9: atribuições das principais bandas de vibração da monocamada de POPC na ausência e na presença do EE2 na subfase	83

Lista de Abreviações

Chol	colesterol
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina
E1	estrone
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
G	fase gasosa
GUV	giant unilamellar vesicle (vesícula unilamelar gigante)
L	fase líquida
LC	fase líquido-condensada
LE	fase líquido-expandida
L α	fase fluida
L β	fase gel
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
P β	fase gel
S	fase sólida
SM	esfingomielina

Índice

Capítulo 1. Introdução	18
1.1 Contaminantes no meio ambiente	18
1.1.1 O hormônio 17 α -Ethinilestradiol	19
1.2 A membrana plasmática: composição e sistemas miméticos	22
1.2.1 Composição e fases da membrana plasmática.....	25
1.2.2 Modelos miméticos da membrana plasmática.....	28
Monocamadas de Langmuir	30
Vesículas lipídicas	33
1.3 Objetivo	35
Capítulo 2. Materiais e Métodos	37
2.1 Materiais	37
2.2 Isotermas π -A.....	38
2.2.1 Módulo compressional	39
2.2.2 Área de excesso	40
2.3 PM-IRRAS.....	41
2.4 GUVs	41
2.4.1 Eletroformação	42
2.4.2 Método gel.....	43
Capítulo 3. Resultados: Monocamadas de Langmuir	45
3.1 DPPC/colesterol.....	45
3.2 DPPC/esfingomielina.....	54
3.3 Esfingomielina/Colesterol	65
3.4 DPPC/colesterol/esfingomielina	74
3.5 POPC	80
Capítulo 4. Resultados: Vesículas Unilamelares Gigantes	86
4.1 DPPC/Colesterol	86
4.2 DPPC/Esfingomielina	88
4.3 Esfingomielina/Colesterol	91
4.4 DPPC/colesterol/esfingomielina	93
4.5 POPC	97
Capítulo 5. Conclusões	103
5.1 Filmes de Langmuir	103
5.2 Vesículas unilamelares gigantes	106
Referências	109

Capítulo 1. Introdução

1.1 Contaminantes no meio ambiente

Diariamente, a indústria, a agricultura e a população em geral vivem sob um modelo cuja atividade econômica está constantemente produzindo lixo, além de gerar uma grande quantidade de poluentes que afetam o ar, os solos, as plantações e as áreas naturais. Essas práticas originam vários poluentes e alteram os ciclos naturais, causando uma preocupação global ligada ao seu eventual impacto a médio e longo prazos tanto na saúde humana como no meio ambiente.

Durante as últimas décadas a comunidade científica vem relatando a presença de novos compostos, denominados "poluentes ou contaminantes emergentes"[1,2], em águas residuais[1,3], ambientes aquáticos[3,4] e atmosféricos[5]. Os poluentes emergentes são novos produtos ou produtos químicos sem status regulatório, cujos efeitos no meio ambiente e na saúde humana são desconhecidos[1].

A listagem de contaminantes emergentes inclui uma ampla variedade de produtos de uso diário, tanto em aplicações industriais como domésticas. Dentre os vários contaminantes destacam-se os que se originam da agroindústria, tais como pesticidas, e os medicamentos, que têm sua origem nas indústrias farmacêuticas. Esta segunda classe, chamada de fármacos residuais, tornam-se poluentes persistentes, uma vez que, em todo o mundo, são diariamente eliminados pela urina e fezes dos humanos ou descartados de maneira incorreta, somando ao fato de não serem removidos por processos convencionais em estações de tratamento de água e esgoto.

Segundo Kummerer[6], alguns grupos de fármacos residuais, dentre eles os antibióticos e os estrogênios, necessitam de maior atenção quanto ao risco. O primeiro grupo é amplamente investigado na literatura, seja pelo potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente[7–9] ou por serem usados em grandes quantidades

na medicina humana e veterinária. Já a importância dada aos estrogênios, que estão no grupo de substâncias chamadas de perturbadores endócrinos, deve-se ao seu potencial de afetar o sistema reprodutivo de organismos aquáticos[10–13] como, por exemplo, a feminização de peixes machos em rios contaminados[14–17]. Além disso, é conhecido que, dependendo da dose e do tempo de exposição em humanos, essas substâncias estão relacionadas com doenças como câncer de mama, testicular e de próstata, ovários policísticos e redução da fertilidade masculina[18,19].

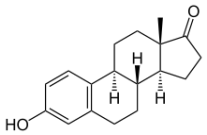
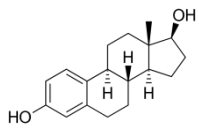
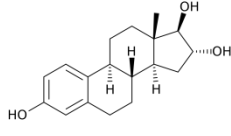
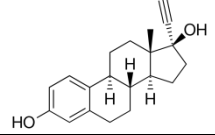
1.1.1 O hormônio 17 α -Etinilestradiol

Os hormônios femininos naturais mais conhecidos são 17- β estradiol, estriol e estrona, e o sintético é o 17 α -Etinilestradiol (EE2), apresentados na Tabela 1. O EE2 é um dos medicamentos mais comumente usados em quase todas as formulações modernas de pílulas anticoncepcionais orais combinados. Trata-se de um derivado sintético do hormônio natural, o estradiol (E2). É moderadamente solúvel em etanol (1:6), mas tem baixa solubilidade em água (4,8 mg/L a 20°C) em comparação com os estrogênios naturais. A partir das propriedades físico-químicas do EE2 pode-se notar que sua ocorrência no meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos, tornou-se um problema generalizado devido à sua elevada resistência ao processo de degradação. Essa característica é útil para contraceptivos anticoncepcionais de ingestão oral, aumentando sua biodisponibilidade no corpo humano[20]. No entanto, também permite que o EE2 se acumule no meio ambiente através de águas residuais domésticas, tornando contaminados os efluentes de águas residuais e fluviais.

Pesquisas mostraram que o EE2 torna-se extremamente estável contra oxidação (mais resistentes ao metabolismo/degradação) no meio ambiente devido à presença do grupo etinil na posição 17 da molécula[21–24] (Tabela 1) além de apresentar um maior

potencial estrogênico (hormonal) em testes *in vitro*, quando comparados com os outros estrogênios[25,26].

Tabela 1: características dos hormônios estrógenos

Composto	Fórmula	Massa molecular (g/mol)	Solubilidade em água (mg/L à 20°C)	Estrutura
Estrona (E1)	$C_{16}H_{22}O_2$	270,4	13	
17β-estradiol (E2)	$C_{18}H_{24}O_2$	272,4	13	
Estriol (E3)	$C_{18}H_{24}O_3$	288,4	13	
17α-etinilestradiol (EE2)	$C_{20}H_{24}O_2$	296,4	4.8	

* Fonte: Pojana et al.[27] e Aris et al.[28]

Sobre os possíveis efeitos dos hormônios no meio ambiente, pesquisas nos últimos anos têm se concentrado no estrogênio sintético EE2, principalmente pela tendência que este composto possui de absorver matéria orgânica, se acumular em sedimentos e se concentrar na biota[29]. O EE2 tem uma meia-vida de 14 dias no ambiente aquático e é relativamente persistente em comparação aos estrogênios naturais[30].

Estudos mostram que o EE2, mesmo em concentrações subterapêuticas (ng/L), tem a capacidade de afetar o sistema endócrino e reprodutivo dos organismos aquáticos[31] a ele expostos, ocasionado a feminização de peixes machos em rios contaminados,[14–17] bem como alterando a determinação do sexo, atrasando a maturidade sexual, e diminuindo a atividade sexual[31–34] das espécies estudadas. Um caso em evidência da presença de EE2 para espécies aquáticas inclui a síntese e secreção de vitelogenina por peixes machos[35,36]. A vitelogenina é uma proteína específica do sexo feminino, e sua

presença no sangue de peixes machos juvenis indica o desenvolvimento de características hermafroditas e falhas no sistema endócrino dos peixes, o que induz alterações na reprodução desses animais.

Além da alteração nos peixes, estudos realizados por Delclos *et al.*[20] evidenciaram que a concentração de 50 ppb de EE2 pode afetar ratos da raça Sprague–Dawley através da diminuição de seu peso corporal, acelerando a abertura vaginal, e alterando os ciclos sexuais em animais jovens. Ainda foi mostrado que, em doses mais elevadas, a distância anogenital foi sutilmente afetada, aumentando significativamente a incidência de lesões uterinas. Exposições a doses orais (em concentração da ordem de μM) de EE2 durante o desenvolvimento gestacional de filhotes machos interrompem permanentemente o aparelho reprodutivo desses ratos[20,37]. Delclos *et al.*[20] concluíram que a absorção e o metabolismo destes compostos por ratos e seres humanos são diferentes devido às diferenças nos níveis de soro (fluídos corpóreos). Assim, uma comparação dos níveis ingeridos pode não fornecer uma boa indicação dos níveis de exposição de rato em relação aos níveis de exposição humanos.

Os riscos da exposição a médio e longo prazo de humanos aos desreguladores endócrinos ainda não são conhecidos em detalhes[38]. A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura sobre os estrogênios sintéticos, especialmente EE2, dedica-se a métodos analíticos para a detecção e quantificação dos seus princípios ativos[28,39]. Estudos sobre possíveis problemas decorrentes da exposição humana crônica a estes compostos são escassos. Desse modo, o estudo desses compostos, no qual a ação depende da interação com as células, é de extrema importância, uma vez que, embora seja conhecida sua ação farmacológica, o mecanismo no nível molecular geralmente não é compreendido.

A membrana plasmática é a via de entrada dos medicamentos na célula. Contudo, a complexidade desse sistema em termos de sua composição e função leva ao caminho

natural de estudar separadamente seus diversos componentes, a fim de simplificar os sistemas e obter deduções razoáveis dos eventos que ocorrem *in vivo*[40]. Assim, estudos com modelos que mimetizam a membrana plasmática são extensivamente realizados, destacando principalmente as camadas lipídicas planas e os lipossomos (vesículas)[41–43]. Perturbações nesses sistemas são bons indicadores do real efeito dos compostos em processos biológicos envolvendo membranas.

1.2 A membrana plasmática: composição e sistemas miméticos

Os lipídios e as proteínas são os principais componentes das membranas das organelas celulares. As primeiras constatações acerca da estruturação de tais componentes na membrana plasmática foram possíveis somente a partir de 1917, quando Irving Langmuir[44], melhorado o método de Agnes Pockels[45,46], mostrou que lipídios espalhados na superfície da água formam uma camada monomolecular. A partir daí, Gorter e Grendel[47] em 1925, aplicaram os métodos de Langmuir para medir a área ocupada por molécula lipídica e inferir que as membranas de eritrócitos (hemácias) são organizadas em bicamadas. Baseados nessa proposta de bicamadas, na década de 1930, Danielli e Davson[48] descreveram um modelo de membrana plasmática que integra proteínas em ambos os lados da bicamada (Figura 1-A), chamadas de proteínas transmembrana[49]. Robertson[50,51], em 1959, apresentou um trabalho em que sugeria que todas as membranas das organelas celulares (não somente a membrana plasmática) tinham “estruturas comuns” pela semelhança das micrografias (Figura 1-B).

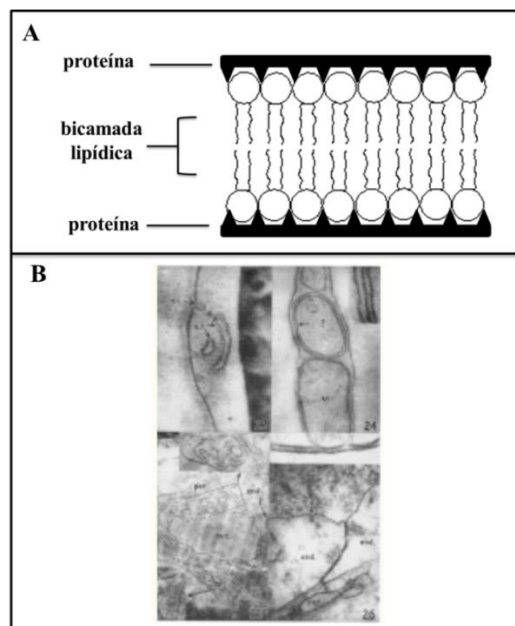


Figura 1: a) representação esquemática da modelo de proteína-lipídio-proteína de Danielli e Davson (1935) e b) micrografias eletrônicas de células, retirada do artigo de Michael Edidin[46], que reproduz o trabalho de Robertson[50], no qual ele se utilizou de vários exemplos para evidenciar que todas as membranas das organelas celulares têm uma estrutura comum. Imagem usada com permissão da revista.

Até os anos de 1970, os modelos enfatizavam a estrutura da membrana plasmática, sem muito predizer acerca da composição química e função. Segundo Paul De Weer[52], o mais bem sucedido modelo e o que introduziu tais conceitos, foi o Modelo do Mosaico Fluido[53]. Singer e Nicolson, em 1972, propuseram um modelo de membrana, representado na Figura 2, que consiste principalmente de três características: i) a membrana plasmática é organizada em uma bicamada lipídica, na qual as regiões hidrofóbicas se orientam para o centro da bicamada com os grupos polares voltados para o exterior; ii) a distribuição de proteínas na bicamada depende das forças intermoleculares exercidas e possuem orientação assimétrica na bicamada; iii) a bicamada é fluida em decorrência da ausência de interações covalentes entre os componentes, permitindo uma distribuição aleatória das moléculas e uma movimentação lateral no plano da membrana.

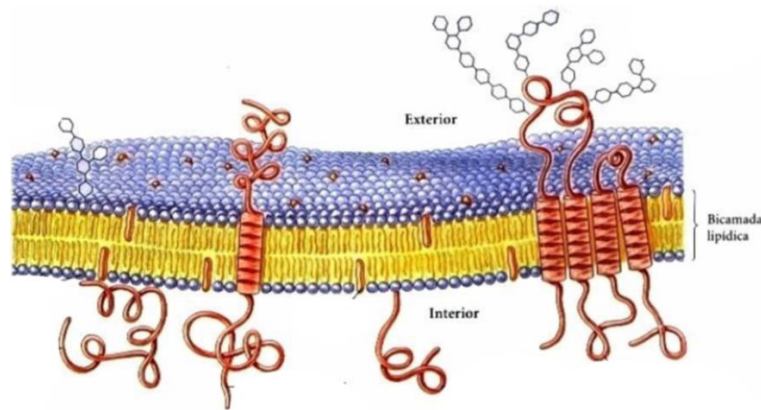


Figura 2: representação da estrutura básica das membranas biológicas: uma bicamada lipídica na qual as proteínas integrais de membrana estão incorporadas. Fonte: figura adaptada de Nelson e Cox[54] e usada com permissão da editora.

Com o avanço das pesquisas, questões sobre a irregularidade e heterogeneidade em relação à distribuição dos lipídios na membrana plasmática, atribuídas às funções das proteínas, se tornaram contestáveis em relação ao que se predizia no modelo de Singer e Nicolson[55]. Uma proposta que aborda tais temas é a hipótese de jangadas lipídicas, do inglês *lipid rafts*, que teve como início nas considerações de Simons e van Meer (1988)[56] e se tornou bastante aceita entre os pesquisadores das mais diversas áreas, com inúmeras reformulações ao longo dos anos[57–59]. Os autores, no processo de classificação dos lipídios na membrana plasmática das células epiteliais, verificaram a formação de domínios lipídicos característicos. Essa hipótese foi posteriormente difundida, propondo a existência de microdomínios ("jangadas") enriquecidos com esfingolipídios e colesterol, com propriedades físicas especiais ligadas diretamente ao equilíbrio de fases na membrana[60]. Sugere-se ainda que esses domínios estejam associados à funcionalidade de proteínas específicas envolvidas no transporte e na sinalização celular[61]. Em uma das definições mais recentes, Lingwood and Simons[62], afirmam que as jangadas lipídicas são compartimentos (em nanoescala) de esfingolipídios, colesterol e proteínas e estão flutuando, formando plataformas que promovem as funções da membrana plasmática (sinalização e transporte).

1.2.1 Composição e fases da membrana plasmática

Os lipídios têm por característica principal serem anfipáticos, pois em uma mesma molécula apresentam regiões hidrofílicas com afinidade por moléculas de água, e hidrofóbicas (apolares), sem afinidade pela água. Também são classificados de acordo com sua composição química, entre glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteróis[54]. As principais estruturas de cada grupo estão esquematizadas na Figura 3.

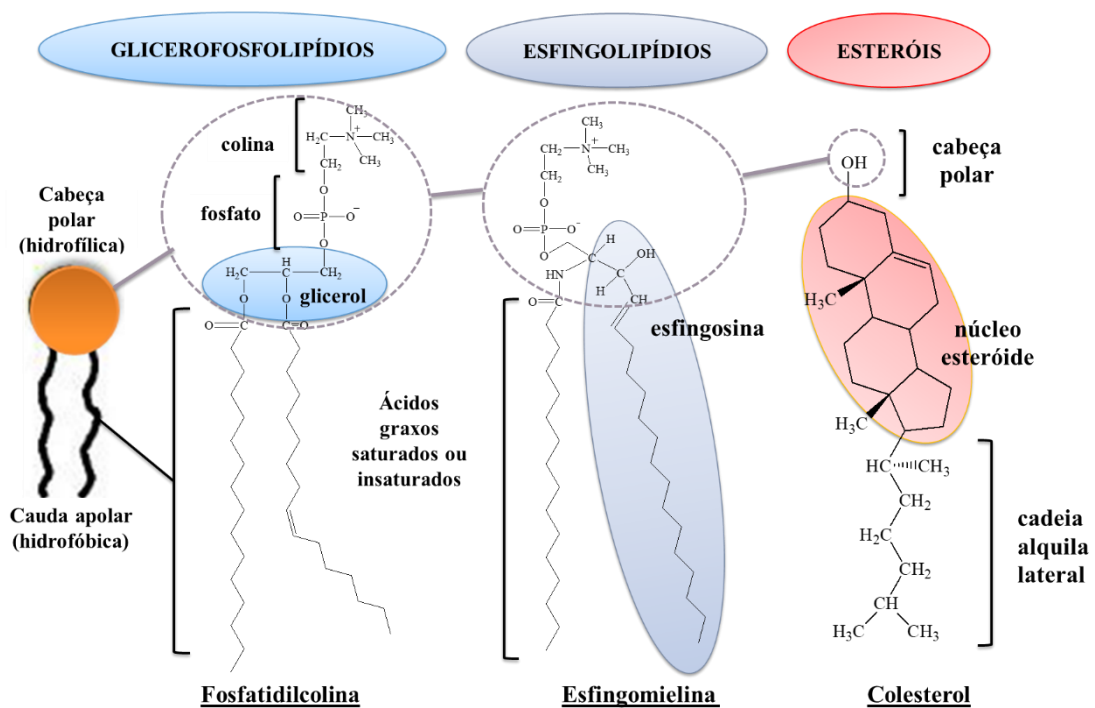


Figura 3: ilustração das estruturas moleculares dos constituintes da membrana plasmática das células eucariontes animais.

Os glicerofosfolipídios são compostos que possuem duas cadeias de ácidos graxos ligados ao grupo glicerol, além do grupo fosfato na região polar da molécula. Dentre os glicerofosfolipídios, as fosfatidilcolinas são as mais abundantes nas organelas e representam cerca de 50% da massa total dos fosfolipídios[63,64] que compõem as membranas das organelas celulares.

Os esfingolipídios, nos quais um ácido graxo está ligado a um grupo amina e a uma cadeia de esfingosina, influenciam tanto na organização estrutural da membrana celular

quanto nas suas propriedades dinâmicas[65,66], que podem exercer um papel de modulação importante na atividade biológica de cada componente da membrana plasmática[67]. Dentre os esfingolipídios que compõem a membrana plasmática, a esfingomielina é a mais estudada.

Os esteróis são lipídios cuja estrutura básica é constituída por quatro anéis fundidos de carbono e hidrogênio, além de uma cadeia alquílica lateral. São encontrados nas membranas das organelas celulares de todos seres vivos eucariontes, sendo o colesterol o esterol típico de animais. As funções dos esteróis são diversas, sendo que no caso dos mamíferos, o colesterol participa da biossíntese dos sais biliares e de hormônios[68] e é um importante componente estrutural e regulador da fluidez na membrana plasmática[69].

O comportamento complexo das membranas plasmática é atribuído tanto pela composição química quanto pela sua estruturação e organização espacial. Estima-se que a bicamada lipídica das células dos mamíferos possui cerca de 9.600 espécies de glicerofosfolipídios e 100.000 espécies de esfingolipídios, além das milhares de estruturas à base de ácidos graxos e esteróis[70]. A Figura 4, adaptada de Rosselló et al.[71] mostra uma distribuição percentual das diferentes espécies presentes nas células dos mamíferos. Em relação à membrana plasmática, os valores percentuais podem variar de acordo com a literatura, contudo a ordem dos componentes majoritários são os fosfolipídios, seguidos de colesterol e esfingomielina. Nesse contexto, estudos indicam que as misturas lipídicas que compreendem a composição da membrana plasmática são a chave de diversas propriedades associadas às membranas e aos *rafts*[72], sendo as misturas binárias ou ternárias contendo fosfatidilcolinas e colesterol[73,74] ou esfingomielina[75,76] as mais abordadas.

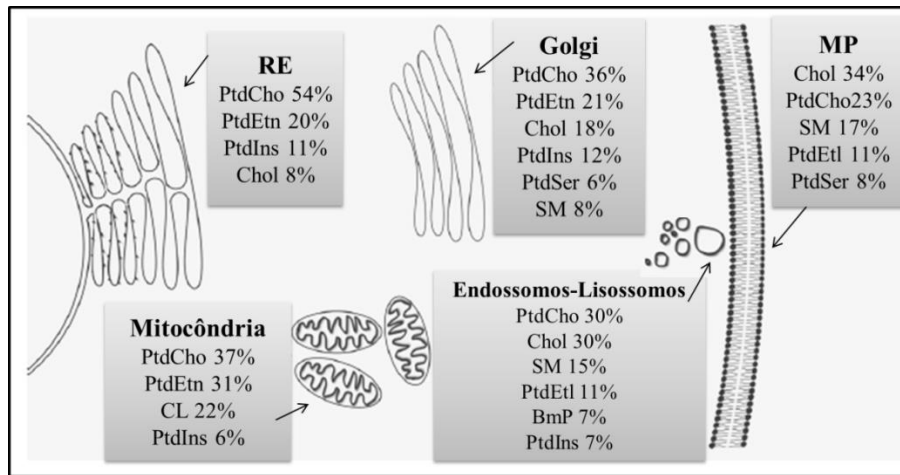


Figura 4: distribuição lipídica nas diferentes organelas das células dos mamíferos. Os principais lipídios são listados em porcentagem, do mais abundante para o menos abundante de acordo com sua contribuição para o total de lipídios de cada organela. BmP: bis-monoacilglicerol-fosfato; Chol: colesterol; CL: cardiolipina; PtdCho: fosfatidilcolina; PtdEtn: fosfatidiletanolamina; PtdIns: fosfatidilinositol; PtdSer: fosfatidilserina; SM: esfingomiélin. As ilustrações não se encontram em escala. Adaptado de Rosselló et al[71]. Imagem usada com permissão da revista.

Quanto à organização da membrana plasmática, as propriedades mecânicas e termodinâmicas, bem como a manutenção de um grau de fluidez adequado para a bicamada lipídica são essenciais para o bom funcionamento da célula e preservação da vida celular. Diversos processos celulares, como endocitose e fusão celular, envolvem a deformação mecânica e alterações na curvatura da membrana plasmática[77].

As fases do ordenamento das bicamadas lipídicas têm seu comportamento descrito em função da temperatura. Quando formadas por um único lipídio, podem ser descritas como fase gel (L_β) e fase fluida (L_α), como mostrado na Figura 5. O parâmetro determinante é a temperatura de transição de fase dos lipídios (ou temperatura média, T_m). Abaixo da T_m , os lipídios estão na fase gel (L_β) – lipídios com cadeias ordenadas e estendidas, característico da configuração *all trans*– ao passo que acima dessa temperatura, as cadeias carbônicas apresentam algumas dobras *gauche* e estão no estado fluido, característico de cadeias lipídicas desordenadas e distribuídas aleatoriamente na membrana. Determinados lipídios com cabeças polares grandes (como as PCs) apresentam uma pré-transição, chamada de *fase ripple*, na qual as cadeias ainda se

encontram na fase gel, mas com o surgimento de ondulações na superfície da bicamada. A incorporação de colesterol em bicamadas lipídicas permite que o esteroide atue como regulador das fases mais extremas (L_α e L_β) promovendo a fase chamada líquido-ordenada (L_o), quando adicionado em proporções molares adequadas[74]. A fase L_o possui difusões laterais e rotacionais semelhantes à fase L_α , porém também possui um ordenamento semelhante à fase L_β .

A temperatura de transição é diferente para os lipídios e varia principalmente de acordo com os grupos-cabeça existentes na região polar, o tamanho da cadeia de hidrocarbonetos e a quantidade de duplas ligações nas caudas dos lipídios[78].

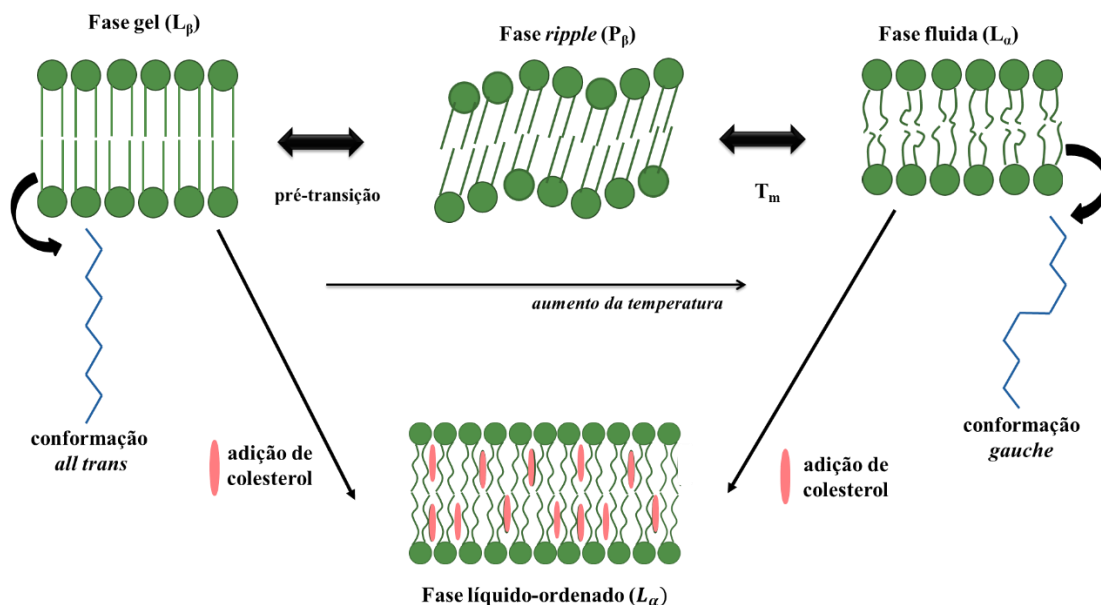


Figura 5: ilustração das fases de uma bicamada composta por um único lipídio e com a adição do colesterol.

1.2.2 Modelos miméticos da membrana plasmática

A Figura 6 mostra as várias estruturas lipídicas comumente encontradas em solução e em interfaces. Dentre os modelos utilizados destacam-se as mono ou multi camadas lipídicas planares e os lipossomos (vesículas), que são os utilizados nesse trabalho.

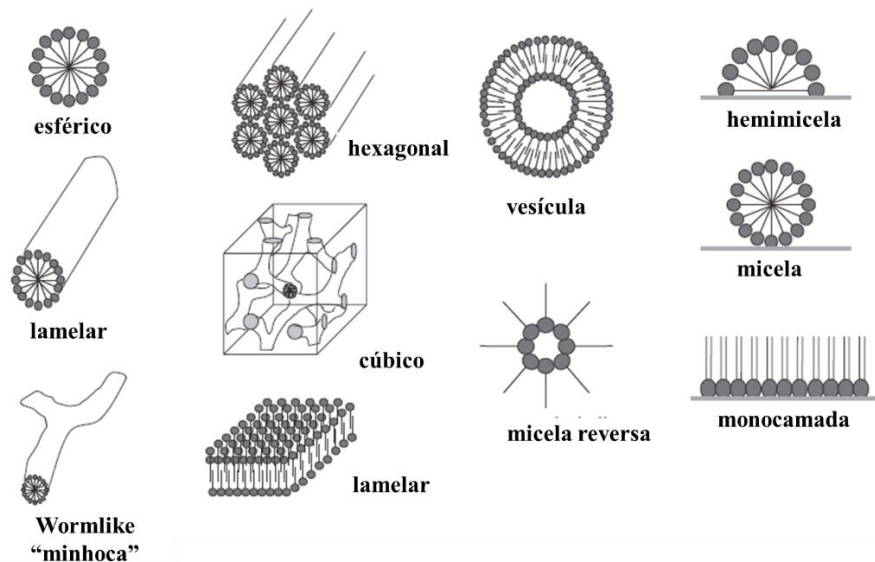
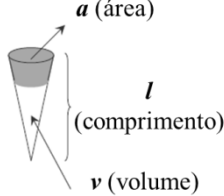
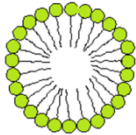
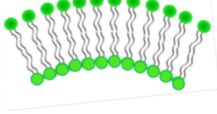
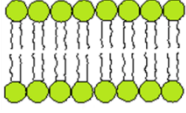


Figura 6: estruturas de diferentes organizações lipídicas em soluções e em superfícies. Adaptado de Lee[79], com permissão da editora.

A arquitetura dos modelos miméticos está diretamente relacionada ao tamanho e à geometria dos lipídios e pode ser definida pelo parâmetro de empacotamento (P). O parâmetro de empacotamento do lipídio é determinado pela equação $P = \frac{v}{a \cdot l}$, onde v e l representam o volume e comprimento das cadeias hidrofóbicas, respectivamente, e a representa a área ocupada pelo grupo polar do lipídio no agregado[80].

Assim, para estruturas como as micelas ou agregados automontados de estrutura esférica, tem-se $P < 0,5$. No caso das vesículas: $0,5 < P < 1$. Bicamadas lamelares: $P \approx 1$. A forma efetiva de uma molécula lipídica é determinada pela compatibilidade entre o tamanho do grupo cabeça e o tamanho da cauda hidrofóbica. As geometrias relacionadas com os lipídios e os valores de P são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: parâmetros de empacotamento determinados pela forma dos lipídios e tipos de estruturas agregadas formadas. Adaptado de Lombardo et al.[81], com permissão da revista

Lipídios	Parâmetro de empacotamento (P)	Forma	Estrutura lipídica
Lipídios de cadeia única com grupo cabeça com área grande : Dodecil sulfato de sódio (SDS)	$P < 0,5$	Cone 	Micelas esféricas 
Lipídios com duas cadeias grupo cabeça área grande: Fosfatidilcolinas Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Esfingomielina	$0,5 < P < 1$	Cone truncado 	Mono e bicamadas flexíveis, vesículas 
Lipídios com duas cadeias e grupo cabeça com área pequena, lipídios aniônicos e com alta concentração de sais: Fosfatidiletalonaamina Fosfatidilserina /Ca ²⁺	$P \approx 1$	Cilindro 	Mono e bicamadas planas 

Monocamadas de Langmuir

As monocamadas de fosfolipídios formadas pelas técnicas de Langmuir (filmes de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett) são bastante utilizadas para entender processos biológicos em nível molecular a partir de interações com determinadas classes de drogas, polissacarídeos, entre outros[82–84]. São formadas por moléculas anfifílicas insolúveis altamente organizadas na interface líquido/ar. No final do século XIX, a alemã Agnes Pockels, trabalhando basicamente com equipamentos e matérias disponíveis na cozinha da casa de seus pais, descobriu como manipular filmes formados por óleo na água, resultando nos primeiros estudos sobre comportamento de superfícies.

A Figura 7 mostra um trecho disponível na revista Nature de 1891[85] e sua tradução, em que mostra o reconhecimento do físico inglês John W. Strutt, o Lord Rayleigh, às considerações de Pockels. É interessante notar que o trecho destacado “for

various reasons” ou “por diversas razões” escrito por Agnes Pockels remete às tentativas (sem sucesso) de publicar seus relevantes resultados. Tais fracassos são atribuídos, por muitos autores[86], ao fato de principalmente se tratar de uma mulher no meio acadêmico e científico, visto que as mulheres não possuíam sequer acesso ao ensino superior. Enfim notada, os resultados de Pockels levaram Rayleigh, em 1899[87], a sugerir que tais filmes eram formados por somente um molécula de espessura, fornecendo a base para os estudos de monocamadas insolúveis.

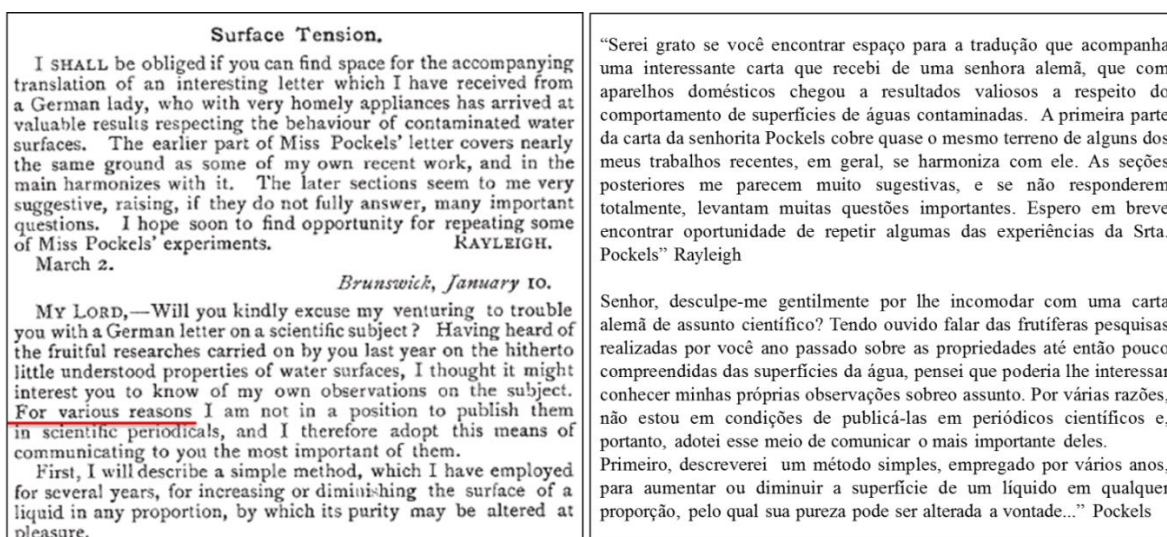


Figura 7: texto extraído da revista *Nature*, de 12 de março de 1891, acompanhado de uma tradução para o português. Imagem usada com permissão da revista.

O aprimoramento dos métodos e das considerações sobre as moléculas insolúveis na interface gás-líquido pode ser atribuído ao físico-químico norte americano Irving Langmuir, no começo do século XX, dando início ao desenvolvimento de monocamadas ou filmes de Langmuir[88]. Na década de 30, quando sua aluna Katharine Blodgett[89] realizou a deposição das monocamadas sobre um substrato sólido[90], tais filmes foram denominados filmes de Langmuir-Blodgett (LB).

As monocamadas de Langmuir são obtidas em uma cuba de Langmuir[91]. Um esquema ilustrativo é sugerido na Figura 8-A. A compressão das moléculas pelas barreiras e a formação das monocamadas na cuba é acompanhado pela isoterma π -A, que relaciona a pressão de superfície (π) vs a área média ocupada por molécula (A), sendo π

calculada pela diferença entre a tensão superficial da subfase de água pura (γ_0) e a tensão superficial da subfase de água pura + monocamada (γ): $\pi = \gamma_0 - \gamma$. O método mais utilizado para se obter o valor da tensão superficial é o de Wilhelmy[86], o qual utiliza-se de um sensor, constituído de um papel filme ou fio de platina, conectado a uma eletrobalança, que permite calcular a variação de π , de modo que a força resultante da imersão do papel de filtro na subfase seja diretamente proporcional à tensão superficial. O experimento procede geralmente espalhando, na superfície da subfase, dezenas de microlitros da substância anfifílica a ser estudada, diluída na maioria das vezes em clorofórmio, ou solução contendo partes de clorofórmio e metanol. A subfase é formada por água ultrapura ou solução aquosa de interesse.

Quando a barreira móvel horizontal promove a diminuição da área na superfície, a compressão das monocamadas passa por três fases distintas: i) fase gasosa (G), na qual as moléculas do lipídio se encontram distantes uma das outras (elevada área superficial disponível) e praticamente não interagem entre si, caracterizada pela pressão de superfície igual a zero; ii) fase líquido-expandida (LE), na qual a área disponível por molécula é diminuída, surgindo interações intermoleculares entre as caudas hidrofóbicas dos tensoativos. Como a tensão superficial diminui, ocorre um aumento da pressão de superfície (π); iii) fase líquido-condensada (LC), estágio de maior empacotamento das moléculas que provoca limitação do seu movimento translacional na interface. A pressão de superfície aumenta abruptamente, em decorrência da queda brusca da tensão superficial. Algumas moléculas anfifílicas de estrutura simplificada ou com alto grau de rigidez (como os ácidos carboxílicos de cadeia longa, por exemplo) apresentam um estado de empacotamento máximo das moléculas, denominado iv) fase sólida. Após a fase líquido-condensada ou fase sólida, as moléculas anfifílicas podem empacotar aleatoriamente e de maneira desordenada, provocando o colapso do filme. O perfil das isotermas π -A está diretamente relacionado à estrutura dos materiais organizados na

interface ar/água. A isoterma π -A pode apresentar pontos de transição evidentes, como na Figura 8-B, típica de ácidos graxos compostos por uma única cadeia de hidrocarbonetos, por exemplo, o ácido esteárico[92]. As monocamadas que apresentam regiões de coexistência de fases ($LC \rightleftharpoons LE$), para as quais a pressão de superfície se mantém constante (Figura 8-C), são características de fosfolipídios com duas cadeias de hidrocarbonetos saturados, sendo o mais conhecido, o DPPC[93]. A Figura 8-D ilustra um perfil de isoterma π -A de monocamadas mais fluidas e menos empacotadas (sem transições evidentes entre as fases) e são comuns aos fosfolipídios que possuem duas cadeias de hidrocarbonetos com insaturações[94,95].

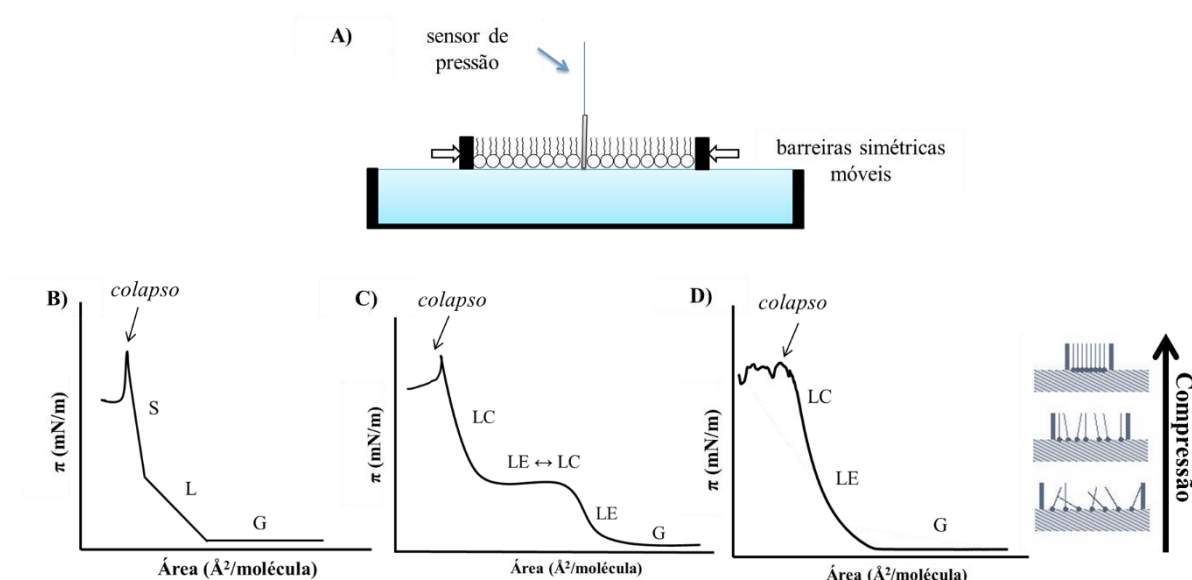


Figura 8: representação esquemática da obtenção das monocamadas de Langmuir. A) composto organizado na interface ar/água em uma cuba de Langmuir; B), C) e D) estágios de compressão da monocamada e as correspondentes isotermas de pressão por área de superfície (π -A).

Vesículas lipídicas

As vesículas lipídicas são estruturas esféricas, cujo diâmetro pode variar de 20 nm a dezenas de μm , e mimetizam a organização lipídica nas membranas plasmáticas por serem constituídos, geralmente, de uma (unilamelar) ou mais (multilamelar) bicamadas de fosfolipídios, sendo largamente utilizadas para estudar fenômenos físico-químicos de

processos biológicos[96–99]. Além do número de lamelas, as vesículas podem ser classificadas em relação ao tamanho, conforme indicado na Figura 9.

Dentre as vesículas formadas com multilamelas, as mais conhecidas são as MLV (*multilamellar vesicle*) e as vesículas oligoméricas ou OLV (*oligolamellar vesicles*). As vesículas unilamelares podem ser pequenas ou SUV (*small unilamellar vesicles*), grandes ou LUV (*large unilamellar vesicles*), bem como gigantes ou GUV (*giant unilamellar vesicles*). Esta última possui vantagens que incluem a capacidade de encapsular grandes moléculas e permitir observação direta com microscopias ópticas, como as de contraste de fase, fluorescência e confocal[59,100,101]. Além disso, são formadas com tamanho comparável ao de uma célula eucariótica[102], com dimensões superiores a 1 μm sendo eficazes nos estudos das propriedades da membrana plasmática e mecanismos interacionais com moléculas de interesse[97,103].

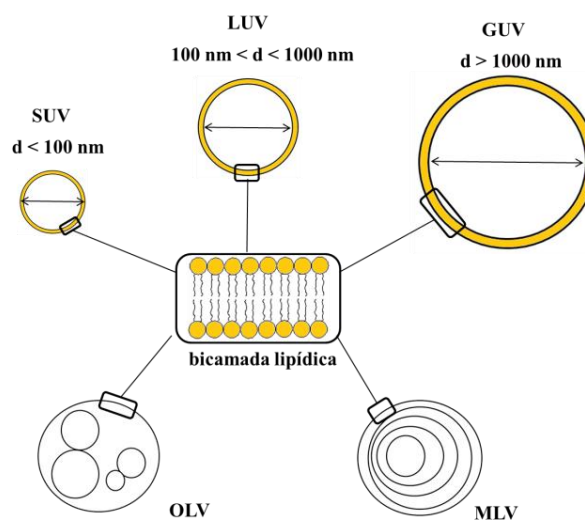


Figura 9: esquema ilustrativo das diferentes vesículas que podem ser formadas a partir de bicamadas lipídicas. Adaptado de Pazin[104], com permissão do autor.

Diante do apresentado, este trabalho de doutorado envolveu estudos sobre a interação do hormônio sexual EE2 com modelos complexos de membrana plasmática. Tais modelos são ditos complexos por envolverem misturas de mais de um lipídio e

colesterol, diferenciando-se dos chamados modelos simples que envolvem apenas um tipo de lipídio.

As misturas foram estruturadas em monocamadas (filmes de Langmuir) e em bicamadas (GUV), sendo nesse caso as vesículas formadas pelo método de eletroformação[105] e pelo método gel[106]. Os fosfolipídios escolhidos foram 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC), Colesterol (Chol), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (POPC) e Esfingomielina (SM). Os Chol e a SM de fato são componentes das membranas plasmáticas das células eucarióticas. No caso do DPPC, ele pertence à classe das fosfatidilcolinas, grupo presente em quantidades expressivas nas células eucarióticas. Trata-se de um fosfolipídio que tem sido amplamente utilizado nas monocamadas de Langmuir como membranas modelo, pois exhibe transições de fase evidentes, bem como propriedade mecânicas, termodinâmicas e caracterização química conhecidas e passíveis de comparação com a literatura existente. Apesar do DPPC mimetizar as membranas celulares em relação aos grupos químicos presentes na cabeça dos fosfolipídios, não garante aos modelos miméticos a fase fluida em que se encontra a membrana plasmática das células de mamíferos. Assim, para se obter tal propriedade, também foi utilizado o fosfolipídio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina, POPC, (também uma das fosfatidilcolinas mais encontrada na membrana plasmática dos mamíferos) nos experimentos de Filmes de Langmuir e GUVs, verificando o efeito do EE2 em modelos miméticos formados em fases fluidas.

1.3 Objetivo

Esta tese de doutorado teve como objetivo principal determinar causas e consequências da ação do hormônio EE2 sobre modelos complexos da membrana plasmática formados por monocamadas lipídicas (filmes de Langmuir) e bicamadas lipídicas (vesículas extrudadas e GUVs) contendo diferentes proporções de lipídios e

colesterol. Por causa destacam-se interações em nível molecular e por consequência possíveis mudanças na estruturação das mono e bicamadas, na morfologia dos filmes de Langmuir e das GUVs e na fase em que estes sistemas se encontram.

As atividades planejadas para se atingir o objetivo proposto incluem:

- Investigar as interações entre o EE2/filmes de Langmuir via isothermas de pressão de superfície vs. área molecular média (isothermas π -A) e espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS).
- Investigar a morfologia das GUVs via microscopia confocal/fluorescência na presença e na ausência do EE2.
- Propor mecanismos de interação em nível molecular entre o EE2/membrana plasmática a partir dos diferentes modelos da estrutura lipídica utilizados no estudo interacional hormônio/lipídio.

Capítulo 2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os lipídios utilizados na formação das mono e bicamadas, o hormônio EE2 bem como a sonda fluorescente utilizada na formação das GUVs estão descritos na Tabela 3 e suas estruturas na Figura 10. Os lipídios foram solubilizados em uma solução composta de clorofórmio e metanol em uma razão 7:3 v/v, (metanol grau HPLC-J.T.Baker, 99,90%; clorofórmio grau HPLC- Sigma-Aldrich, 99,0%). Para os estudos com o EE2, uma solução estoque na concentração de $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L do hormônio em metanol foi preparada. As soluções aquosas de sacarose, glicose e as subfases foram obtidas com água Milli-Q® ultrapura (resistividade 18,2 MΩ.cm, pH = 5,6 e tensão superficial 72,1 mN.m⁻¹ a 25° C).

Tabela 3: massa molar, pureza e marca dos materiais utilizados

Material	Classe	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Pureza	Marca/referencia
1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC)	Glicerofosfolipídios	734,053	≥ 99%	Avanti Polar Lipids (830855P)
Colesterol (Chol)	Esteróis	386,650	≥ 99%	Sigma Aldrich (C8667)
Esfingomielina (SM)	Esfingolipídios	732,0	≥ 95%	Sigma Aldrich (S0756)
Rodamina- DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina)	Fosfolipídios (marcados com sonda)	1301,72	≥ 98%	Avanti Polar Lipids (810150C)
17 α-etinilestradiol (EE2)	Esteróis	296,403	≥ 98%	Sigma Aldrich (E4876)
1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (POPC)	Glicerofosfolipídios	760,091	≥ 99%	Avanti Polar Lipids (850457P)

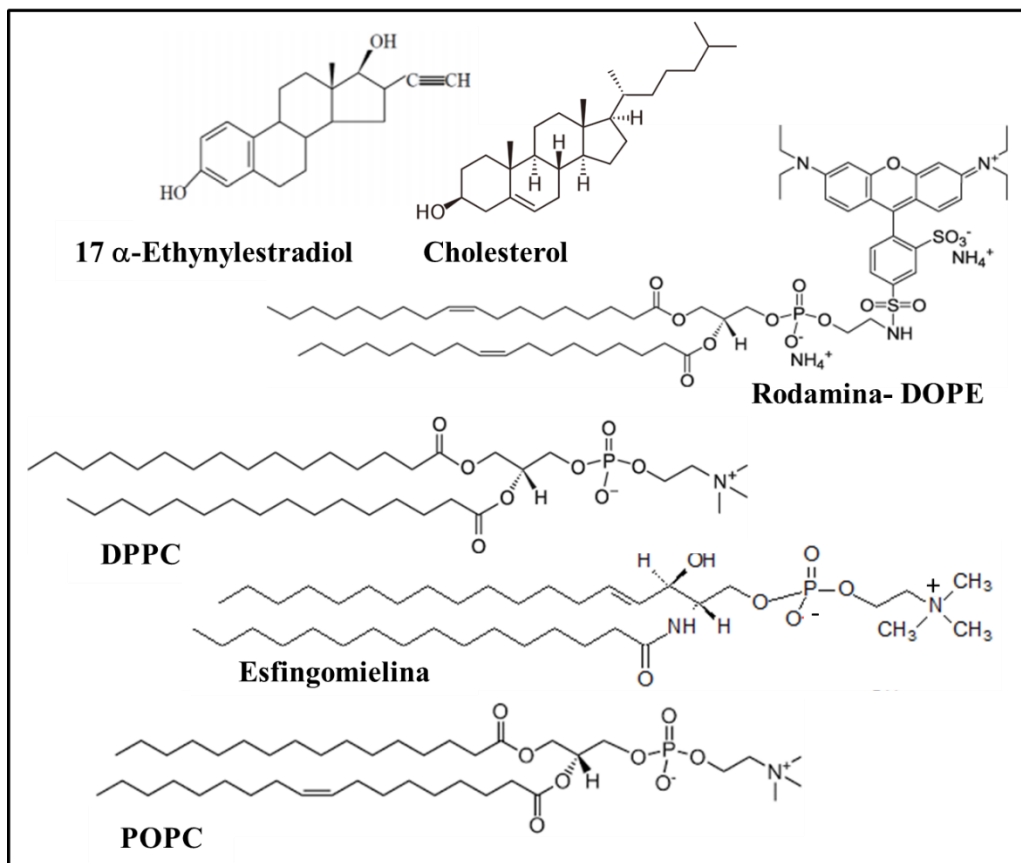


Figura 10: estruturas químicas dos materiais utilizados.

2.2 Isotermas π -A

As isotermas π -A foram obtidas a $23 \pm 1^\circ \text{C}$ em uma cuba de Langmuir de 40 mL e 150 cm^2 (KSV Instruments, Finlândia). Soluções estoque de concentração $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de DPPC, Chol e SM foram utilizadas para preparar as misturas binárias DPPC/Chol, DPPC/SM e SM/Chol, com diferentes frações molares dos constituintes $x = 0,3; 0,5$ e $0,7$; das misturas ternárias de DPPC/Chol/SM, nas proporções molares 7/2/1 e 1/1/1, além da solução de POPC com a mesma concentração. A concentração final das misturas binárias e ternárias informadas ao software da cuba de Langmuir foi de $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, como no exemplo de uma solução da mistura DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}}=0,3$ com volume final de 1mL, na qual contem 700 μL de DPPC ($1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e 300 μL de Chol ($1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

Após a completa evaporação do solvente (cerca de 15 minutos), as isotermas dos lípidios e das misturas foram obtidas com água ultrapura na subfase, a uma velocidade de compressão de 10 mm.min^{-1} . Para estudar o efeito da incorporação de hormônio nas

monocamadas, uma solução de EE2 em metanol foi injetada na subfase aquosa, a uma concentração final na subfase de $1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. As propriedades mecânicas (módulo compressional) e termodinâmicas (área de excesso) das isothermas π -A foram investigadas usando as curvas obtidas para essas mesmas subfases.

Geralmente, tais propriedades são analisadas e discutidas observando os valores obtidos na pressão de superfície de 30 mN.m^{-1} . Essa pressão corresponde à pressão lateral interna em bicamadas fosfolipídicas (e membranas biológicas) sob pressão atmosférica e na ausência de qualquer estresse externo[107]. A membrana celular, em 30 mN.m^{-1} , tende a manter uma densidade específica de empacotamento lipídico[108]. Além disso, o funcionamento de certas classes de proteínas presentes na membrana é regulado por mudanças na pressão lateral, que podem ser alteradas de acordo com variações do conteúdo lipídico[109].

Para realizar os experimentos de PM-IRRAS e GUVs, foram escolhidas as seguintes misturas lipídicas: DPPC/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$), DPPC/SM ($x_{\text{SM}} = 0,3$), e SM/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$), além dos componentes individuais DPPC, SM e POPC. Essas frações molares específicas mencionadas foram escolhidas pois trata-se da representação mais próxima (quimicamente) da proporção lipídica em membranas de células de mamíferos[110]. Além disso, como a maioria das membranas biológicas contém um grande número de fosfatidilcolinas insaturadas, o uso do POPC garantiu a fase fluida das monocamadas.

2.2.1 Módulo compressional

O módulo compressional (C_s^{-1}), um parâmetro referente ao empacotamento das monocamadas, pode ser investigado a partir dos dados obtidos das isothermas π -A. Essa grandeza é calculada por $C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T$, onde A é a área molecular e π é a pressão superficial. Uma isoterma obtida na interface ar-água na ausência de tensoativos

apresenta valor zero de Cs^{-1} . Na presença de uma monocamada, quanto maior o aumento da pressão de superfície (π) devido a uma compressão, mais compactada estarão as moléculas, e assim, maior o valor de Cs^{-1} . De acordo com a literatura[111–113], uma análise sistemática das isotermas π -A mostra que:

- (a) Cs^{-1} para estados sólidos (S) varia de acordo com valores de 1000 a 2000 mN.m^{-1} .
- (b) Cs^{-1} varia de 100 a 250 mN.m^{-1} para filmes na fase líquido-condensada (LC).
- (c) Cs^{-1} varia de 12,5 a 50 mN.m^{-1} para filmes na líquido-expandida (LE).

Este é um método sensível para verificar mudanças estruturais durante a compactação da monocamada e como a presença de EE2 poderia afetar as propriedades mecânicas nas monocamadas puras (formadas por um único fosfolípido) e mistas.

2.2.2 Área de excesso

Uma análise quantitativa das interações entre os componentes da mistura binária pode ser obtida com base no cálculo da área de excesso (A_{exc}) da mistura, que é determinada diretamente a partir das isotermas π -A.

A A_{exc} é definida como $A_{exc} = A_{12} - (x_1A_1 + x_2A_2)$, onde A_i e x_i são a área por molécula referente ao componente individual e a fração molar do componente, e A_{12} é a área molecular ocupada referente à mistura[114,115]. Do ponto de vista termodinâmico, se dois componentes da mistura interagem entre si na monocamada, o excesso de área é diferente de zero e varia com a composição do filme misto, apresentando um comportamento não ideal[113]. Valores negativos para A_{exc} indicam a presença de interações atrativas entre os componentes da mistura binária, ao passo que valores de A_{exc} maiores que zero sugerem interações repulsivas.

2.3 PM-IRRAS

Os filmes de Langmuir contendo os lipídios individuais ou as misturas binárias formados em água ultrapura ou em subfases contendo uma solução aquosa de 1.10^{-5} mol.L⁻¹ de EE2 foram compactados até a pressão $\pi = 30$ mN.m⁻¹ e caracterizados na interface ar-água pela técnica de PM-IRRAS *in situ*, utilizando um instrumento KSV PMI 550 (KSV Instruments Ltd., Helsínquia, Finlândia) disponível no laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP – São Carlos.

Este equipamento contém um detector HgCdTe (MCT, modelo PCI-3TE-10.6) com área ativa de 1x1 mm². O feixe infravermelho incidente é modulado por um modulador fotoelástico ZnSe operando na sua frequência de ressonância de 50 kHz. Todas as medidas foram realizadas com o ângulo de luz incidente de 80° em relação à normal. A radiação de alta frequência foi modulada entre polarizações paralelas (polarizadas-p) ou perpendiculares (polarizadas-s) e os espectros foram obtidos simultaneamente em ambas as polarizações, a fim de reduzir o efeito do vapor de água. O sinal PM-IRRAS (S) é obtido pela diferença entre os espectros s e p, usando a equação:

$S = \Delta R/R = (R_p - R_s)/(R_p + R_s)$ [116,117], onde R_p e R_s são as reflectâncias polarizadas paralela (p) e perpendicular (s) ao plano de incidência, respectivamente. A faixa espectral do equipamento é 600-4200 cm⁻¹ e a resolução espectral é de 8 cm⁻¹.

2.4 GUVs

As GUVs foram formadas por dois diferentes métodos: eletroformação e método gel. A temperatura de análise foi de 23° C $\pm$ 1° C. Para as GUVs de DPPC, DPPC/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$), DPPC/SM ($x_{\text{SM}} = 0,3$), SM e SM/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$); na verificação no efeito do hormônio nas vesículas, a solução de metanol contendo EE2 a 2% (v/v) foi injetada nos poços e as GUVs foram monitoradas por pelo menos 30 min (a concentração final de EE2 nesses sistemas foi de 10^{-4} mol/L). Para as GUVs das misturas ternárias de

DPPC/SM/Chol nas proporções molares 1/1/1 e 7/2/1 e POPC, foi realizado o ajuste experimental em relação a incorporação e concentração do hormônio no sistema. Assim, a solução de glicose a 0,2 mol/L foi preparada dissolvendo o açúcar em uma solução aquosa 1.10^{-5} mol.L⁻¹ de EE2. As vesículas foram observadas no microscópio confocal invertido (Nikon C2/C2si Eclipse Ti-E, Kyoto, Japão), câmera DS-Qi2, utilizando uma objetiva de ar de 40x, NA 0,6; por meio da técnica de contraste de fase e fluorescência. Medidas em triplicatas foram realizadas e o desvio padrão na contagem das vesículas foi calculado. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ.

2.4.1 Eletroformação

O método de eletroformação foi inicialmente proposto por Angelova e Dimitrov[118]. As mesmas condições das soluções estoque usadas para obter as monocamadas de Langmuir (isotermas π -A) foram aplicadas aqui.

Para formar GUVs, 8 μ L das soluções 1.10^{-3} mol.L⁻¹ de DPPC, DPPC/Chol ($x_{\text{chol}} = 0,3$), DPPC/SM ($x_{\text{SM}} = 0,3$), SM e SM/Chol ($x_{\text{chol}} = 0,3$) dopados com 0,3% molar de DOPE-rodamina B foram espalhados em suporte de teflon contendo dois eletrodos de platina paralelos[119]. Para remover qualquer vestígio de solvente orgânico, o suporte com o filme lipídico espalhado foi mantido sob vácuo por 1 h. Posteriormente, uma solução de sacarose 0,2 mol.L⁻¹, dissolvida em água Milli-Q ultrapura a 55°C (temperatura acima da transição da fase do DPPC, Chol e SM[120,121]), foi adicionada ao poço contendo os eletrodos de platina.

Para proceder a eletroformação, o sistema foi exposto a um campo alternado de baixa frequência (função de onda sinusoidal com frequência de 10 Hz e amplitude de 1,3 V) por 90 min, utilizando um gerador de função (Minipa MFG-4202), como mostrado na Figura 11. Além disso, todo esse processo foi realizado em sistema que consistiu em um

fluxo de água acoplado no poço de teflon, mantendo a temperatura do sistema constante em 55° C.

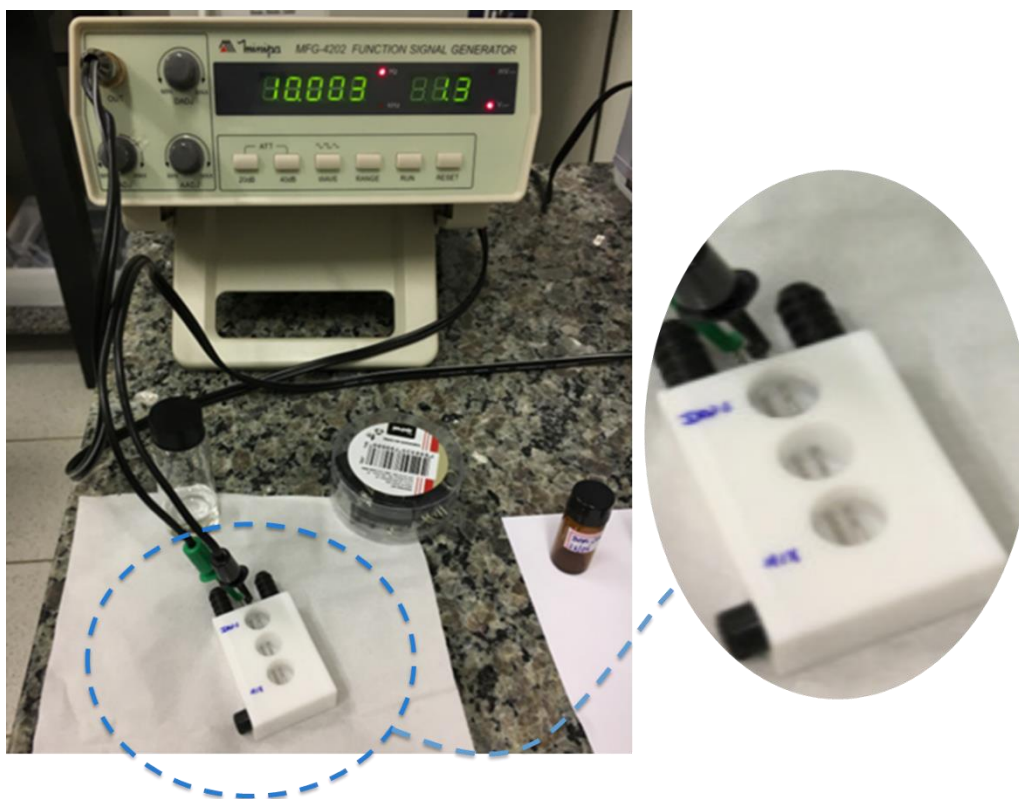


Figura 11: fotografia digital do aparato acoplado ao gerador de função para a realização da eletroformação, com um aumento para mostrar suporte de teflon com os fios de platina.

2.4.2 Método gel

As GUVs das misturas ternárias de DPPC/SM/Chol nas proporções 1/1/1 e 7/2/1 e também de POPC foram obtidas pelo método da formação em gel descrito primeiramente por Weinberger et al.[106] O processo se deu semelhante ao ilustrado na Figura 12. Inicialmente foram colocados 350 μL da solução de PVA (Acetato de polivinila), concentração igual à $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L (massa molar igual à 146000-186000 g/mol) num béquer de 5 mL, que foi disposto em uma estufa com temperatura entre 50 e 75 °C, até que se formasse o filme de PVA no fundo da vidraria. Após a secagem foram espalhados 10 μL de solução das misturas ternárias ou de POPC diluído em clorofórmio. O sistema foi deixado em vácuo por uma hora e trinta minutos para a secagem do solvente. Por fim,

com o término da secagem, adicionou-se 1 mL da solução de sacarose (0,2 mol/L) no béquer, num total de uma hora e meia para a formação das vesículas. Para a formação das GUVs de DPPC/Chol/SM, a solução de sacarose foi pré-aquecida a uma temperatura de 55° C e a formação das vesículas se deu em uma estufa com temperatura controlada em 60° C.

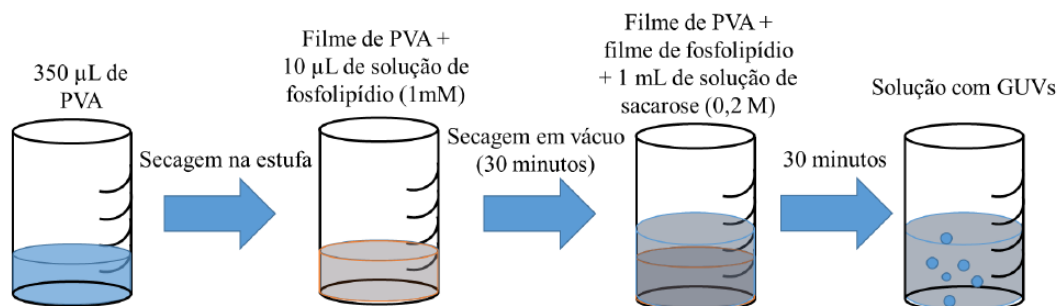


Figura 12: ilustração do processo de formação de GUVs pelo método gel.

As GUVs foram coletadas do poço e do béquer e, após as amostras atingirem a temperatura ambiente, foi checada a concentração final da solução de sacarose utilizando-se um osmômetro crioscópio Gonotec 3000. Em seguida, alíquotas de 50 µL foram adicionadas a um suporte de vidro de oito cavidades (Ibidi, Munique, Alemanha) contendo 200 µL de solução de glicose, de mesma osmolaridade, preparada em água ultrapura e levada diretamente ao suporte do microscópio.

Capítulo 3. Resultados: Monocamadas de Langmuir

3.1 DPPC/colesterol

Isotermas π -A

As isotermas π -A para o DPPC e o colesterol, obtidas na subfase de água ultrapura, são apresentadas na Figura 13 bem como as de monocamadas de DPPC/Chol mistas (contendo colesterol com as frações molares x_{Chol} 0,3; 0,5 e 0,7).

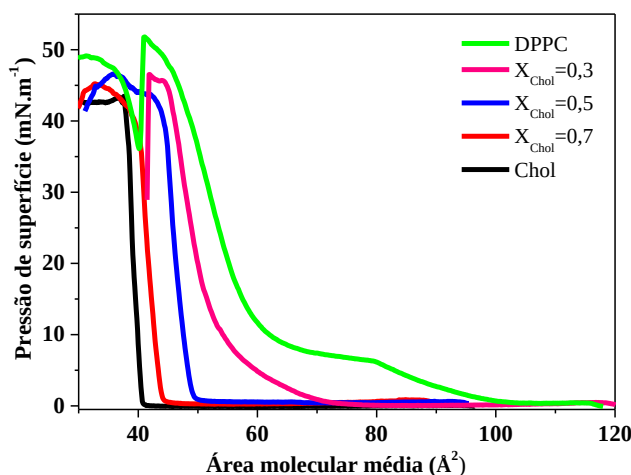


Figura 13: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para as monocamadas de DPPC, colesterol e misturas de DPPC/Chol (nas frações molares de colesterol $x_{\text{Chol}} = 0,3$; 0,5 e 0,7) na subfase contendo água ultrapura. A área molecular média dos filmes mistos é dada considerando somente a área ocupada pelo DPPC.

As isotermas π -A dos compostos individuais apresentam perfis conhecidos[93,122], com valores médios extrapolados de área molecular de 60 e 40 $\text{\AA}^2$ para DPPC e colesterol, respectivamente. Para o DPPC, uma região de platô observada a 8 mN.m^{-1} indica a coexistência das fases líquido-expandida (LE)/líquido-condensada (LC). Acima dessa pressão, o aumento é atribuído à formação da fase líquido-condensada, até atingir o colapso a 50 mN.m^{-1} . As moléculas de colesterol formam uma monocamada mais empacotada, como sugerido pelo perfil mais íngreme da isoterma, comportamento típico de uma monocamada com alta rigidez[123]. Segundo Ries e Swift[124], a área molecular extrapolada de colesterol em 39 $\text{\AA}^2$ é equivalente à de duas moléculas de Chol

de cadeia reta orientadas verticalmente. A pressão de colapso da monocamada de colesterol é típica em 43 mN.m^{-1} [125].

Nas monocamadas mistas, o colesterol induz um empacotamento das monocamadas de DPPC, como verificado pelo deslocamento das isotermas mistas de DPPC/Chol para áreas menores em comparação com o DPPC. Além disso, de acordo com o aumento da fração molar do colesterol, é possível observar o desaparecimento da região de coexistência LE-LC, e a fase gasosa passa diretamente para uma fase líquido-condensada. Basicamente, o Chol aumenta o efeito de condensação[123,126] da monocamada de DPPC. Tal efeito é devido à redução de área na isoterma de DPPC, por retirar uma porcentagem (30%, 50% ou 70 %) de moléculas de DPPC (mais expandida) e adicionar as mesmas porcentagens de uma molécula mais rígida que é o colesterol.

A incorporação do EE2 na subfase (Figura 14) reduz o efeito do colesterol nas monocamadas mistas, induzindo um descolamento das isotermas π -A para áreas maiores por molécula, principalmente em $x_{\text{Chol}} = 0,3$ e $0,5$. De fato, o maior efeito de expansão causado pelo EE2, mesmo a altas pressões, ocorreu na monocamada que mimetiza a composição de esterol de uma membrana de mamífero ($x_{\text{Chol}} = 0,3$)[127,128]. Além disso, é possível observar que, para o DPPC, Chol e DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,5$ e $0,7$; em altas pressões, o EE2 foi expelido da interface ar/água.

Uma variação similar da composição em monocamada foi usada por Dopierała e Skrzypiec[129] para investigar a interação do β -caroteno nas monocamadas de DPPC-colesterol. A monocamada mais afetada pela incorporação de β -caroteno foi justamente a que apresentou $X_{\text{Chol}} = 0,25$. Arima et al.[130] também consideraram a razão molar DPPC-colesterol para explicar a baixa toxicidade do antifúngico natamicina em modelos de membrana celular. Neste caso, eles verificaram um efeito considerável da natamicina nas isotermas apenas quando a concentração de colesterol era de 50% em mol ou mais,

enquanto para a mistura que imita uma membrana celular real em mamíferos não ocorreram mudanças significativas.

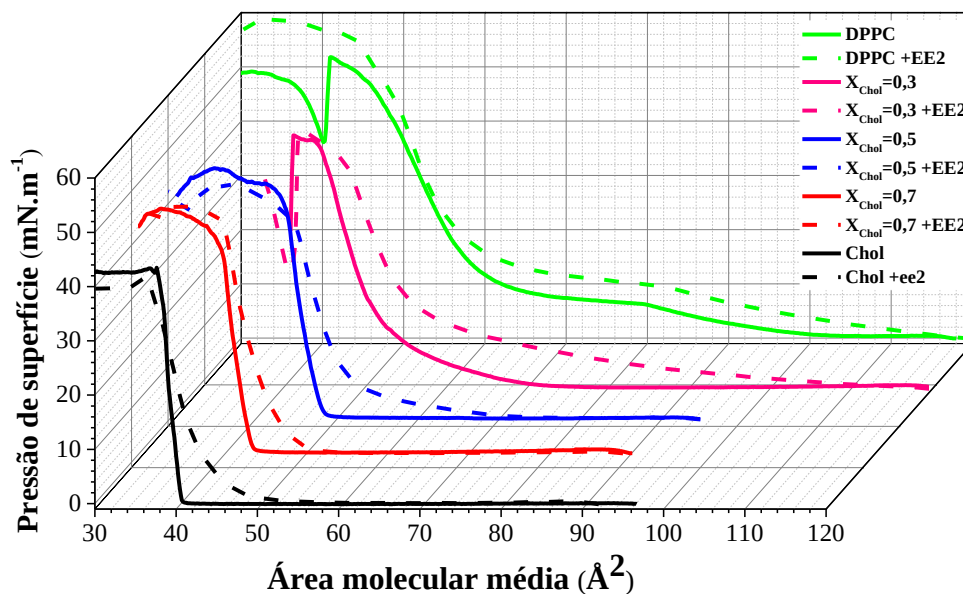


Figura 14: isothermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para as monocamadas de DPPC, colesterol e misturas de DPPC Chol (nas frações molares $x_{\text{Chol}} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura ou EE2 $10 \mu\text{M}$.

Compressibilidade

De acordo com classificações propostas[111,112], o C_s^{-1} mostra as monocamadas de DPPC na presença ou ausência de EE2 na fase líquido-condensada ($C_s^{-1} = 100\text{-}250 \text{ mN.m}^{-1}$). Com o aumento da proporção de colesterol na mistura binária (Figura 15-A) os valores de C_s^{-1} aumentam e, em $x_{\text{Chol}} = 0,7$ se assemelham à isoterma π -A fortemente condensada, próxima à monocamada de colesterol $C_s^{-1} > 250 \text{ mN.m}^{-1}$.

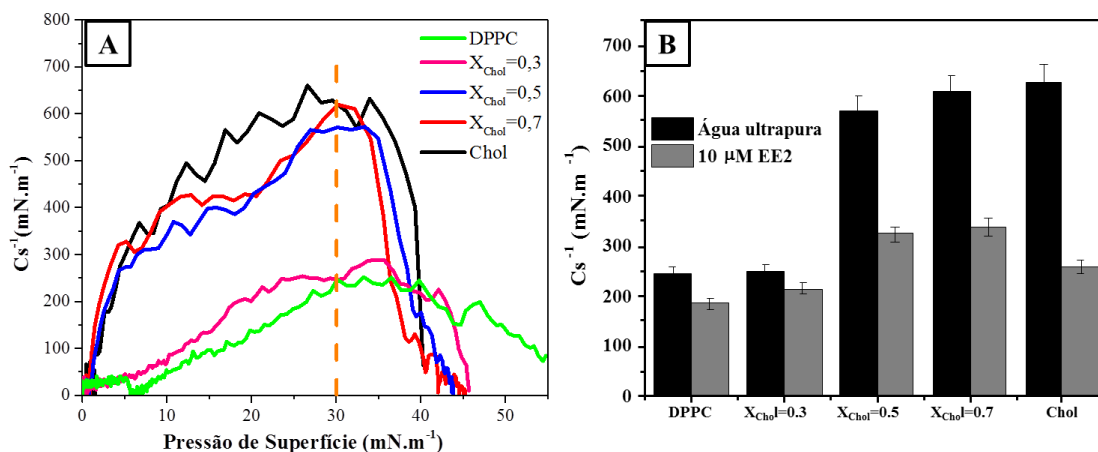


Figura 15: (A) curvas do Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPC, Chol e mistas (X_{Chol} 0,3; 0,5 e 0,7) obtidas das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de 10 μM (cinza).

É importante notar que a presença de EE2 nas monocamadas individuais ou mistas (Figura 15-B) não foi suficiente para promover a mudança da fase condensada para a fase líquida expandida ($Cs^{-1} < 100 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$). Para o $x_{Chol} = 0,7$, uma redução significativa (3 vezes) ocorreu na presença de EE2, indicando o maior efeito de fluidez nessa proporção. Apesar da mudança para áreas maiores observadas nas isotermas de DPPC e DPPC/Chol, $x_{Chol} = 0,3$; a adição de EE2 na subfase não promove uma mudança significativa na elasticidade em geral. Este fato sugere a possibilidade das moléculas de EE2 estarem acomodadas na interface (entre as moléculas da monocamada), promovendo a expansão das monocamadas mistas, mas sem afetar sua elasticidade e transição de fase, mesmo em altas pressões superficiais ($30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$).

Área de excesso

Para os filmes mistos de DPPC/Chol em água ultrapura (Figura 16-A), os valores do excesso de área por molécula foram negativos em todas as faixas de pressões superficiais. De acordo com Miyoshi e Kato[131], tais valores para as monocamadas de

DPPC/Chol confirmam a contração da área média por lipídio com a adição de moléculas de esterol.

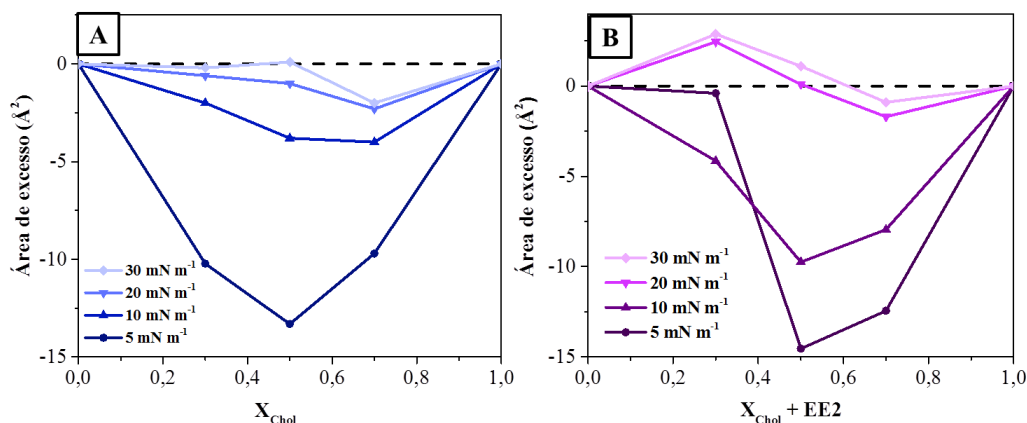


Figura 16: área de excesso (A_{exc}) em função da fração molar de Chol em monocamadas de DPPC formadas em água ultrapura (A) e água ultrapura contendo 10 μ M EE2 (B).

Foi também notado que, em baixa pressão superficial, o desvio negativo em relação à linha pontilhada (ideal) é maior, enquanto que a altas pressões superficiais (por exemplo, 30 mN.m^{-1}) aproxima-se da linha de idealidade. Como também confirmado pelas isotermas π -A, em estágios expandidos da compressão (baixas pressões superficiais) o colesterol reduz a mobilidade da cadeia de hidrocarbonetos de DPPC[132], de modo que a maior contração da área ocupada é causada pela diminuição do grau de liberdade das moléculas na monocamada[133]. Em estágios de alta compressão, o próprio processo da compressão mecânica das barreiras organiza verticalmente as moléculas, tornando a área de excesso quase nula. Além disso, um desvio positivo obtido na presença do hormônio (Figura 16-B) confirmou, assim como pela expansão nas isotermas, que ele ocupa alguma área na interface e pode até mesmo diminuir a interação atrativa entre DPPC e Chol.

PM-IRRAS

A Figura 17 mostra os espectros de PM-IRRAS registrados para monocamadas de Langmuir de DPPC e DPPC/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$), a 30 mN.m^{-1} , na ausência e na presença

do hormônio, seguido dos valores referentes aos modos vibracionais das bandas presentes nos espectros, na Tabela 4. O intervalo de número de onda de 900 a 1800 cm^{-1} corresponde às vibrações dos grupos químicos presentes na cabeça anfifílica do fosfolípido, o que, no caso da DPPC, está de acordo com a literatura[41,134]. Na presença do hormônio na subfase, Stunges et al.[135] apontaram interações íon-dipolo entre o DPPC e o grupo OH do anel fenólico do EE2: atrativa com o grupo catiônico colina ($\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3$) e repulsiva com o fosfato aniônico (PO_4^{2-}), ambos grupos presente na cabeça polar do DPPC. Esses resultados são confirmados aqui ao observar os deslocamentos do espectro das bandas do DPPC referentes a esses grupos na presença do EE2: a $\nu_{\text{as}}(\text{CN}(\text{CH}_3)_3)$ apresentou o deslocamento de 970 para 960 cm^{-1} e a $\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$ se deslocou de 1078 para 1085 cm^{-1} . Além disso, Hübner e Blume[136] sugerem que os deslocamentos de bandas do grupo P=O em direção a maiores números de onda são consequência da desidratação desse grupo, neste caso, causada pela presença do hormônio.

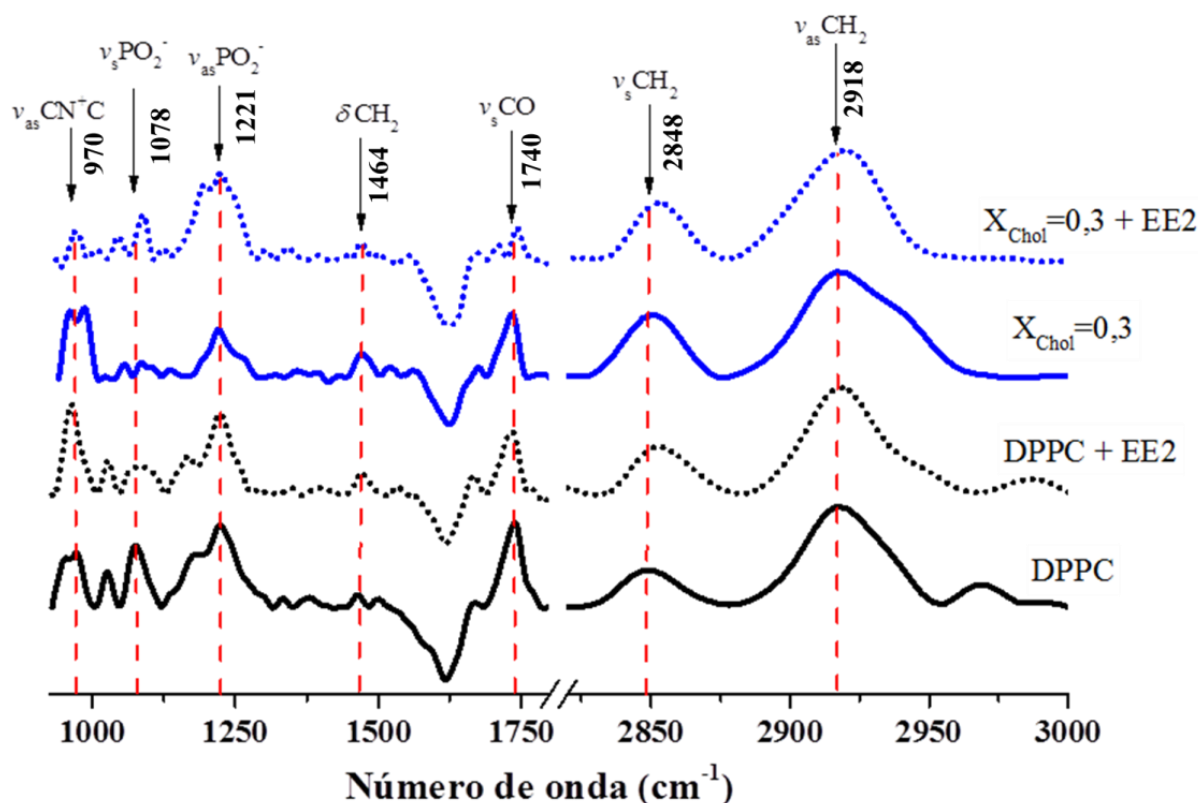


Figura 17: espectros de PM-IRRAS registrados para as monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} em água ultrapura como subfase para DPPC (linha preta) e DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ (linha azul) ou subfase contendo 100 μM de EE2: linha preta tracejada para DPPC e linha azul tracejada para a mistura binária. v_s : estiramento simétrico; v_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Tabela 4: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas de DPPC e DPPC/Chol $x_{\text{Chol}} = 0,3$, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2

Grupo	DPPC (cm^{-1})	DPPC+EE2 (cm^{-1})	DPPC/Chol (cm^{-1})	DPPC/Chol +EE2 (cm^{-1})
$v_{as}(\text{CN}^+\text{N})$	970	960	972	969
$v_s(\text{PO}_2^-)$	1078	1085	1083	1090
$v_{as}(\text{PO}_2^-)$	1221	1221	1221	1223
$\delta(\text{CH}_2)$	1464	1469	1468	1469
$v(\text{C}=\text{O})$	1740	1734	1734	1741
$v_s(\text{CH}_2)$	2848	2854	2850	2856
$v_{as}(\text{CH}_2)$	2918	2920	2920	2922

v_s : estiramento simétrico; v_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Mesmo com a adição de Chol na monocamada de DPPC, não houve mudanças significativas em termos de deslocamento de bandas em números de onda. Esse fato já foi observado por Arrondo et al.[137] em medidas de espectroscopia de absorção no

infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), sugerindo que a presença do esterol parece não influenciar a hidratação das moléculas de água na região da cabeça do fosfolípido[138,139], ou seja, não se altera a rede de ligações de hidrogênio que moléculas de água fazem com os grupo químicos da cabeça, principalmente com o grupo $P=O$.

Os espectros de PM-IRRAS para estes sistemas binários ainda não são discutidos em profundidade na literatura, mas tais efeitos observados podem ser entendidos em termos do rearranjo molecular na monocamada de DPPC/Chol[140]. Sendo altamente hidrofóbicas, as moléculas de Chol tendem a estar distribuídas preferencialmente entre as moléculas de DPPC, minimizando o contato dos anéis do esterol com a água[126]. O grupo hidroxila do colesterol interage por meio de ligações de hidrogênio com o grupo cabeça polar DPPC. Por outro lado, ainda existem interações coesivas de Van der Waals entre os anéis de esterol das moléculas de Chol e as cadeias alquílicas de DPPC.

O principal ponto a ser considerado analisando os espectros da região da cabeça do fosfolípido é o efeito mais pronunciado do EE2 na mistura binária, quando comparado ao seu efeito na monocamada de DPPC. Enquanto para o espectro DPPC/EE2 as alterações na intensidade do sinal das bandas ocorreram em 970 cm^{-1} e 1078 cm^{-1} (atribuídas ao estiramento antissimétrico do grupo colina como (CN^+C) e estiramento simétrico do $P=O$ ($\nu_s PO_2^-$), respectivamente), para o DPPC/Chol/EE2, além dessas bandas, também foram afetados o estiramento antissimétrico do $P=O$, $\nu_{as} PO_2^-$ em 1221 cm^{-1} , a deformação angular do CH_2 (δCH_2) em 1464 cm^{-1} , e a banda da carbonila não hidratada ($C=O$) em 1740 cm^{-1} . Como verificado nas isotermas π -A, o DPPC/Chol ($x_{Chol} = 0,3$), quando comparado com o de DPPC, foi capaz de manter a interação com o EE2 na interface, mesmo em estágios de alta compressão (30 mN.m^{-1}), causando aqui o maior efeito em termos de mudanças na intensidade do sinal PM-IRRAS.

Algumas modificações substanciais também podem ser notadas na região de 2800 a 3000 cm^{-1} em relação aos modos de estiramento em $-\text{CH}_2$ (simétrico em 2848 cm^{-1} e antissimétrico em 2918 cm^{-1})[135,141]. Na presença de EE2, nas duas composições das monocamadas, as bandas de estiramento simétrico de $-\text{CH}_2$ deslocaram 6 cm^{-1} para maiores número de onda. Além disso, a intensidade relativa entre os estiramentos CH_2 simétrico e antissimétrico ($v_s\text{CH}_2/v_{as}\text{CH}_2$) para DPPC e DPPC/Chol ($X_{\text{Chol}} = 0,3$) na presença de EE2 diminuiu de 0,51 para 0,44 e de 0,60 para 0,48, quando comparado com a subfase sem o hormônio. Estas diminuições sugerem um rearranjo das cadeias do DPPC na interface, aumentando o grau de ordenamento das monocamadas[142], provavelmente como resultado de interações eletrostáticas entre o EE2 e o DPPC. Este resultado concorda com o fato do EE2, em altas pressões, ser expulso da monocamada de DPPC e não permanecer na interface, favorecendo a interação do hormônio com os grupos hidratados colina e fosfato. Assim, possivelmente, a interação do EE2 na região periférica na cabeça polar da molécula de DPPC está causando tal ordenamento das cadeias hidrofóbicas do fosfolípido.

Para a mistura binária, esses efeitos de organização das caudas dos lipídios observados nos espectros PM-IRRAS se correlacionam com os valores de área de excesso em 30 mN.m^{-1} , onde se observou que a interação de DPPC/Chol ($X_{\text{Chol}} = 0,3$) foi aumentada pela presença de EE2 na interface. O EE2 foi responsável por enfraquecer as interações atrativas intermoleculares (diminuindo a miscibilidade) entre DPPC e Chol[143], confirmado no PM-IRRAS pelo ordenamento da monocamada mista na presença do hormônio.

Em uma comparação entre DPPC e DPPC/Chol ($X_{\text{Chol}} = 0,3$), na ausência do EE2, a relação ($v_s\text{CH}_2 / v_{as}\text{CH}_2$) aumentou de 0,51 para 0,60 com a introdução do estero na interface, indicando uma diminuição na organização das cadeias da monocamada. De fato, os valores negativos de A_{exc} é verificado no PM-IRRAS em termos da desordem do

DPPC na região da cauda, como consequência da miscibilidade e da interação atrativa entre DPPC-Chol.

Na Figura 18 encontra-se um esquema que resume os principais efeitos do EE2 nas monocamadas.

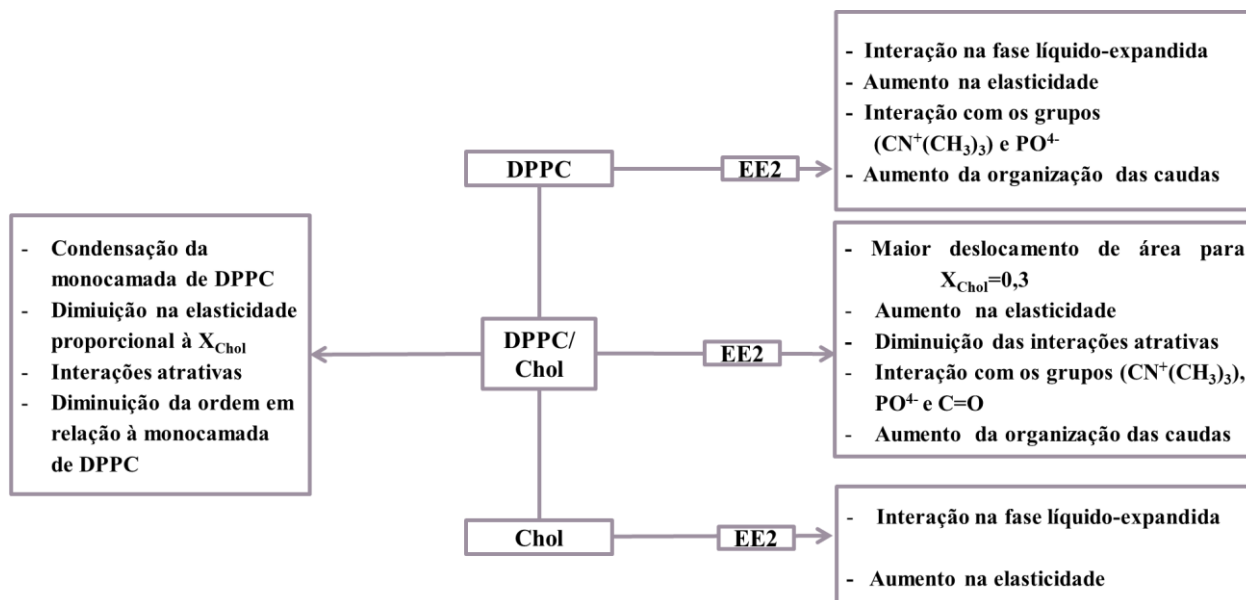


Figura 18: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas puras de DPPC, Chol e da mistura binária DPPC/Chol.

3.2 DPPC/esfingomielina

As isotermas π -A das monocamadas de DPPC, esfingomielina (SM) e as misturas binárias com as frações molares x_{SM} 0,3; 0,5 e 0,7 obtidas em subfase contendo água ultrapura estão apresentadas na Figura 19.

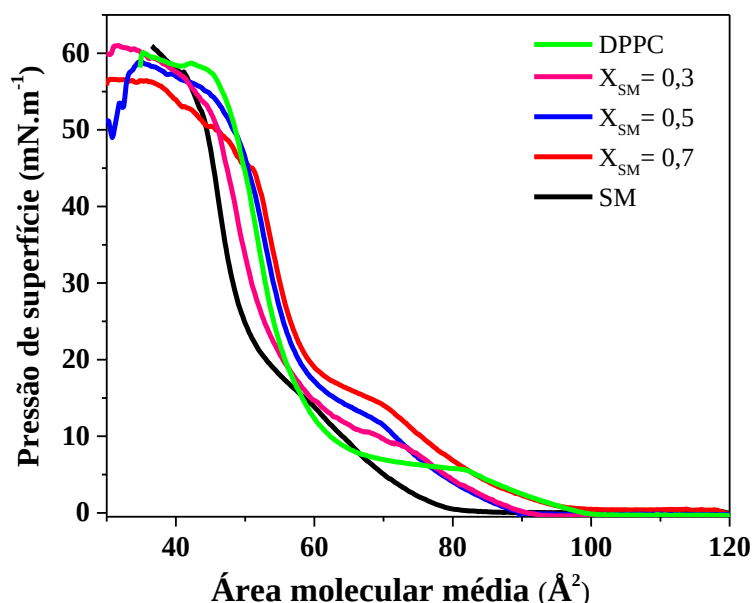


Figura 19: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para as monocamadas de DPPC, esfingomielina e misturas de DPPC/SM (nas frações molares $x_{\text{SM}} = 0,3$; $0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura.

A isoterma π -A de SM mostra características em concordância com resultados já publicados[75,144], com um valor inicial de área molecular média em $80 \text{ \AA}^2$ e área extrapolada em $57 \text{ \AA}^2$. Não há uma região de coexistência de fases (região da isoterma π -A em que a pressão de superfície se mantém constante com a diminuição da área molecular média), como observado, por exemplo, nas isotermas de DPPC. Contudo exibe uma transição entre a fase líquido-expandida (LE) e líquido-condensada (LC) em $\pi \approx 10$ e 20 mN.m^{-1} , respectivamente, com um platô em 15 mN.m^{-1} .

Observa-se que o perfil (mais que a posição) das isotermas π -A de DPPC é fortemente influenciado pela incorporação de diferentes frações molares de SM. Em relação à posição, com exceção da curva de DPPC/SM com $X_{\text{SM}} = 0,7$; para as demais proporções, os valores extrapolados de área por molécula na fase condensada se assemelham aos valores para a curva do DPPC, principalmente em pressões de superfície maiores.

Já o perfil das monocamadas mistas de DPPC variou com o aumento da proporção de SM. A presença de SM na monocamada de DPPC induziu um aumento na pressão de superfície que ocorre a transição da fase LE para a fase LC nas isotermas π -A, além de um alargamento da área ocupada pela fase LE. O mesmo efeito também foi observado por Alvares[145] et al. ao estudar a interação do peptídeo Polybia-MP1 com DPPC. Tal efeito foi explicado em termos dos valores de área de excesso, ao passo que as interações repulsivas entre peptídeo/fosfolipídio faz com que a mistura entre os componentes seja mais estável na fase LE em detrimento da fase LC (fase mais rígida, de maior empacotamento)[146].

As isotermas π -A para monocamadas de DPPC contendo diferentes proporções de SM na presença e ausência do EE2 na subfase estão representadas na Figura 20. A presença do hormônio na subfase induziu um descolamento das isotermas para maiores área por molécula. É possível verificar que para as monocamadas de DPPC e para as misturas binárias, em valores maiores de pressão de superfície, o EE2 foi expelido da interface ar/água. O maior efeito do EE2 em termos de deslocamento, em todos os estágios da compressão, se deu para a isoterma π -A de esfingomiéline, com área extrapolada na fase condensada aumentando de 57 para 65 Å².

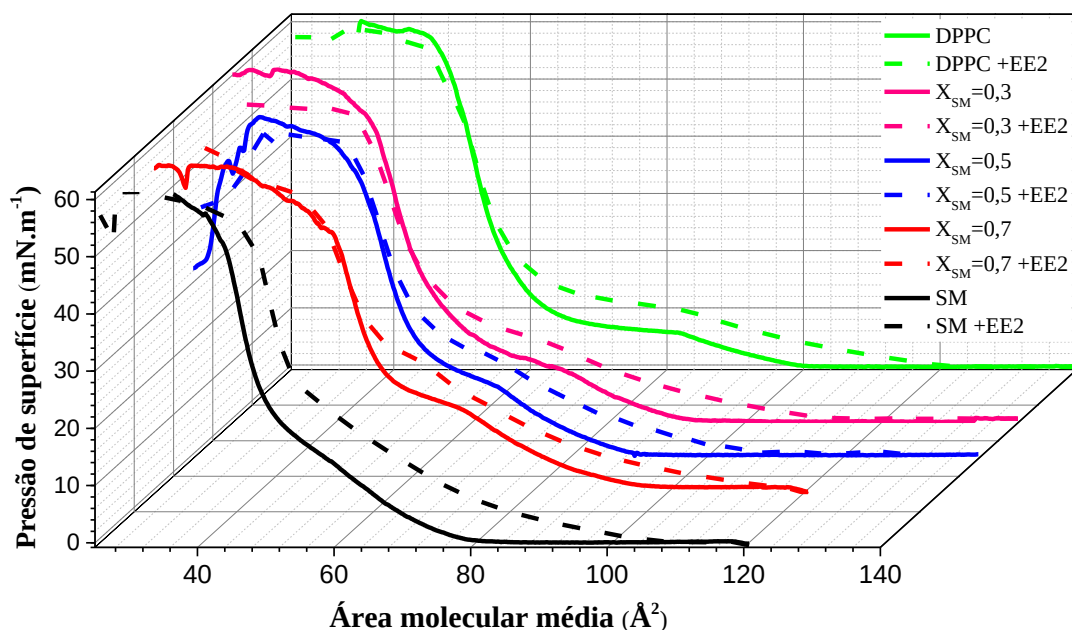


Figura 20: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para as monocamadas de DPPC, SM e misturas de DPPC/SM (nas frações molares $x_{\text{SM}} = 0,3; 0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura ou EE2 $10 \mu\text{M}$. A área molecular média dos filmes mistos é dada considerando somente a área ocupada pelo DPPC.

Compressibilidade

A Figura 21-A expõe os valores de Cs^{-1} para monocamadas de DPPC, SM e as misturas de DPPC/SM. Esses valores confirmam o fato da isoterma de SM atingir a fase LC ($\text{Cs}^{-1} > 100 \text{ mN.m}^{-1}$) em pressões de superfície maiores que a do DPPC. Enquanto para o DPPC a transição da fase LE-LC ($\text{Cs}^{-1} = 100 \text{ mN.m}^{-1}$) ocorre na pressão de superfície de 15 mN.m^{-1} , para a SM este valor é de 23 mN.m^{-1} .

Na pressão de superfície $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ todas as monocamadas (misturas ou não) se encontram na fase LC ($\text{Cs}^{-1} = 100\text{-}250 \text{ mN.m}^{-1}$). Para essa pressão, a presença do EE2 não provoca mudança de fase nas monocamadas (Figura 21-B). Porém, de um modo geral, causa a diminuição dos valores de Cs^{-1} , o que está em concordância com a suavização observada no ponto de inflexão (região de platô) das isotermas π -A na presença do hormônio (Figura 20).

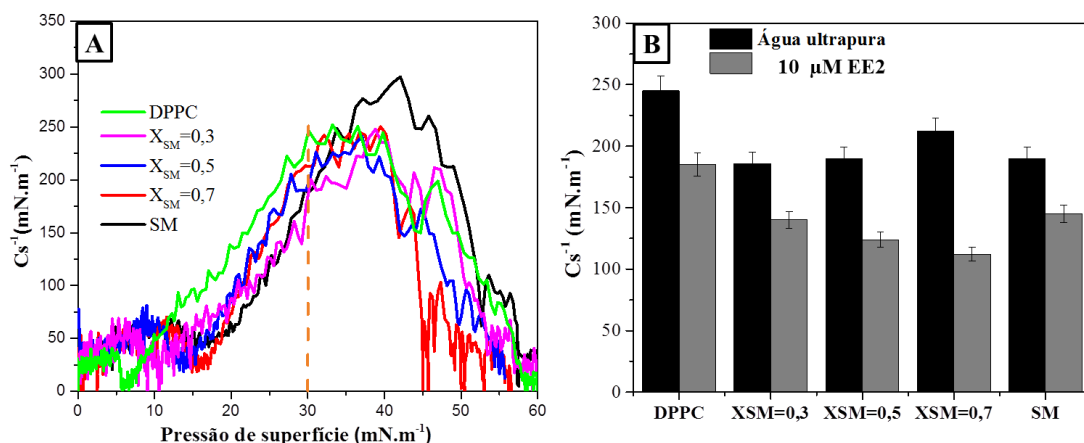


Figura 21: (A) curvas Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPC, SM e mistas (x_{SM} 0,3; 0,5 e 0,7) obtida das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 mN \cdot m^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de 10 μM (cinza).

Área de excesso

A Figura 22 mostra os valores de A_{exc} para as monocamadas mistas obtidos das isotermas π -A na ausência (Figura 22-A) e na presença do EE2 na subfase (Figura 22-B).

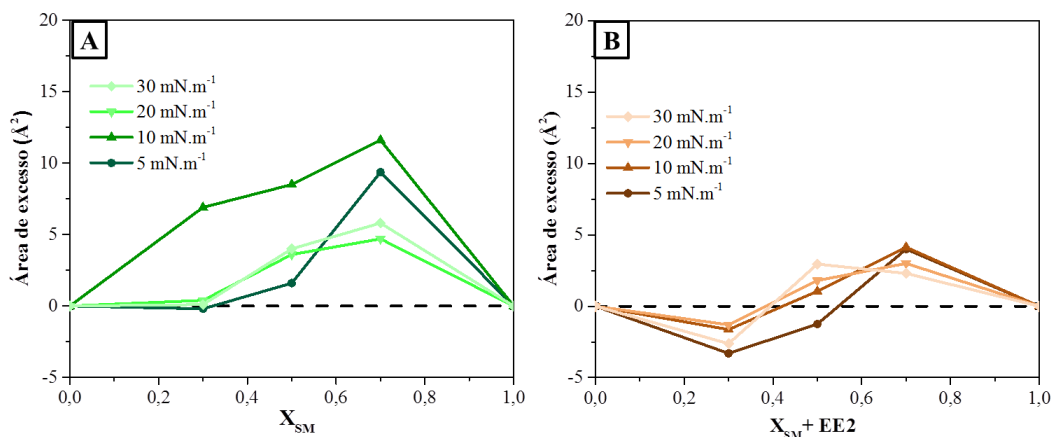


Figura 22: área de excesso (A_{exc}) em função da fração molar de SM em monocamadas de DPPC formadas em água ultrapura (A) e água ultrapura contendo 10 μM EE2 (B).

Os valores de A_{exc} mostrando os desvios positivos em relação à idealidade (Figura 22-A) sugerem que as interações intermoleculares DPPC-SM são menos atrativas que as interações DPPC-DPPC e SM-SM, principalmente para a mistura com $x_{SM} = 0,7$ que apresentou os maiores valores de A_{exc} . Qualquer desvio da idealidade indica uma

interação. Assim, o aumento da pressão de transição de fase do DPPC na presença de SM, observado nas isotermas π -A (Figura 19), é confirmado aqui pelos valores positivos de A_{exc} , indicando a interação repulsiva do esfingolípido com o fosfolípido em água. Ainda, os maiores valores de A_{exc} são para as pressões de superfície $\pi = 5$ e 10 mN.m^{-1} sugerindo que a repulsão entre os componentes na mistura binária é mais proeminente na fase líquido-expandida[145].

A presença do EE2 na subfase aquosa parece favorecer a diminuição das interações repulsivas entre DPPC-SM na mistura binária. Nas monocamadas contendo baixas frações molares de esfingomielina ($x_{SM} = 0,3$) a A_{exc} assume valores negativos com a adição da EE2 no sistema (Figura 22-B), o que indica uma aumento da estabilidade dessas monocamadas[147]. De fato, para monocamadas mistas com baixo teor de SM ($x_{SM} = 0,3$) o efeito do EE2 em diminuir as interações repulsivas entre DPPC e SM é maior. Para elevados teores de SM ($x_{SM} \geq 0,5$), o efeito repulsivo da SM sobre as moléculas de DPPC supera o efeito do EE2 nas monocamadas, apresentando ainda, valores positivos de A_{exc} para esses sistemas.

PM-IRRAS

Os espectros de PM-IRRAS obtidos para as monocamadas de SM, DPPC e DPPC/SM ($x_{SM} = 0,3$), a 30 mN.m^{-1} , na ausência e na presença do EE2 na subfase aquosa, são mostrados nas Figura 23 e Figura 24, respectivamente, e, os valores dos modos vibracionais das bandas presentes nos espectros, encontram-se dispostos na Tabela 5.

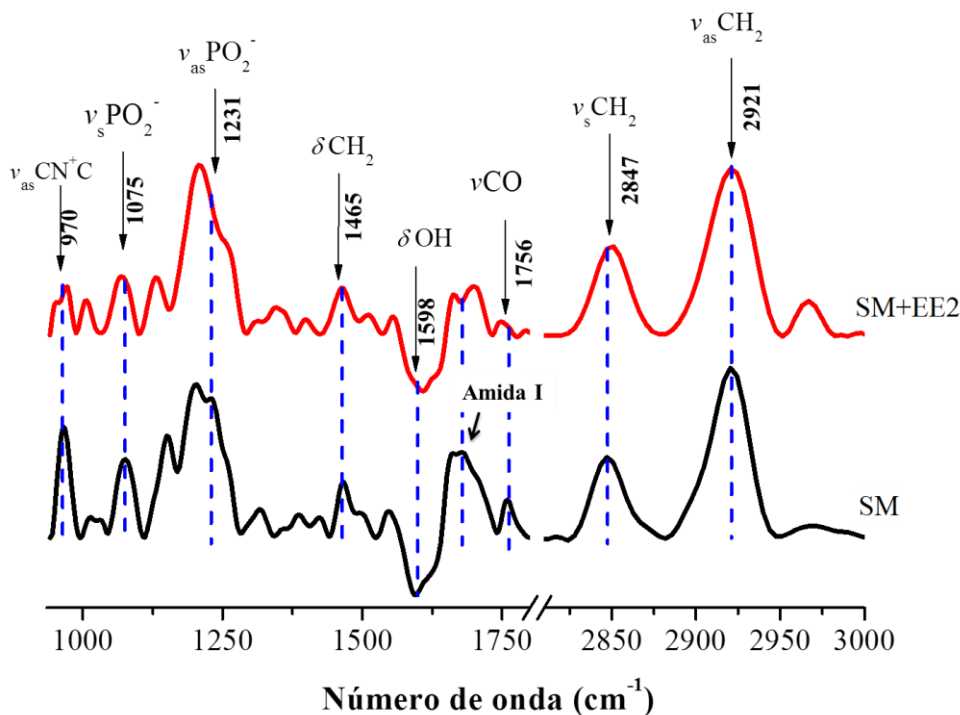


Figura 23: espectros de PM- para as monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} para SM em água ultrapura como subfase (linha preta) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha vermelha). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Na Figura 23 pode-se verificar para as monocamadas de SM, entre 900 e 1800 cm^{-1} , que a presença do EE2 na subfase (linha vermelha) não desloca significativamente as bandas (linha preta) da SM, às quais correspondem ao estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as}\text{CN}^+\text{C} = 970 \text{ cm}^{-1}$), estiramento simétrico e antissimétrico do grupo $\text{P}=\text{O}$ ($\nu_s\text{PO}_2^- = 1075 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 1231 \text{ cm}^{-1}$) e a deformação angular do CH_2 (δCH_2) em 1465 cm^{-1} . O fato do EE2 não deslocar as bandas de vibrações dos grupos colina e fosfato pode indicar que a hidratação das cabeças polares da SM não é afetada pela presença do hormônio[148].

A banda referente ao estiramento do grupo carbonila não hidratado ($\text{C}=\text{O}$), em 1756 cm^{-1} , que para o DPPC aparece em 1740 cm^{-1} , para a SM tem-se um deslocamento de 16 cm^{-1} . O aumento no valor de frequência de vibração do $\text{C}=\text{O}$ comprova que as moléculas de SM estão mais empacotadas[149] em relação às moléculas de DPPC, quando

analisadas a $\pi=30\text{mN.m}^{-1}$. A frequência de vibração do grupo C=O em menores faixas no espectro de DPPC é consequência das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água (subfase) e o grupo presente da cabeça do fosfolípido. Sendo a monocamada de SM mais empacotada que a de DPPC, além dessas ligações de hidrogênio, também ocorre uma forte interação das cadeias de hidrocarbonetos presentes região hidrofóbica da molécula[150]. Portanto, a vibração da ligação C=O ocorrer em regiões de maiores frequências está diretamente relacionada ao fato de as monocamadas serem mais condensadas. A presença do EE2, por sua vez, desloca essa banda em 11 cm^{-1} , novamente para menores números de onda, diminuindo assim o empacotamento da monocamada. Tal efeito está de acordo com o aumento da elasticidade (diminuição de C_s^{-1}) observada na Figura 21-B para a monocamada de SM/EE2. Além disso, a alteração na intensidade relativa entre as bandas da deformação angular do $-\text{CH}_2$ e o estiramento da carbonila, $\delta\text{CH}_2/\nu\text{C=O}$, diminuiu drasticamente de 0,64 para 0,27 na presença do EE2, indicando a interação do hormônio preferencialmente com grupo carbonila, provavelmente pela ligação de hidrogênio do $-\text{OH}$ do anel do EE2 com o oxigênio do C=O, localizado na região polar da molécula de SM. O mesmo mecanismo de interação foi reportado por Nakata et al.[151] no estudo da interação de filmes do fosfolípido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) com EE2.

A contribuição no sinal de PM-IRRAS do grupo amida presente na cabeça polar da SM (amida I: $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$)[144,152] pôde ser observada na banda em 1679 cm^{-1} . Geralmente, outra banda referente à esse grupo aparece em números de onda próximos a 1650 cm^{-1} [144,153]. Contudo, não foi possível observar devido a interferência na região em torno de 1600 cm^{-1} , que aparece uma intensa banda orientada para baixo, sendo atribuída à deformação angular do grupo OH da água (δOH) [154,155].

Na região de $2800\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ dos espectros PM-IRRAS, relativa aos modos de estiramento do grupo $-\text{CH}_2$ presentes na região da cauda apolar dos lipídios, para a

monocamada de SM, duas bandas principais referentes aos estiramentos simétrico ($\nu_s\text{CH}_2$) e antissimétrico ($\nu_{as}\text{CH}_2$) apareceram em 2847 e 2921 cm^{-1} , respectivamente. Na presença do EE2, não houve deslocamentos de banda nessa região do espectro. Além disso, a intensidade relativa entre as bandas do estiramento simétrico e antissimétrico $-\text{CH}_2$ ($\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$) praticamente não se alterou, aumentando de 0,49 para 0,52.

Esses resultados indicam que o maior deslocamento observado na isoterma de SM na presença do EE2 na subfase, e a manutenção do hormônio na interface mesmo em altas pressões de superfície se deve à interação com o grupo carbonila não-hidratado. Entretanto, tal interação na região da cabeça polar não possui efeito significativo sobre as orientações moleculares das cadeias hidrofóbicas do lipídio.

As mudanças espectrais mais acentuadas em virtude da presença do EE2 ocorreram na mistura binária DPPC/SM ($x_{\text{SM}} = 0,3$), como mostrado na Figura 24. Para efeito de comparação, também foram plotados os espectros PM-IRRAS para as monocamadas de SM e DPPC, com e sem o hormônio na subfase.

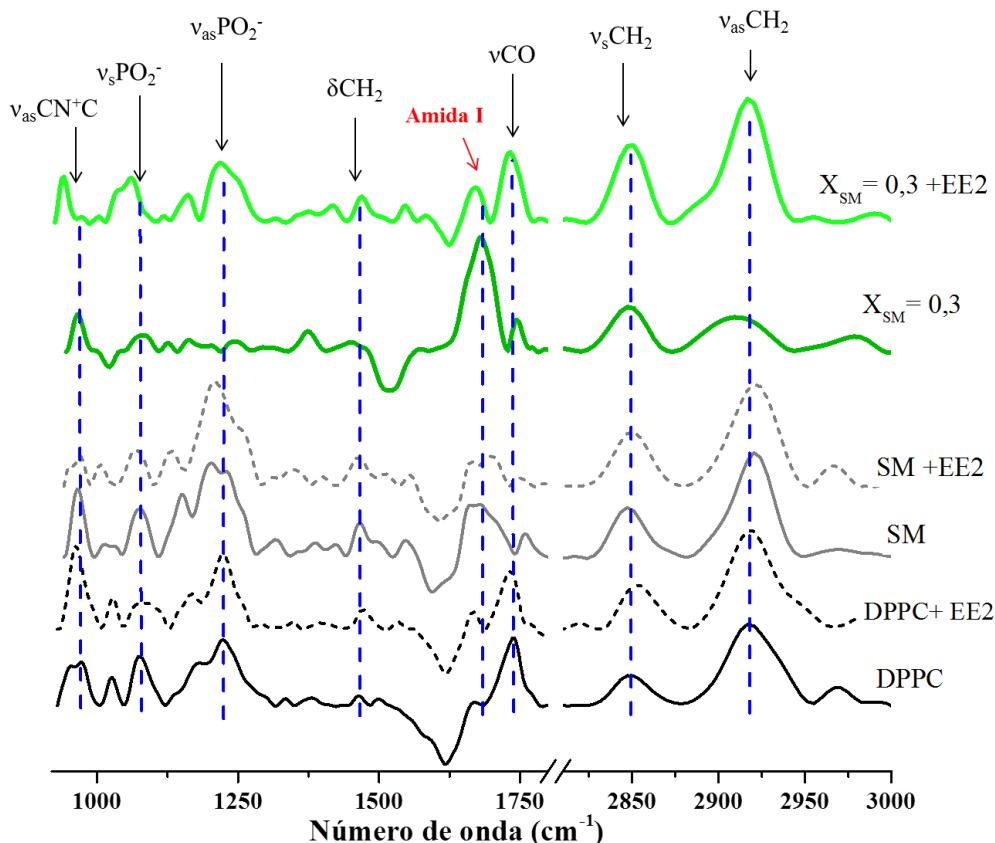


Figura 24: espectros de PM-IRRAS para as monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} para a mistura binária DPPC/SM, $x_{\text{SM}} = 0,3$ em água ultrapura como subfase (linha verde escuro) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha verde claro). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Tabela 5: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas de DPPC e DPPC/SM $x_{\text{SM}} = 0,3$, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2

Grupo	DPPC (cm^{-1})	DPPC+ EE2 (cm^{-1})	SM (cm^{-1})	SM+EE2 (cm^{-1})	DPPC/SM (cm^{-1})	DPPC/SM +EE2 (cm^{-1})
$\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+\text{N})$	970	960	970	968	964	971
$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	1078	1085	1075	1075	1077	1060
$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	1221	1221	1231	1240	1219	1217
$\delta(\text{CH}_2)$	1464	1469	1465	1464	1454	1468
$\nu(\text{C=O})$	1740	1734	1756	1745	1741	1731
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2848	2854	2847	2848	2948	2848
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2918	2920	2921	2920	2916	2916

ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Como discutido anteriormente, nas isotermas π -A em 30 mN.m^{-1} , o EE2 é expulso da interface na monocamada de DPPC e a interação do DPPC/EE2 observada no PM-IRRAS ocorre por meio de interações eletrostáticas do $-\text{OH}$ do anel do hormônio com os

grupos carregados fosfato e colina presentes na região da cabeça polar do fosfolípido. No caso das isotermas π -A de SM, o hormônio permanece na interface em todos os estágios de compressão da monocamada e, no espectro PM-IRRAS, a principal interação se dá com o grupo carbonila (C=O) não hidratado da cabeça polar, justamente posicionado na interface ar-líquido, quando organizado em elevadas pressões de superfície.

De acordo com os valores positivos de área de excesso, as moléculas de DPPC e SM não formam uma monocamada miscível, ou possuem interação repulsiva entre elas. Logo, na monocamada de DPPC/SM ($x_{SM} = 0,3$) exposta ao hormônio, parte das moléculas de EE2 interagem com o DPPC e outra parte com a SM. Os deslocamentos observados nas bandas referentes aos estiramentos dos grupos colina ($\nu_{as}CN^+C$: de 964 cm^{-1} para 971 cm^{-1}) e fosfato ($\nu_sPO_2^-$: de 1077 cm^{-1} para 1060 cm^{-1}) na monocamada mista podem ser atribuídas à interação do hormônio com o DPPC. Por outro lado, a interação do EE2 com a SM na mistura DPPC/SM ($x_{SM} = 0,3$) ocorreu na região da carbonila (1756 cm^{-1}), evidenciado pelo descolamento de 10 cm^{-1} dessa banda na presença do hormônio. Além disso, com o EE2 na subfase, verificou-se a inversão da intensidade das bandas referentes à amida I e C=O, mostrando que a interação do EE2 com o grupo C=O da SM pode estar perturbando a orientação dos grupos vizinhos à esta ligação, que, nesse caso, trata-se da amida I.

Na região de maiores números de onda, constatou-se uma expressiva alteração de 1,30 (sem EE2) para 0,61 (com EE2) na intensidade relativa das bandas referentes ao estiramento simétrico e antissimétrico ($\nu_sCH_2/\nu_{as}CH_2$) do grupo $-CH_2$, (ν_sCH_2 : 2848 cm^{-1} e $\nu_{as}CH_2$: 2916 cm^{-1}) presentes na cauda dos lipídios. Tal resultado pode ser relacionado com os valores de área de excesso calculados a partir das isotermas obtidas com o hormônio na subfase, nos quais, para a mistura DPPC/SM ($x_{SM} = 0,3$), foram negativos (Figura 22-B). O EE2 foi responsável por diminuir a repulsão entre as moléculas de DPPC

e SM, acarretando em um ordenamento das caudas hidrofóbicas do DPPC e da SM na presença do hormônio, como verificado no espectro PM-IRRAS. O resumo dos principais efeitos do EE2 sobre a mistura binária discutida, encontra-se esquematizado na Figura 25.

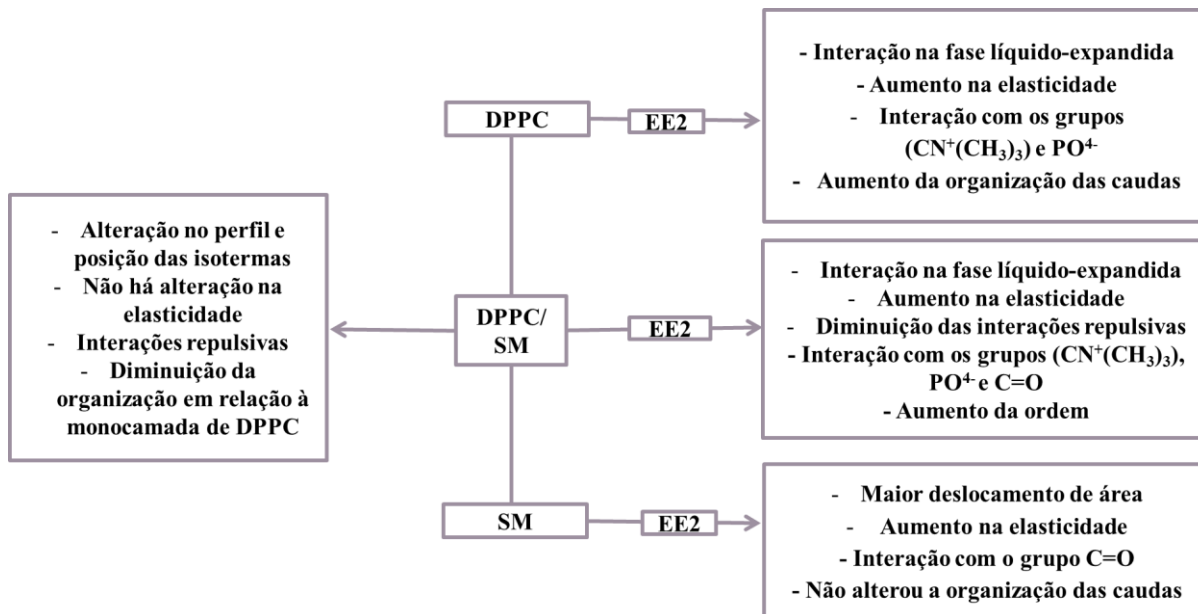


Figura 25: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas pura de DPPC, SM e da mistura binária DPPC/SM.

3.3 Esfingomielina/Colesterol

Isotermas π -A

Na Figura 26 são mostradas as isotermas π -A das monocamadas mistas de SM/Chol, com as frações molares x_{Chol} 0,3; 0,5 e 0,7.

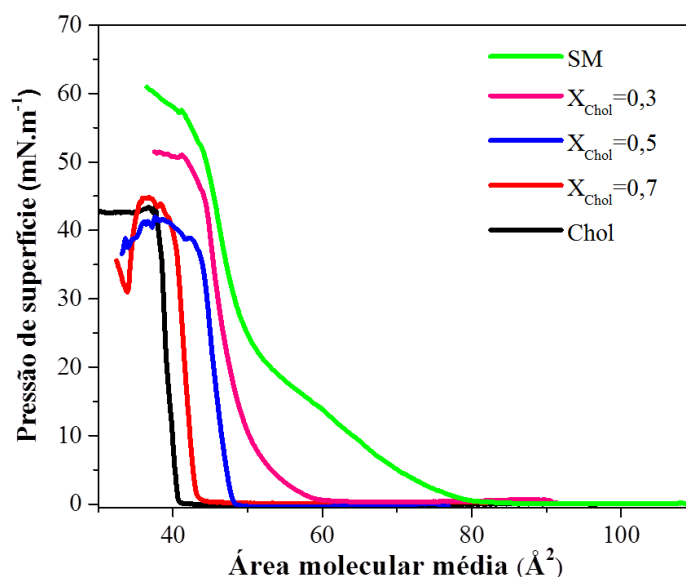


Figura 26: isothermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para as monocamadas de SM, colesterol e misturas de SM/Chol (nas frações molares de colesterol $x_{\text{Chol}} = 0,3$; $0,5$ e $0,7$) em subfase contendo água ultrapura.

Os efeitos causados pela presença do Chol na monocamada de SM são basicamente os mesmos observados para a mistura DPPC/Chol: o colesterol induz a condensação da monocamada de esfingomielina, sendo possível observar o desaparecimento do ponto de transição de fase LE-LC já na proporção contendo $x_{\text{Chol}} = 0,3$ quando comparado à monocamada de SM.

O efeito do colesterol nas monocamadas de DPPC e SM são mostrados na Tabela 6 e podem ser obtidos por meio do cálculo da porcentagem de condensação, segundo a equação proposta por Ali *et al.*[156] :

$$\% \text{condensação} = [(A_{\text{ideal}} - A_{12}) / A_{\text{ideal}}] \times 100$$

onde a A_{ideal} é calculada pela área por molécula referente ao componente puro multiplicado pela fração molar do componente, e A_{12} é a área molecular ocupada, determinada experimentalmente.

Tabela 6: condensação do Chol em monocamadas mistas de DPPC e SM

Lipídio	Pressão de superfície (mN.m ⁻¹)	Porcentagem de condensação da monocamada (%)		
		X _{Chol} = 0,3	X _{Chol} = 0,5	X _{Chol} = 0,7
DPPC	5	14,5	21,6	18,3
	10	3,6	6,9	8,6
	20	1,1	2,0	5,2
	30	0	0	4,2
SM	5	27,3	26	22,3
	10	23,2	20,0	16,8
	20	14,5	11,0	10,4
	30	6,5	3,7	5,3

É possível verificar na Tabela 6 que o efeito de condensação do colesterol na monocamada de SM foi maior do que na de DPPC. Além disso, a condensação mais significativa das monocamadas de SM/Chol ocorreu nas pressões de 5 e 10 mN.m⁻¹, estágios nos quais as monocamadas se encontram na fase líquido-expandida.

É reportado na literatura[140,150,157] que o colesterol interage mais fortemente com a esfingomielina do que com os glicerofosfolípidios, como o DPPC. Tal fato está relacionado às ligações de hidrogênio entre SM/Chol serem mais fortes do que entre DPPC/Chol. O átomo que está ligado covalentemente a um hidrogênio é chamado o doador de ligação de hidrogênio, enquanto que os demais átomos envolvidos na interação intermolecular são os aceptores (Figura 27). A diferença importante é que na região interfacial da SM há tantos grupos doadores da ligação de hidrogênio como grupos aceptores, enquanto o grupo colina (fosfatidil) contém apenas grupos aceptores da ligação de hidrogênio (Figura 27). Esses grupos doadores (hidroxila e amida) dos esfingolipídios são os responsáveis por formar uma extensa rede estabilizadora de ligação de hidrogênio na superfície das mono ou bicamadas[158]. Além disso, o fato de a % de condensação diminuir à medida em que se aumenta a pressão de superfície, é justamente porque em baixas pressões de superfície (por exemplo, 5 mN.m⁻¹) esses grupos estão em contato com a água e formam uma rede de ligações de hidrogênio mais intensa do que quando estão organizados verticalmente (altas pressões).

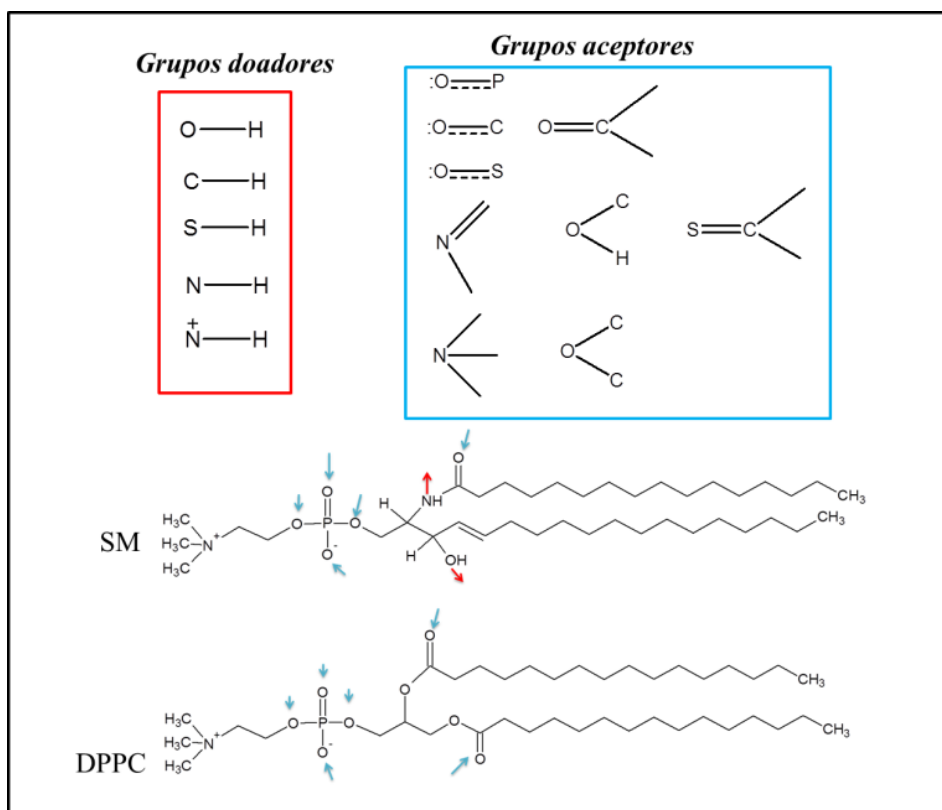


Figura 27: grupos funcionais de moléculas biológicas envolvidas na ligação de hidrogênio. Estrutura molecular da SM e DPPC: os grupos aceptores de ligações de hidrogênio estão indicados com setas azuis e os doadores com setas vermelhas. Adaptado de Slotte[150].

As isotermas π -A de SM/Chol na presença do EE2 na subfase é mostrada na Figura

28.

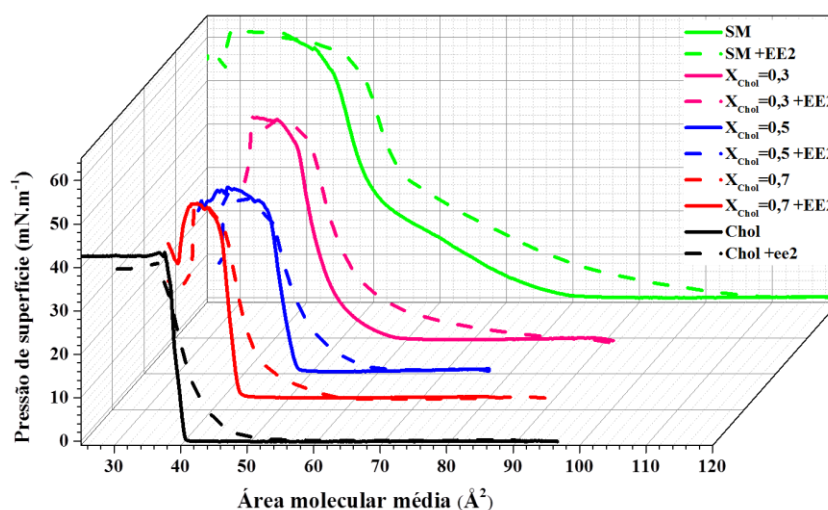


Figura 28: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ$ C para as monocamadas de SM, Chol e misturas de SM/Chol (nas frações molares $x_{SM}=0,3$; $0,5$ e $0,7$) na subfase contendo água ultrapura ou EE2 10 μ M. A área molecular média dos filmes mistos é dada considerando somente a área ocupada pela SM.

Em todas as misturas de SM/Chol é observado um deslocamento nas curvas π -A para maiores áreas na presença do EE2 na subfase aquosa. Nas proporções $x_{\text{Chol}}=0,5$ e $0,7$; na fase líquido-condensada, o EE2 foi expelido da interface ar/água e as áreas obtidas na presença do hormônio se igualaram às obtidas somente em água ultrapura. Novamente, o maior efeito de expansão (aproximadamente $5\text{\AA}^2$) causado pelo hormônio se deu para a mistura SM/Chol, $x_{\text{Chol}}=0,3$ e o hormônio permaneceu na interface ar/água até o colapso da monocamada. No caso da mistura SM/Chol é possível prever que o efeito se deu pela maior afinidade do hormônio à SM, uma vez que tal proporção de $x_{\text{Chol}}=0,3$ contém 70% do esfingolípido. Tal efeito é diferente do observado para a mistura de DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}}=0,3$; que também se obteve o maior deslocamento da isoterma na presença do EE2, porém não em decorrência da maior afinidade do hormônio pela monocamada de DPPC, visto que o EE2 é expelido da interface em altas pressões de superfície.

Compressibilidade

O gráfico dos valores de C_s^{-1} vs a pressão superficial (π) para monocamadas de SM, Chol e as misturas de SM/Chol são mostrados na Figura 29-A. Os valores para as monocamadas SM/Chol, com $x_{\text{Chol}}=0,5$ e $0,7$ são característicos de monocamadas fortemente condensadas. Com a diminuição da proporção de esterol na mistura ($x_{\text{Chol}}=0,3$) a curva de C_s^{-1} torna-se mais suavizada e decai para menores valores, porém não o suficiente para a mudança de fase. Aliás, mesmo a menor proporção de Chol é suficiente para deixar a monocamada de SM mais rígida, pois atinge rapidamente a fase LC ($C_s^{-1}=100\text{ mN.m}^{-1}$), na de pressão de superfície 8 mN.m^{-1} (Figura 29-A, curva rosa).

O gráfico de barras contendo os valores de C_s^{-1} na pressão de 30 mN.m^{-1} obtidos das isotermas π -A puras e mistas, em subfase contendo água ultrapura ou EE2, são mostrados na Figura 29-B. O EE2 causou uma redução no módulo compressional em

todas as misturas, apontando a ação do hormônio em fluidificar as monocamadas. Contudo, as monocamadas ainda permaneceram na fase condensada, com valores de Cs^{-1} maiores que 250 mN.m^{-1} . Como a mistura SM/Chol forma monocamadas mais condensadas, o efeito do hormônio EE2 foi menos pronunciado em termos de alterações da elasticidade.

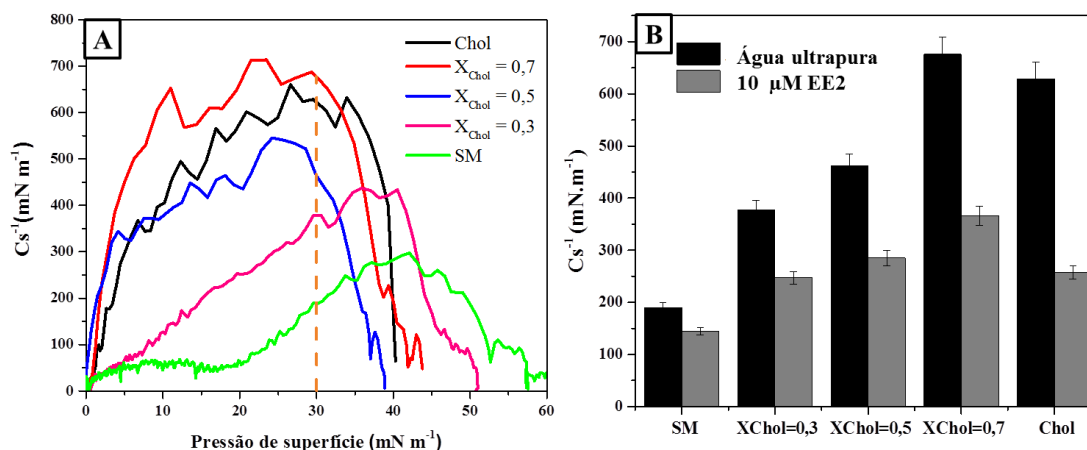


Figura 29: (A) curvas Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de SM, Chol e mistas (x_{Chol} 0,3, 0,5 e 0,7) obtida das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ (cinza).

Área de Excesso

A Figura 30 apresenta a área de excesso para os sistemas mistos SM/Chol tanto para monocamadas de SM formadas tanto em água ultrapura (Figura 30-A) como contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 na subfase (Figura 30-B).

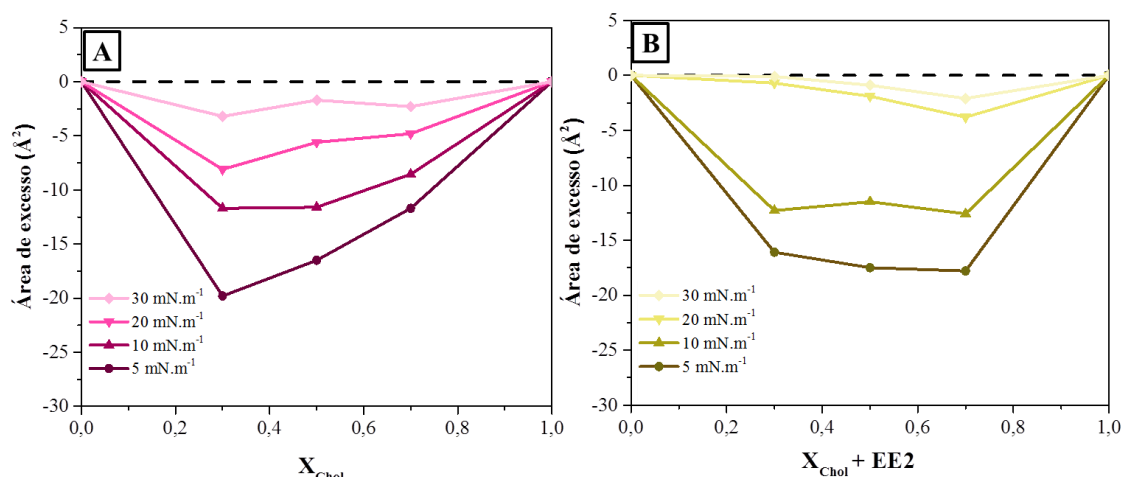


Figura 30: área de excesso (A_{exc}) em função da fração molar de Chol em monocamadas de SM formadas em água ultrapura (A) e em água ultrapura contendo 10 μ M EE2 (B).

Todas as misturas exibiram valores de $A_{exc} < 0$, o que comprova o comportamento não ideal e a miscibilidade das monocamadas investigadas. Para as misturas em subfase de água ultrapura a A_{exc} foi maior para a proporção em $x_{Chol} = 0,3$, sugerindo que tal mistura possui interações atrativas mais intensas que as demais. Também foi possível verificar que as áreas são menores (mais negativas) para misturas contendo SM/Chol em comparação com aquelas compostas por DPPC/Chol. Este fato confirma a magnitude do efeito de condensação induzido pelo colesterol ser maior na mistura com a SM. Ainda, o EE2, principalmente em altas pressões de superfície, diminuiu as interações atrativas entre SM e Chol, como verificado pela aproximação da curva à linha da idealidade na pressão de 30 mNm^{-1} . Contudo, tal ação do hormônio nas monocamadas mistas não foi suficiente para as monocamadas sofrerem desvios positivos, como no caso do verificado nas monocamadas de DPPC/Chol (Figura 16-A).

PM-IRRAS

Os espectros PM-IRRAS obtidos na pressão de 30 mNm^{-1} dos filmes mistos de SM/Chol, $x_{Chol}=0,3$; contendo ou não EE2 na subfase, bem como as atribuições dos principais modos vibracionais apresentados na Figura 31 e Tabela 7, respectivamente.

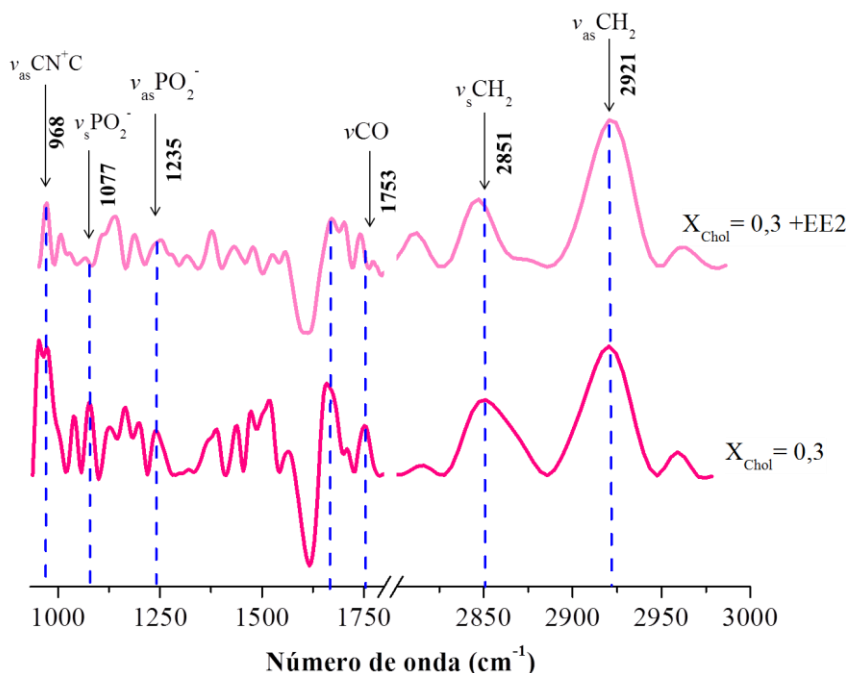


Figura 31: espectros de PM-IRRAS das monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} para a mistura binária SM/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ em água ultrapura como subfase (linha rosa) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha rosa claro). v_s : estiramento simétrico; v_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Tabela 7: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas de SM e SM/ $x_{\text{Chol}} = 0,3$, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2

Grupo	SM (cm^{-1})	SM+EE2 (cm^{-1})	SM/Chol (cm^{-1})	SM/Chol +EE2 (cm^{-1})
$v_{as}(\text{CN}^+\text{N})$	970	968	970	971
$v_s(\text{PO}_2^-)$	1075	1075	1077	1065
$v_{as}(\text{PO}_2^-)$	1231	1240	1239	1250
$\delta(\text{CH}_2)$	1465	1464	1473	1473
$\nu(\text{C=O})$	1756	1745	1753	1740
$v_s(\text{CH}_2)$	2847	2848	2850	2856
$v_{as}(\text{CH}_2)$	2921	2920	2920	2922

v_s : estiramento simétrico; v_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Na presença de EE2, a banda referente ao C=O foi deslocada para menores números de onda, de 1753 cm^{-1} para 1740 cm^{-1} . A análise para o espectro da SM e DPPC sobre o deslocamento dessa banda pode ser utilizada também nesse caso: a presença do EE2 na monocamada de SM/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ deslocando a banda do C=O para menores números de onda indica a diminuição do empacotamento da monocamada mista (como confirmado

pela diminuição de Cs^{-1} , Figura 29. Consequentemente, o hormônio causa o enfraquecimento das forças atrativas entre as moléculas de SM e Chol, como verificado no gráfico de área de excesso (Figura 30) que, para a mistura contendo $x_{Chol}=0,3$ a área de excesso na pressão de 30 mN.m^{-1} chegou a valores próximos a zero, indicando praticamente a ausência de interações entre os componentes da mistura binária. Além disso, tal deslocamento no espectro PM-IRRAS da monocamada mista pode ser ainda devido à própria interação do hormônio com o grupo não-hidratado da SM, assim como apontando nos espectros da SM na presença do EE2.

Diferentemente da influência do EE2 na monocamada de SM, para mistura SM/Chol, $x_{Chol}=0,3$ são observadas mudanças no espectro PM-IRRAS no grupo hidratado fosfato ($P=O$), mais precisamente na banda referente ao estiramento simétrico, ν_s , desse grupo (em 1077 cm^{-1}), que descolou, na presença do hormônio, 12 cm^{-1} para menores números de onda. Sendo o grupo $P=O$ sensível às interações de hidrogênio, estas podem ser atribuídas à interação com o EE2 (e não com o colesterol), por meio da hidroxila $-OH$ presente no anel da molécula do hormônio. Tal constatação é possível, visto que praticamente não há diferenças na vibração do estiramento simétrico do grupo $P=O$ para a SM e para a mistura SM/Chol, $x_{Chol}=0,3$, que ocorre em 1075 cm^{-1} e 1077 cm^{-1} , respectivamente.

Finalmente, para o intervalo de frequências entre 2800 e 3000 cm^{-1} , o EE2 não proporciona relevantes descolamentos tanto nas vibrações de estiramento simétrico do $-CH_2$ (2851 cm^{-1} deslocado para 2848 cm^{-1}), como no assimétrico em 2921 cm^{-1} , que não se altera. A única mudança se deu na intensidade relativa entre o estiramento simétrico e antissimétrico $-CH_2$ ($\nu_s CH_2 / \nu_{as} CH_2$) para SM e SM/Chol ($x_{Chol} = 0,3$), que na presença do EE2 diminuiu de $0,58$ para $0,47$, indicando um maior ordenamento das cadeias hidrofóbicas. Assim como para as outras monocamadas mistas na presença do hormônio, tais efeitos de ordenamento observados nos espectros PM-IRRAS podem ser relacionados

com os valores de área de excesso em 30 mN.m^{-1} , no qual para a mistura SM/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$), o EE2 foi responsável por desfavorecer as interações atrativas intermoleculares entre SM e Chol.

Os principais efeitos do EE2 sobre as monocamadas de SM/Chol encontram-se resumidos na Figura 32.

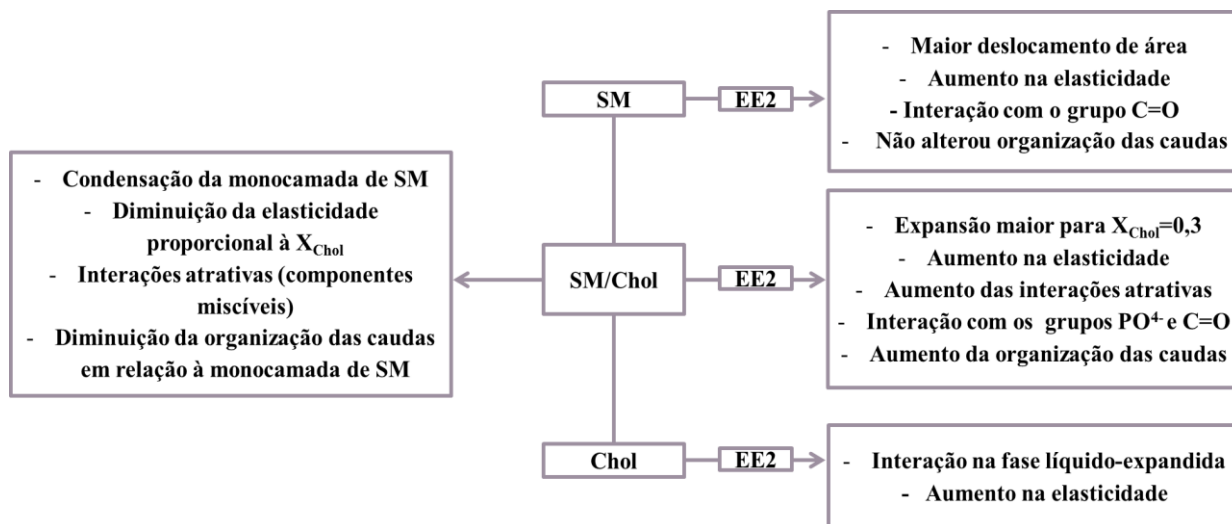


Figura 32: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas pura de SM, Chol e da mistura binária SM/Chol.

3.4 DPPC/colesterol/esfingomielina

Isotermas π -A

As isotermas π -A para os filmes mistos de DPPC/Chol/SM nas proporções molares 1/1/1 e 7/2/1 são apresentadas na Figura 33 e foram obtidas em subfase contendo água ultrapura ou solução aquosa de EE2 com concentração final de $1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Para tais proporções, os perfis e valores médios extrapolados de área molecular correspondem aos encontrados em outros trabalhos[159,160], com 46 e $52 \text{ \AA}^2$ para DPPC/Chol/SM 1/1/1 e 7/2/1, respectivamente. Tais valores confirmam o efeito condensador do colesterol em monocamadas mistas, sendo maior para isoterma contendo a maior proporção do esterol na mistura ternária (1/1/1). É possível verificar também que a maior proporção de colesterol na mistura ternária elimina a região de transição de fase LE-LC, visto que essa

só aparece para a mistura DPPC/Chol/SM 7/2/1 na pressão superficial de 8 mN.m^{-1} , mesmo valor de pressão em que ocorre a transição na isoterma π -A formada somente por DPPC.

A presença do EE2 nas monocamadas mistas ternárias causou o deslocamento da área molecular média para maiores valores, contudo a expansão das curvas se deu para valores de pressão superficial abaixo 20 mN.m^{-1} para a proporção 1/1/1 e 15 mN.m^{-1} para 7/2/1. Acima desses valores de pressão, para ambas as composições das misturas ternárias, a área molecular média deslocou para valores inferiores aos observados para as monocamadas ternárias na ausência do hormônio, sugerindo uma compactação da monocamada.

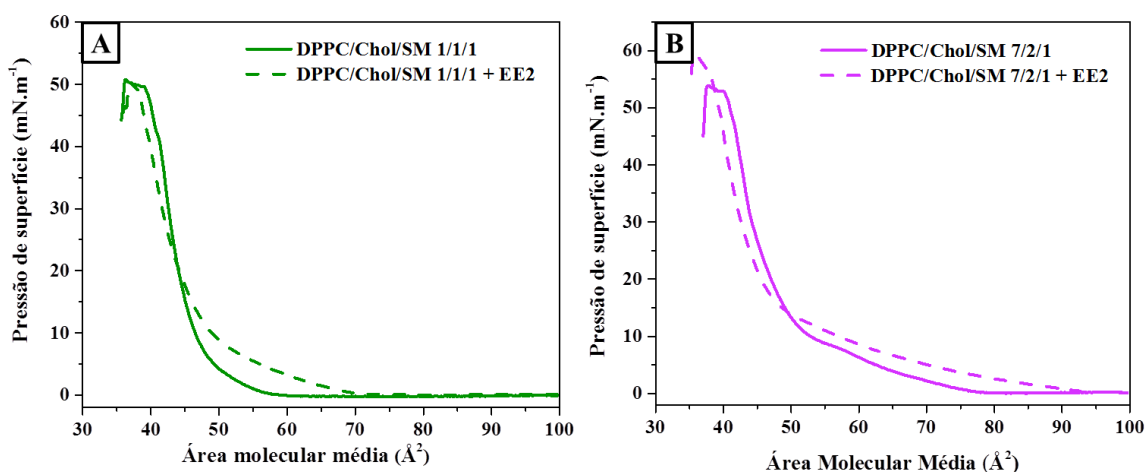


Figura 33: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ na subfase contendo água ultrapura (linha sólida) ou água ultrapura contendo $10 \mu\text{M}$ EE2 (linha pontilhada) para as monocamadas mistas de DPPC/Chol/SM, nas proporções molares 1/1/1 (A) e 7/2/1 (B).

Compressibilidade

Além do efeito condensador, a influência do colesterol se reflete também no aumento da rigidez das monocamadas mistas. Tais efeitos foram confirmados pelos valores do módulo compressional (Cs^{-1}) mostrados na Figura 34. Para a monocamada contendo 20% em mol de colesterol, ou seja, DPPC/Chol/SM (7/2/1), os valores de Cs^{-1} se encontram na fase LC ($\text{Cs}^{-1} = 100\text{-}250 \text{ mN.m}^{-1}$). Com a maior proporção de colesterol na mistura, DPPC/Chol/SM (1/1/1), o Cs^{-1} para as monocamadas na ausência do

hormônio atingiu fases rígidas, com valores maiores 250 mN.m^{-1} . Na pressão de superfície $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ o efeito do EE2 se deu em diminuir a rigidez das monocamadas, que, para ambas as proporções se encontram na fase LC ($Cs^{-1} = 100\text{-}250 \text{ mN.m}^{-1}$). A ação do hormônio em deixar a monocamada mais elástica foi mais acentuada na mistura com proporção 1/1/1, contendo mais colesterol, corroborando com os resultados das misturas binárias, nas quais os maiores decréscimos de Cs^{-1} em decorrência do EE2 foram para misturas com 30% ou mais de colesterol na composição.

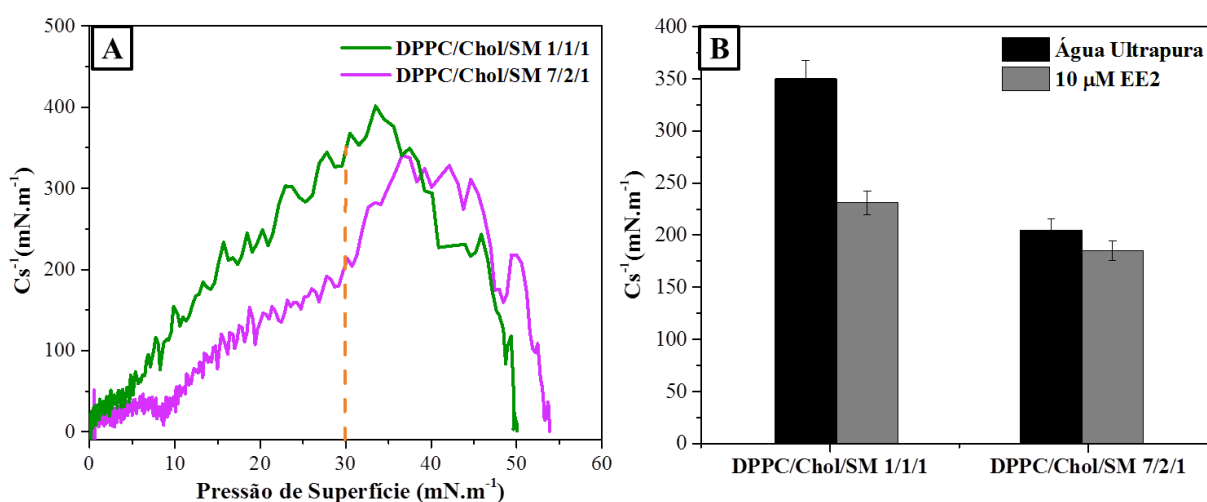


Figura 34: (A) curvas Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas formadas pela mistura ternária de DPPC/Chol/SM nas proporções molares 1/1/1 e 7/2/1, obtidas das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura. (B) Gráfico de barras Cs^{-1} vs. a composição da monocamada obtido das isotermas π -A em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ (cinza).

PM-IRRAS

A Figura 35 apresenta os espectros PM-IRRAS obtidos a uma pressão de superfície de 30 mN.m^{-1} para monocamadas de DPPC/Chol/SM (7/2/1) em subfase contendo água ultrapura e após a adição de EE2, seguida da Tabela 8 com as atribuições dos modos vibracionais dos grupos químicos identificados nos espectros.

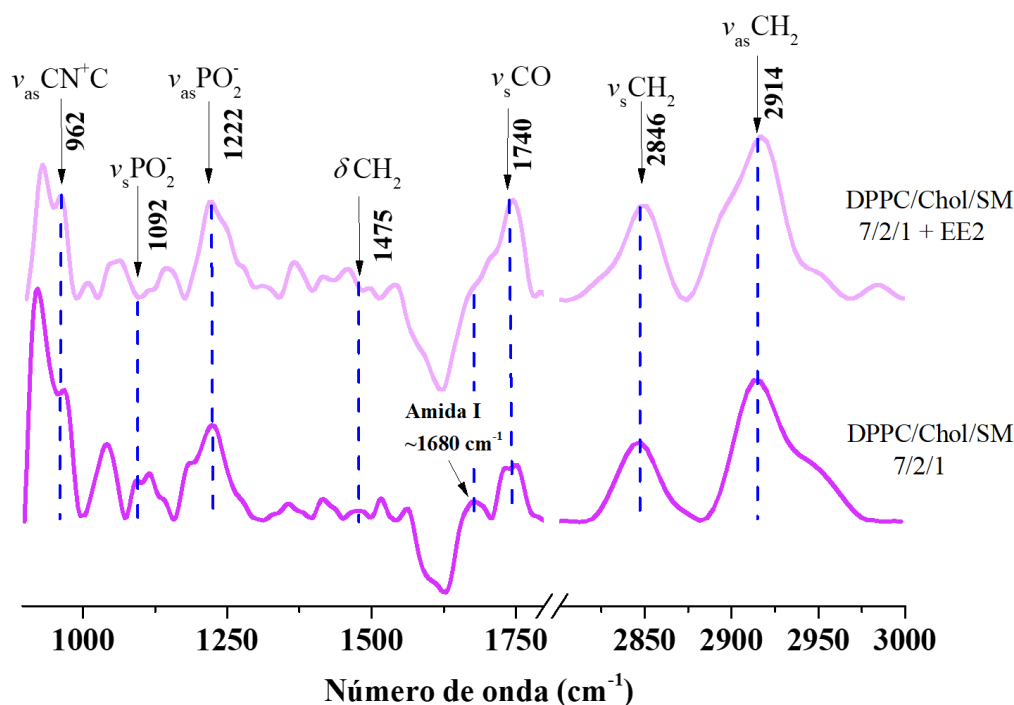


Figura 35: espectros de PM-IRRAS das monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} formadas pela mistura ternária DPPC/Chol/SM na proporção molar 7/2/1 em água ultrapura como subfase (linha vermelha) ou subfase contendo $10 \mu\text{M}$ de EE2 (linha roxa-claro). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Tabela 8: atribuições das principais bandas de vibração das monocamadas DPPC/Chol/SM, na proporção 7/2/1, juntamente com as mudanças induzidas pela interação com o EE2

Grupo	DPPC/Chol/SM (cm^{-1})	DPPC/Chol/SM+EE2 (cm^{-1})
$\nu_{as}(\text{CN}^+\text{N})$	962	968
$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	1092	1075
$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	1222	1240
$\delta(\text{CH}_2)$	1475	1457
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1740	1744
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2846	2848
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2914	2916

ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico; δ : deformação angular.

Na região interfacial da monocamada ternária (entre 900 e 1800 cm^{-1}), os principais grupos químicos presentes na região polar do DPPC e SM não foram afetados pela presença no EE2 na subfase, tais como o estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as}\text{CN}^+\text{C} = 962 \text{ cm}^{-1}$, ombro), o estiramento antissimétrico do grupo $\text{P}=\text{O}$ (1222 cm^{-1}) e a banda referente ao estiramento do grupo carbonila não hidratado ($\text{C}=\text{O}$ em 1740 cm^{-1}).

As alterações observadas em decorrência da presença do hormônio na subfase se deram para o estiramento simétrico do grupo P=O, que apresentou um deslocamento de 27 cm^{-1} para menores comprimento de onda (de $\nu_{\text{as}} = 1092\text{ cm}^{-1}$ para $\nu_{\text{as}} = 1075\text{ cm}^{-1}$) e também para a deformação angular do CH_2 (δCH_2) em 1475 cm^{-1} , deslocando para 1457 cm^{-1} . Além disso, a banda em 1680 cm^{-1} referente ao grupo amida presente somente na região polar da molécula de SM[161] não foi observada no espectro da mistura ternária formada na presença no EE2. É reportado que o deslocamento de banda do grupo P=O em para menores número de onda, como neste caso, é consequência do aumento da hidratação desse grupo[162], indicando que a presença do hormônio está deixando tal grupo menos exposto à interface ar-água.

Na região de 2800 a 3000 cm^{-1} dos espectros PM-IRRAS, as duas bandas principais centralizadas em 2846 e 2914 cm^{-1} para a monocamada de DPPC/Chol/SM são atribuídas aos modos de estiramento simétrico e antissimétrico, respectivamente, do grupo CH_2 , presentes nas cadeias alquílicas dos fosfolipídios[163]. É possível verificar que o EE2 não proporciona mudanças significativas em termos de deslocamentos de bandas nem em relação à intensidade relativa entre os estiramentos simétrico e antissimétrico $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), que aumentou levemente de $0,56$ (DPPC/Chol/SM) para $0,58$ (DPPC/Chol/SM + EE2). Isto significa que a presença do EE2 na subfase não induz alterações significativas na estruturação e organização das cadeias alquílicas na monocamada ternária.

A interação preferencial do EE2 com os grupos químicos hidratados ($\nu_{\text{as}}\text{P=O}$, δCH_2 e o grupo amida da SM) e a ausência de interação do hormônio na região das caudas dos fosfolipídios podem estar diminuindo o contato do colesterol com a água, aumentando a hidrofobicidade da molécula. Assim, na presença do EE2, com o aumento da pressão superficial causado pela compressão da monocamada, as moléculas de colesterol tendem a se organizarem e a se localizarem preferencialmente entre as cadeias apolares das

moléculas de DPPC e SM, não sendo mais inteiramente sentidas na interface, causando assim o deslocamento para menores áreas da isoterma π -A a partir de $\pi=15 \text{ mN.m}^{-1}$.

Na Figura 36 encontra-se uma ilustração mostrando as mudanças da organização da mistura ternária de DPPC/Chol/SM na presença do hormônio, gerando tanto as alterações citadas nos espectros PM-IRRAS como às evidenciadas nas isotermas π -A para essa mistura ternária. Além disso, em seguida é apresentado um resumo da ação do EE2 sobre as monocamadas formadas pela mistura ternária DPPC/Chol/SM (Figura 37).

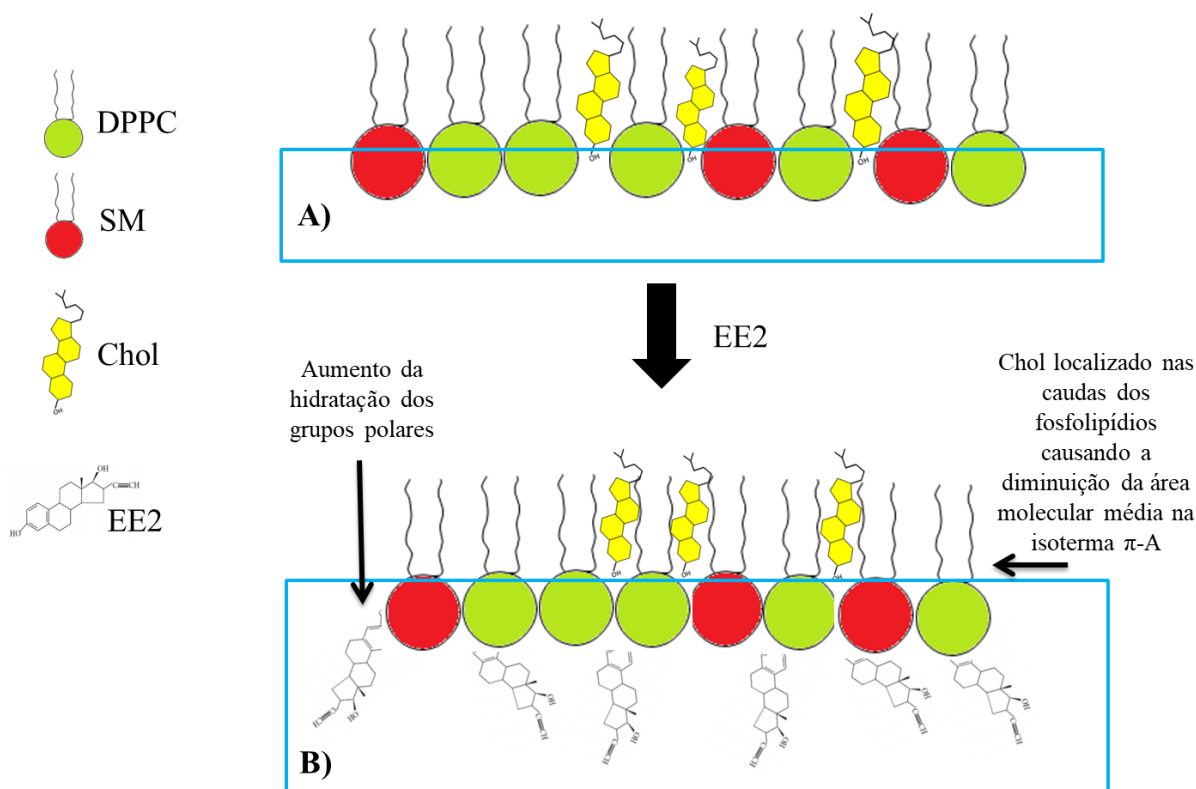


Figura 36: ilustração da organização da monocamada mista de DPPC/Chol/SM em (A) água ultrapura, (B) na presença de EE2 na subfase, mostrando a diferença na organização do colesterol na presença do EE2. O tamanho das moléculas e as áreas ocupadas na interface não estão em escala.

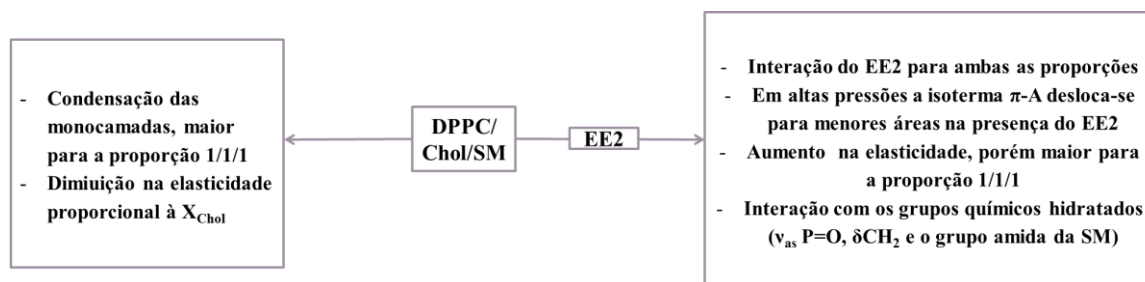


Figura 37: comparação dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas de DPPC/Chol/SM.

3.5 POPC

Isoterma π -A

Na Figura 38 são apresentadas as isotermas π -A das monocamadas de POPC obtidas na ausência e na presença no EE2 na subfase. O POPC forma uma monocamada sem pontos definidos de transição de fase, com área extrapolada média em $82 \text{ \AA}^2$ e pressão de colapso em 45 mN.m^{-1} , valor menor em comparação com o fosfolípido saturado (DPPC).

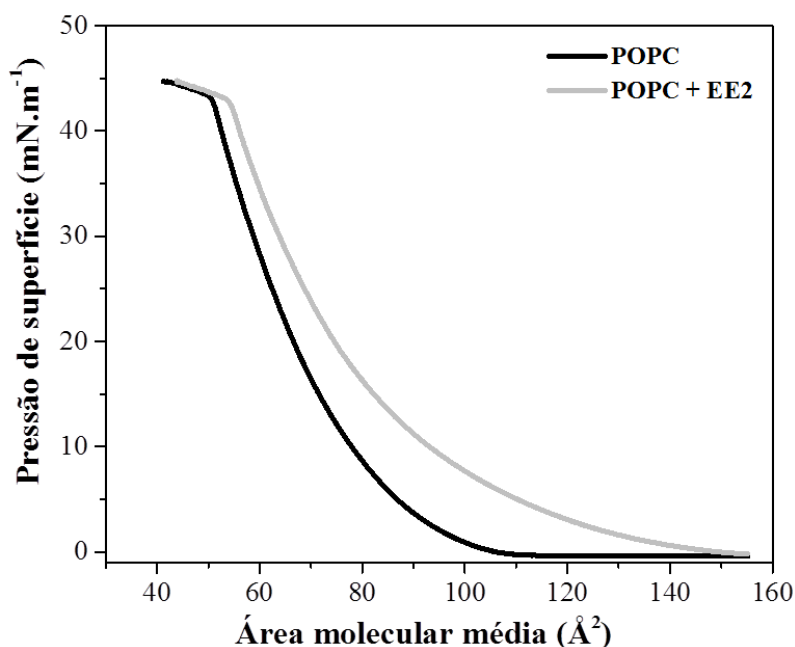


Figura 38: isotermas π -A obtidas a $23,0 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ para as monocamadas de POPC na subfase contendo água ultrapura ou EE2 $10 \text{ }\mu\text{M}$.

As alterações nas isotermas π -A de POPC em decorrência da presença do EE2 na subfase (expansão de $9 \text{ \AA}^2$ da área extrapolada) são observadas mesmo em altas pressões superficiais, indicando que o EE2 permanece na interface até o colapso da monocamada. Em relação aos lipídios puros utilizados nesse trabalho, o POPC é o composto que obteve a interação mais forte com o hormônio. Tanto o DPPC saturado quanto a SM apresentam o mesmo grupo fosfatidilcolina do POPC. Portanto, tais diferenças na interação são possíveis de se atribuir à insaturação presente na cadeia alifática do POPC. Pereira et

al.[164] também observaram a preferência da interação da molécula Eosina Y com fosfatidilcolinas insaturadas. Os autores relacionaram ao fato de que na temperatura ambiente (23° C), o POPC, com temperatura de transição de fase em $T_m = -2^\circ \text{C}$, se encontra na fase fluida, onde as cadeias são mais desordenadas e menos compactadas, facilitando a incorporação do composto na monocamada.

Compressibilidade

Os valores de C_s^{-1} para as monocamadas de POPC obtidas tanto em água ultrapura como em subfase contendo 10 μM do EE2 são mostrados na Figura 39. A dupla ligação presente em uma das cadeias de hidrocarbonetos do POPC impede o empacotamento eficiente das moléculas e, portanto, o valor máximo de compressibilidade chega somente a $C_s^{-1} = 105 \text{ mN.m}^{-1}$ e é atingido em $\pi \sim 40 \text{ mN.m}^{-1}$, próximo ao colapso da monocamada. Em pressões de superfície menores, como em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$, por exemplo, as monocamadas de POPC puro encontram-se na fase líquido-expandida, como observado pelos valores de $C_s^{-1} \leq 100 \text{ mN.m}^{-1}$. O fato das monocamadas do POPC serem menos empacotadas, menos rígidas e já estarem em uma fase fluida, a inserção do hormônio na interface é facilitada. Assim, a presença do EE2, apesar de deslocar a monocamada para maiores áreas, não causa grandes mudanças na compressibilidade (Figura 39-B).

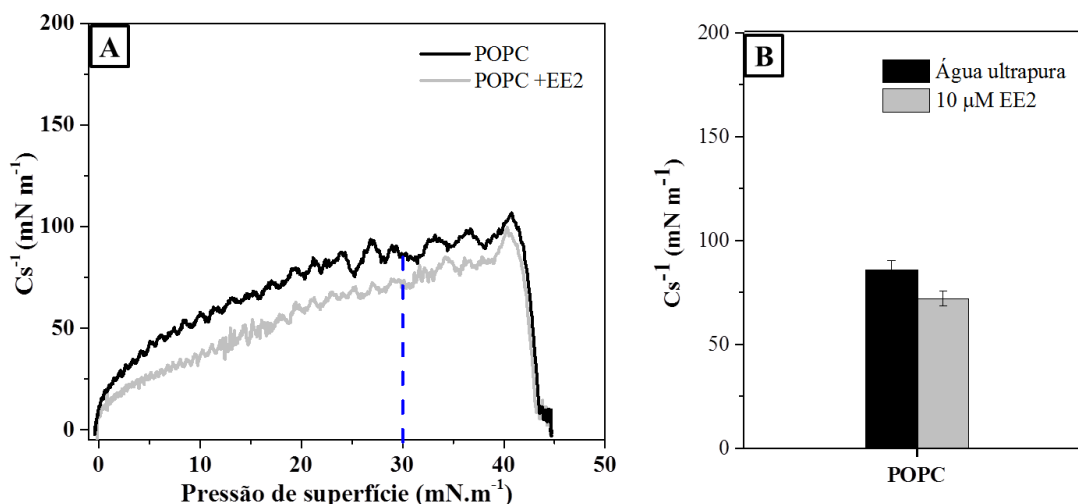


Figura 39: (A) curvas de Cs^{-1} em função da pressão de superfície para monocamadas de POPC obtidas das isotermas π -A na subfase contendo água ultrapura (linha preta) ou 10 μM de EE2 (linha cinza). (B) Gráfico de barras Cs^{-1} obtido das isotermas π -A de POPC em $\pi = 30 mN.m^{-1}$ na subfase contendo água ultrapura (preto) ou EE2 na concentração de 10 μM (cinza).

PM-IRRAS

Os efeitos do EE2 no espectro PM-IRRAS, obtidos em $\pi=30 mN.m^{-1}$, do POPC são mostrados na Figura 40. O estiramento antissimétrico do grupo colina $\nu_{as}(CN^+C)$ foi deslocado de 985 para 997 cm^{-1} após a interação com EE2. Além disso, a intensidade do sinal PM-IRRAS para essa banda diminuiu drasticamente, o que refletiu na mudança da intensidade relativa entre as bandas do estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as} CN^+C$) e o estiramento simétrico do grupo $P=O$ ($\nu_{as} CN^+C/\nu_s PO_2^-$), aumentando de 0,80 para 3,3 na presença no hormônio. A banda referente ao estiramento antissimétrico do grupo $P=O$ também deslocou de $\nu_{as} PO_2^- \sim 1226 cm^{-1}$ para 1207 cm^{-1} , que, como já discutido na seção das misturas ternárias, indica o aumento da hidratação desse grupo. As moléculas de DPPC e POPC apresentam os mesmos grupos na região polar da molécula, razão pela qual poderia se esperar para o POPC as mesmas interações íon-dipolo do EE2 com os grupos colina e fosfato do DPPC, o que se confirmou com as alterações descritas para tais grupos.

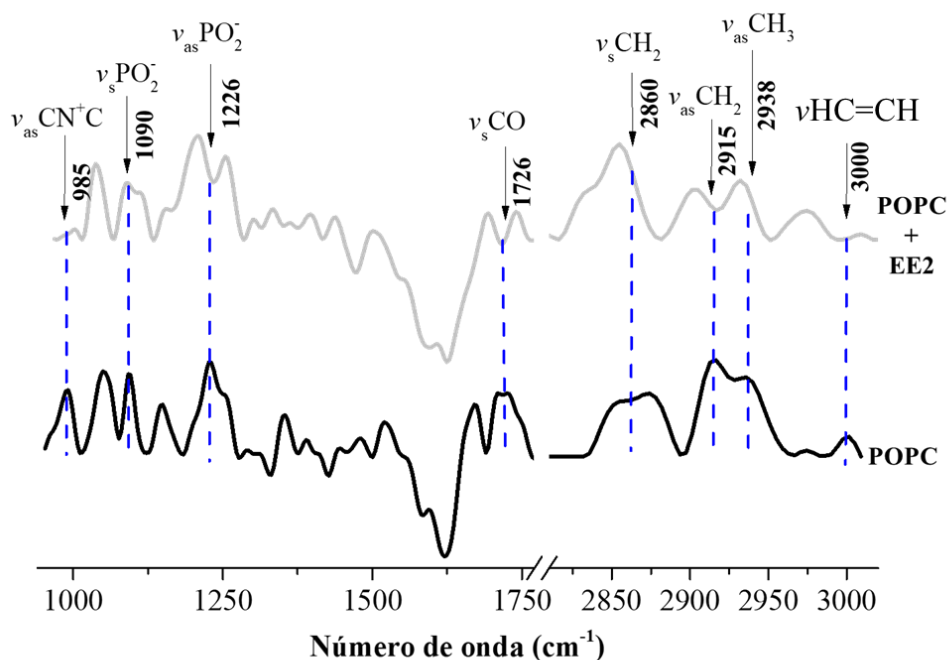


Figura 40: espectros de PM-IRRAS das monocamadas de Langmuir a 30 mN.m^{-1} formadas pelo POPC em água ultrapura como subfase (linha preta) ou subfase contendo $10 \text{ }\mu\text{M}$ de EE2 (linha cinza). ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico.

Tabela 9: atribuições das principais bandas de vibração da monocamada de POPC na ausência e na presença do EE2 na subfase

Grupo	POPC (cm^{-1})	POPC+EE2 (cm^{-1})
$\nu_{as}(\text{CN}^+\text{N})$	985	997
$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	1090	1089
$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	1226	1207
$\nu(\text{C=O})$	1726	1738
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2860	2853
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2915	2903
$\nu_s(\text{CH}_3)$	2938	2932
$\nu(\text{C=O})$	3000	3008

ν_s : estiramento simétrico; ν_{as} : estiramento antissimétrico.

A banda relativa ao estiramento do grupo carbonila $\nu(\text{C=O})$ do POPC está centrada em 1726 cm^{-1} . Como já discutido para o DPPC ($\nu\text{C=O} \sim 1740 \text{ cm}^{-1}$) e SM ($\nu\text{C=O} \sim 1756 \text{ cm}^{-1}$), a posição dessa banda depende da hidratação da região polar do lipídio, além da polaridade do meio. A localização dessa banda em menores números de onda quando comparados aos outros dois lipídios confirma a maior fluidez para a monocamada de

POPC[149]. Após a interação com EE2, houve um deslocamento para $\nu_{\text{C=O}} \sim 1740 \text{ cm}^{-1}$, o que pode estar relacionado às próprias alterações na solvatação do grupo carbonila[165].

Com a insaturação em uma das cadeias de hidrocarbonetos do POPC, a região do espectro de 2800 a 3000 cm^{-1} que, para os lipídios saturados só apareciam as vibrações do grupo $-\text{CH}_2$ (aqui $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2 \sim 2860 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2 \sim 2915 \text{ cm}^{-1}$); agora notam-se as bandas referentes ao estiramento antissimétrico $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$, em 2938 cm^{-1} e do estiramento do grupo $\nu_{\text{HC=CH}}$, em $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$. As modificações nesta região do espectro PM-IRRAS do POPC em decorrência do efeito do EE2 foram drásticas: i) os estiramentos simétrico $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ e antissimétrico $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ foram deslocados para menores números de onda, 2853 e 2903 cm^{-1} , respectivamente; (ii) o estiramento antissimétrico $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ diminuiu 7 cm^{-1} e $\nu_{\text{HC=CH}}$ foi deslocado de 3000 para 3008 cm^{-1} ; iii) houve uma inversão na intensidade do sinal PM-IRRAS das bandas de $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ e $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, o que causou a brusca mudança da relação ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) de 0,58 para 1,93, indicando a desorganização das cadeias do fosfolipídio.

Essas mudanças espectrais induzidas pelo EE2 fortalece a ideia de que o hormônio está localizado na região das caudas de hidrocarbonetos da monocamada de POPC, de modo a ter penetrado nas caudas ou ser levado para essa região no momento da formação do filme, durante o processo de compressão das barreiras. Além disso, tais resultados complementam a análise das isotermas π -A, as quais, na presença do hormônio, permanecem deslocadas para maiores áreas até o colapso da monocamada. Os principais efeitos do hormônio na monocamada de POPC estão esquematizados na Figura 41.

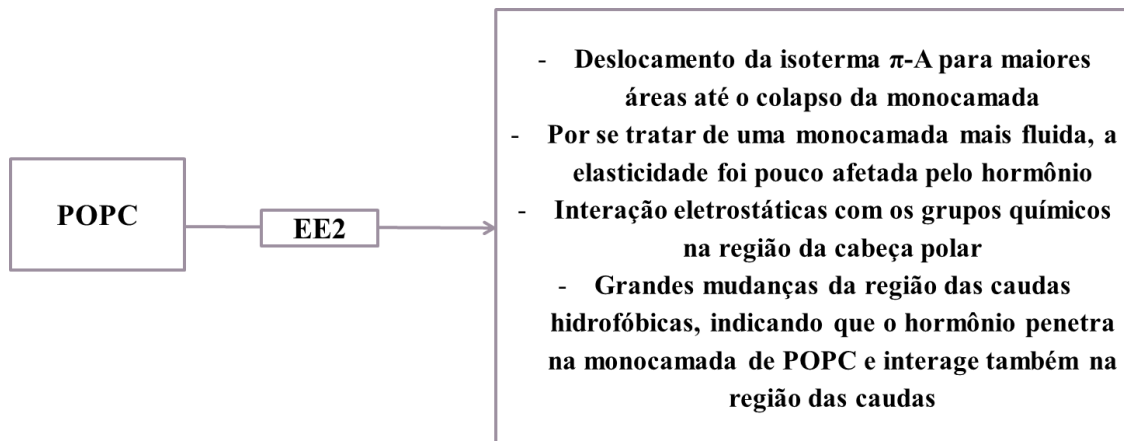


Figura 41: resumo dos efeitos do EE2 sobre as monocamadas de POPC.

Capítulo 4. Resultados: Vesículas Unilamelares Gigantes

4.1 DPPC/Colesterol

Para investigar os efeitos do EE2 em bicamadas lipídicas, foram obtidas GUVs compostas por DPPC e DPPC/Chol ($x_{\text{Chol}} = 0,3$) e, em seguida, as vesículas foram expostas em solução de hormônio de acordo com o método descrito nos procedimentos experimentais.

Tanto para DPPC quanto para DPPC/Chol, foram obtidas GUVs com conformação estável, ou seja, fase gel – L_β para DPPC[166] puro e fase ou líquido-ordenada (L_o) para mistura binária DPPC/Chol[167]. Não foram observadas perda de contraste de fase óptica das vesículas. De fato, $16 \pm 2\%$ das GUVs formadas por DPPC/Chol na ausência de hormônio perderam o contraste de fase. No entanto, este efeito começou a ser verificado apenas 50 minutos após a inserção das GUVs em solução de glicose.

A incorporação de $100 \mu\text{M}$ de EE2 em GUVs compostas por DPPC (Figura 42) parece induzir um estresse na curvatura da bicamada (Figura 42-B e C), promovendo alterações na conformação e forma das vesículas.

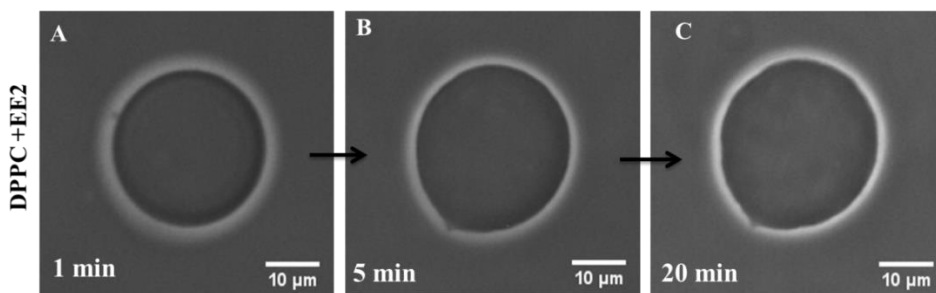


Figura 42: microscopias de contraste de fase obtidas para GUVs DPPC na presença de $100 \mu\text{M}$ EE2 após 1 (A), 5 (B) e 20 (C) minutos de exposição ao hormônio.

Esse único efeito começou ser observado em menos de 5 minutos, logo após a exposição das GUVs ao EE2, e em 30 minutos após a gravação, um total de $31,0 \pm 0,5\%$

das GUVs foram afetadas. Tal efeito pode estar relacionado à presença do hormônio, uma vez que a forma verificada difere da forma assimétrica observada na formação das vesículas na ausência do EE2 (Figura 43-A). De fato, este comportamento semelhante a gel (fase de gel - $L\beta$) é frequente nas GUV do DPPC, sendo atribuídas quando as vesículas são analisadas à temperatura ambiente[168]. As GUVs afetadas devido à presença do hormônio e suas diferenças com as de DPPC que estão na fase $L\beta'$ são mostradas na Figura 43-B e C.

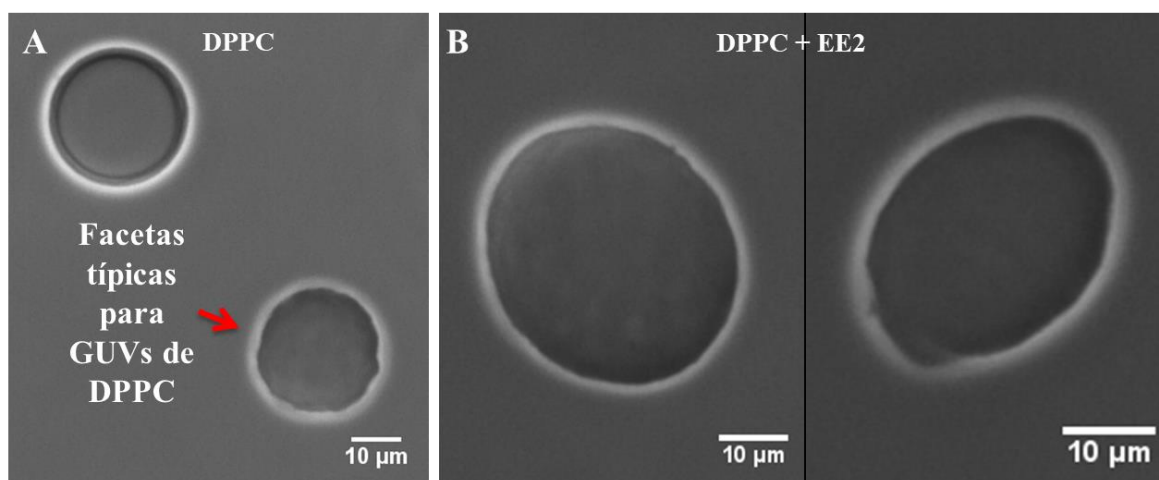


Figura 43: diferenças entre a forma da fase de gel- $L\beta'$ para GUVs de DPPC (A) e o formato adquirido na presença de EE2 (B).

Por outro lado, como mostrado na Figura 44, o efeito observado como resultado da exposição ao EE2 nas GUVs compostas por DPPC/Chol ($X_{\text{Chol}} = 0,3$) foi a perda de contraste de fase em $35,5 \pm 1,2\%$ das vesículas analisadas.

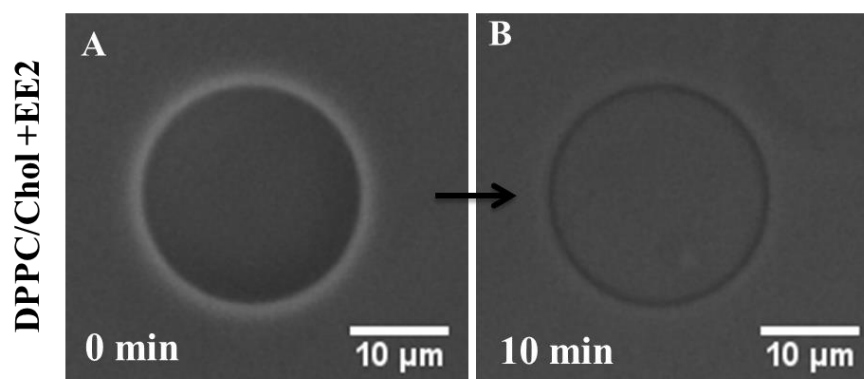


Figura 44: micrografias de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol, $X_{\text{Chol}}=0,3$; expostas ao EE2 e coletadas com 0 minutos (A) e depois de 10 minutos (B) de aquisição.

As vesículas permaneceram estáveis durante aproximadamente 10 minutos, quando começam a perder o contraste. Como mostrado para valores de A_{exc} de monocamadas de DPPC/Chol, especialmente na proporção específica de $x_{Chol}=0,3$; o EE2 foi responsável por enfraquecer as interações intermoleculares atrativas entre DPPC e Chol, quando comparado com a monocamada na ausência do hormônio. Aqui, o hormônio causou o aumento da permeabilidade nas GUVs[169] na mesma composição, o que permitiu a troca entre os conteúdos dos ambientes interno e externo das vesículas. É importante notar que, embora a perda de contraste de fase tenha sido verificada para esta mistura binária, a forma da bicamada não é alterada como no caso das GUV de DPPC, uma vez que a vesícula permanece na mesma forma circular até o final da análise (30 minutos).

4.2 DPPC/Esfingomielina

Foram obtidas as imagens de microscopia das vesículas lipídicas compostas por SM e DPPC/SM ($X_{SM}= 0,3$) em temperatura ambiente (23 °C). Além disso, as GUVs foram expostas em solução de EE2 para se verificar o efeito do hormônio.

Nas GUVs de SM observou-se a formação de estruturas desuniformes, atribuídas à fase gel, semelhantes ao observado para as vesículas de DPPC. Contudo, enquanto que para o DPPC essas estruturas ocorreram para $25,0 \pm 0,4$ % das vesículas analisadas, nas de SM a porcentagem foi de $35 \pm 1,4\%$ das GUVs.

Para as GUVs de SM na presença do EE2 (Figura 45) não se verificaram alterações quanto à forma bem como à perda de contraste durante o intervalo medido de 30 minutos, o que indica que o EE2 não afeta estruturalmente as vesículas do esfingolípido.

Embora nos filmes de Langmuir, com o EE2 na subfase, o deslocamento tenha se dado para as monocamadas em todos os estágios de compressão, os valores de Cs^{-1}

(compressibilidade) não foram consideravelmente alterados e o espectro de PM-IRRAS deslocou apenas na banda referente ao grupo carbonila não-hidratado da cabeça do fosfolípido. Com isso, é importante ressaltar duas considerações: i) no PM-IRRAS os grupos químicos mais periféricos da cabeça da SM, como a colina (CN^+C) e fosfato ($\text{P}=\text{O}$), não interagiram com o EE2; ii) as GUVs de SM que são expostas ao EE2 são analisadas em sua fase gel ($\text{P}\beta$), pois em temperatura ambiente (23°C) se encontram abaixo de temperatura de transição de fase, que, no caso da SM, é de 40°C [121]. Assim, a ausência de interação do EE2 em GUVs de SM pode estar relacionada ao fato da SM não permitir que o EE2 penetre na vesícula, seja pelo fato da vesícula estar em sua fase rígida (gel) e/ou devido aos grupos mais expostos ao meio externo da bicamada lipídica (colina e fosfato) não possuir afinidade com o hormônio.

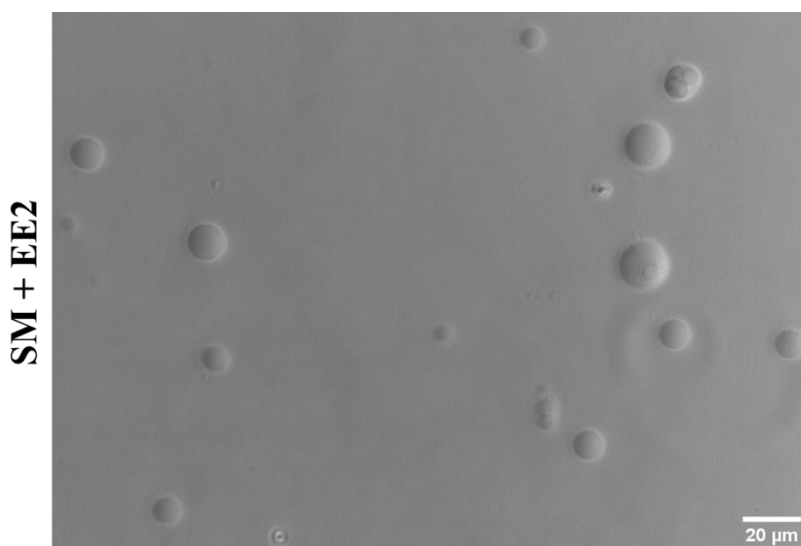


Figura 45: imagens de contraste de fase de GUVs de SM que mostram as vesículas intactas mesmo após 30 minutos da adição do EE2.

Na Figura 46 são apresentadas as GUVs de DPPC/SM ($X_{\text{SM}} = 0,3$) obtidas por fluorescência, na ausência do hormônio. As vesículas apresentaram, em média, diâmetros entre 15 e 30 μm . Além disso, foi possível observar a presença de uma fase não-fluorescente na maioria das GUVs analisadas, indicando a separação de fases dos componentes da vesícula mista [170]. Geralmente, as separações de fase nas bicamadas lipídicas das GUVs são observadas em estudos que utilizam lipídios com grandes

diferenças na temperatura de transição de fase[171], como por exemplo o DOPC insaturado ($T = -13^{\circ}\text{C}$) formando misturas binárias ou ternárias com DPPC, SM e colesterol[172,173]. Assim, as vesículas de DOPC estão na fase fluida à temperatura ambiente, enquanto que as de DPPC ou SM estão na fase gel.

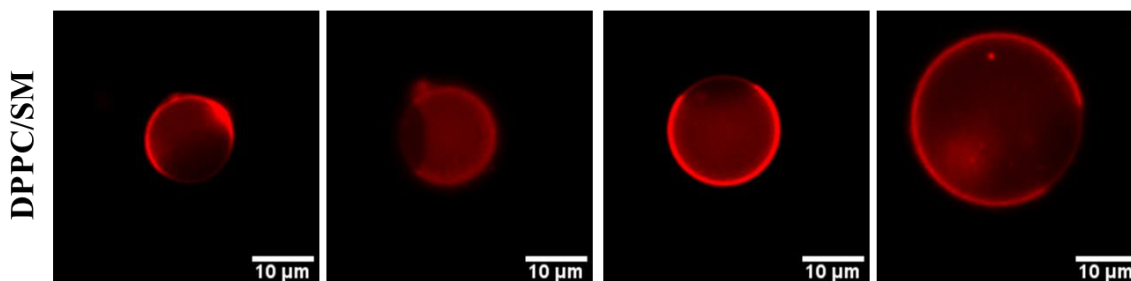


Figura 46: imagens de microscopia de fluorescência de GUVs, com diferentes tamanhos, da mistura binária DPPC/SM, contendo $X_{SM}=0,3$; coletadas ao longo de 30 minutos, na ausência do EE2.

Na literatura não há trabalhos sobre a formação de vesículas binárias compostas por DPPC e SM. O que pode ser considerado nesse caso é que os valores de área de excesso obtidos das isothermas π -A indicam a não idealidade da mistura de DPPC/SM, sendo verificado nas GUVs, a imiscibilidade de fases para a composição de DPPC/SM, $x_{SM}=0,3$. Além disso, diferentes fases na bicamada podem ser diretamente visualizadas com a utilização de marcadores que possuem afinidade preferencialmente a uma dessas fases da membrana, deixando assim a outra fase escura pela ausência da molécula fluorescente. O marcador utilizado foi a rodamina-DOPE, que se liga preferencialmente à fase líquido-desordenada (L_d) dos lipídios[174,175], mais fluida. As moléculas de DPPC, em temperatura ambiente, não formam uma fase líquido-desordenada na bicamada, mas de certa forma possuem maior grau de liberdade que as moléculas de SM pelo fato de não fazer ligações intermoleculares tão fortes como a SM, uma vez que o DPPC não possui grupos doadores de ligação de hidrogênio em sua molécula[170]. Assim, presume-se que a fase que se apresenta escura nas GUVs seja uma fase gel mais rígida que a fase gel do DPPC, formada pelo esfingolipídio SM.

As fases não-fluorescentes não se alteram na presença do EE2 nessa composição binária dos fosfolipídios. Todavia, como mostrado na Figura 47, o efeito observado para tal mistura binária na presença do hormônio foi a perda de contraste de fase em grande parte das GUVs analisadas, cerca de $54\% \pm 1,2$.

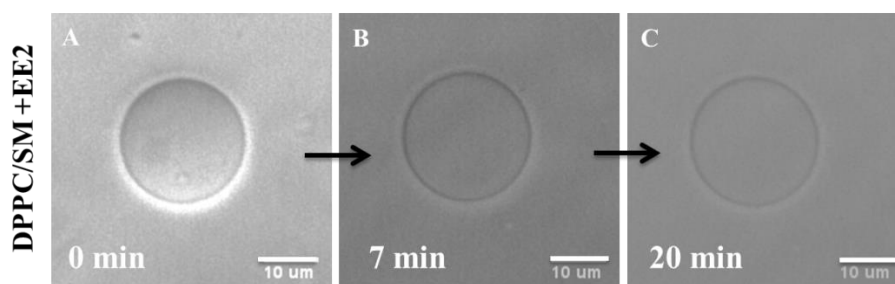


Figura 47: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/SM, $X_{SM}=0,3$; expostas ao EE2 e coletadas com 0 minutos (A), 7 minutos (B) e depois de 20 (C) minutos de aquisição.

As vesículas começaram a perder o contraste no tempo de aproximadamente 7 minutos, indicando o aumento da permeabilidade nas vesículas. De fato, os valores de elasticidade (Cs^{-1}) na presença do EE2, nas monocamadas de DPPC/SM, especialmente na proporção específica de $x_{SM}=0,3$; diminuíram, e essa diminuição da rigidez nas monocamadas foi verificada em termos da perda de contraste de fase nas bicamadas. Além disso, como foi observado a separação das fases gel das GUVs de DPPC/SM, as vesículas já estariam mais permeáveis, favorecendo a perda do contraste de fase na presença do hormônio.

4.3 Esfingomielina/Colesterol

As GUVs de SM/Chol, $x_{Chol}=0,3$; foram acompanhadas no decorrer de 30 minutos, contendo ou não o EE2 na análise. Na ausência do hormônio, as GUVs da mistura mantiveram o formato tradicional esférico (Figura 48).

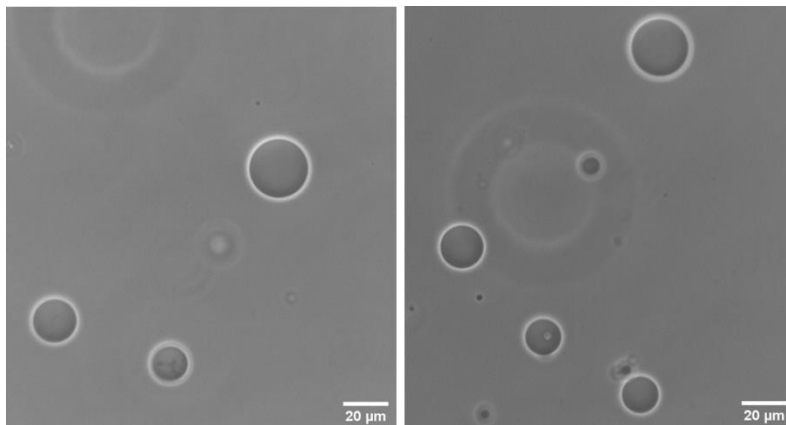


Figura 48: imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs da mistura binária SM/Chol contendo $x_{\text{Chol}}=0,3$; coletadas ao longo de 30 minutos, na ausência do EE2.

Com a adição do EE2, dois diferentes efeitos foram observados ao longo do tempo:

i) um efeito instantâneo (cerca de um minuto), relacionado às mudanças morfológicas na curvatura espontânea das GUVs, gerando a perda do formato esférico das vesículas e ii) o outro efeito, verificado em aproximadamente 7 minutos, foi a perda de contraste de fase nas vesículas. Como o efeito das mudanças morfológicas ocorreram rapidamente, não foi possível acompanhar uma única vesícula sofrendo tal alteração. A Figura 49 mostra a imagem de contraste de fase das vesículas em formato disforme (setas azuis), 10 minutos após a adição do hormônio. No total de 30 minutos de aquisição, 41,1% das GUVs analisadas perderam seu formato esférico. Tal efeito, também identificado por Yanagisawa *et al.*[176] foi chamado de “formato pera” (do inglês *pear shape*). Nesse estudo, as mudanças na curvatura das GUVs foram propositalmente induzidas pela adição do sal sorbitol e atribuídas às diferenças na pressão osmótica do sistema. No caso desse trabalho de tese, a osmolaridade foi ajustada, sem que ocorra diferenças na pressão osmótica do sistema. Ainda na Figura 49 notam-se algumas vesículas sem contraste de fase (setas vermelhas), porém mantidas no formato esférico, que, ao final da análise, somaram-se $19,2 \pm 1,3\%$ do total das GUVs. As mudanças de conformação somando-se ao efeito de perda de contraste de fase (trocas de conteúdo dos meios interno e externo

das vesículas) indicam um aumento de área das vesículas, sugerindo que o EE2 se incorpora no sistema SM/Chol.

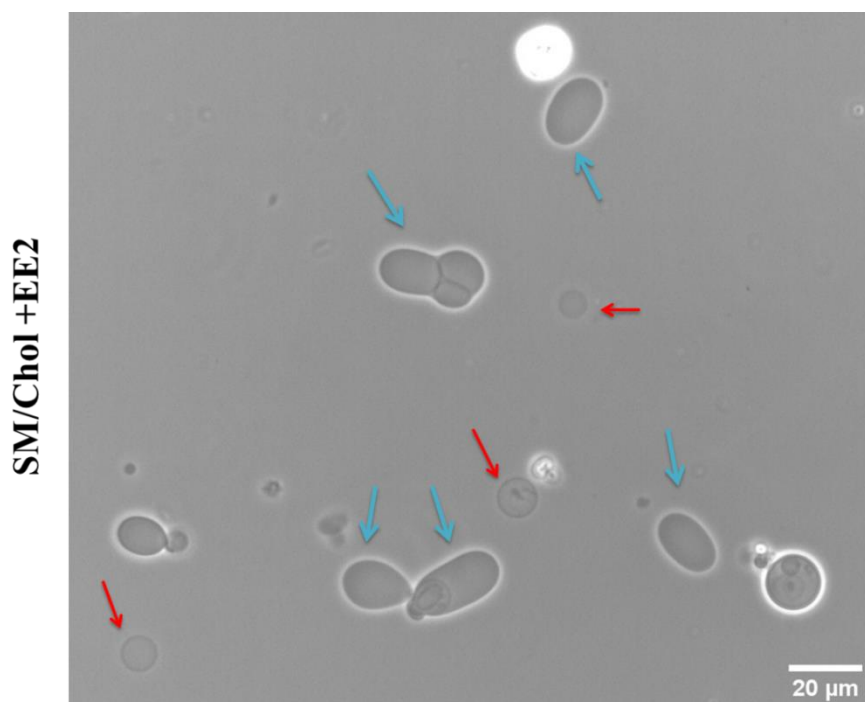


Figura 49: imagem de microscopia de contraste de fase das GUVs da mistura binária SM/Chol, contendo $X_{\text{Chol}}=0,3$; coletadas 10 minutos após a adição do EE2. As setas azuis indicam o formato não esférico adquirido pelas vesículas e as setas vermelhas mostram a perda de contraste de fase.

4.4 DPPC/colesterol/esfingomiélin

A Figura 50 apresenta as imagens de microscopia das vesículas lipídicas compostas pela mistura ternária de DPPC/Chol/SM na proporção molar 7/2/1, na ausência e presença do EE2, obtidas a 55° C e analisadas em temperatura ambiente (23° C). Para essa composição, as vesículas analisadas em triplicata obtiveram um menor tamanho em relação à composição molar 1/1/1 (Figuras 51 a 53), apresentando um tamanho médio de 12 μm, com o valor máximo de 20 μm de tamanho. As vesículas se mantiveram estáveis e com um formato esférico durante o tempo de 30 minutos de análise (Figura 50-A). A separação de fases observadas para as GUVs de DPPC/SM, $X_{\text{SM}}=0,3$, não ocorreu para o sistema ternário (Figura 50-B), provavelmente pelo fato do Chol estabelecer interações atrativas com as moléculas de DPPC e SM, diminuindo a repulsão entre os dois

componentes. Além disso, os valores das temperaturas de transições de fase dos componentes puros (DPPC e SM) e de vesículas binárias contendo colesterol são muito próximos[177], garantindo a homogeneidade do sistema. Com a incorporação do EE2 ao meio contendo as GUVs já formadas, não foram detectadas mudanças morfológicas tão pouco de contraste de fase ao longo de quase 40 minutos de análise (Figura 50-C).

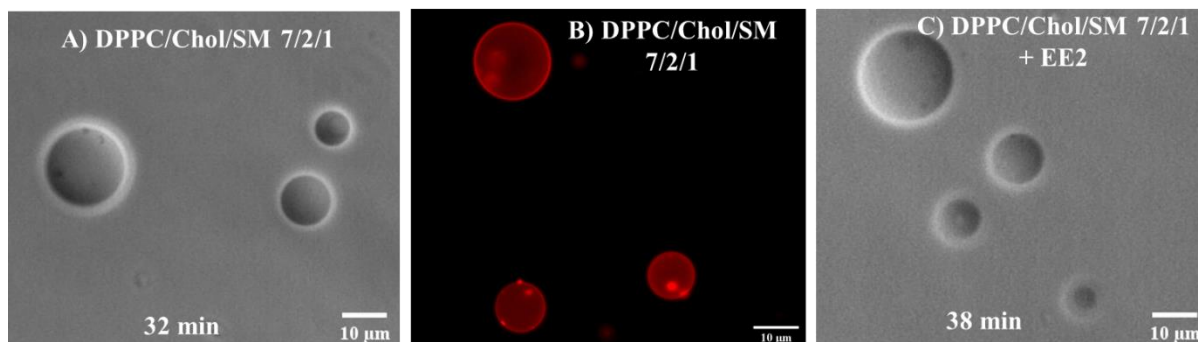


Figura 50: (A) imagens de contraste de fase e (B) de fluorescência com o marcador rodanina-B, (0,5% em mol) de GUVs de DPPC/Chol/SM, 7/2/1, analisadas na ausência do EE2; (C) imagens de contraste de fase das GUVs de DPPC/Chol/SM, 7/2/1 após a adição de 10 µM de EE2 ao meio contendo as GUVs.

Por outro lado, o EE2 causou grandes efeitos nas vesículas formadas pela mistura ternária DPPC/Chol/SM na proporção 1/1/1, ocorrendo até a ruptura das GUVs, como mostrado nas Figuras 51 a 53. O primeiro mecanismo de ruptura das GUVs está apresentado nas Figura 51 e Figura 52 e foi observado ao final dos primeiros 5 min de exposição ao EE2. Esse processo se deu de forma mais lenta, com a formação de uma abertura na membrana (indicada pela seta) e duração de até um minuto, que foi seguida por um vazamento do conteúdo interno da vesícula, resultando na perda do formato esférico e do contraste de fase. Ao final do processo, a GUV se fragmenta, liberando conjuntos lipídicos amorfos presentes inicialmente no interior das vesículas (Figura 51 (F–J) e Figura 52(F)).

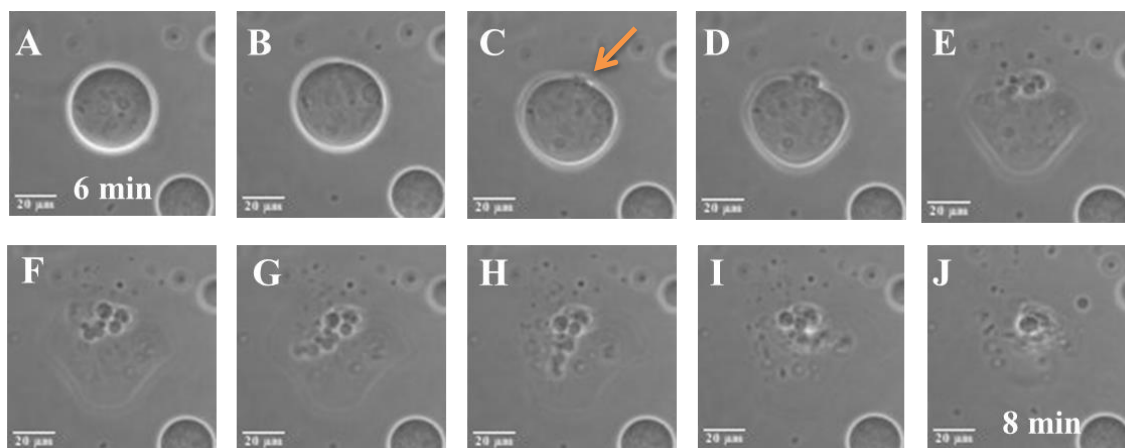


Figura 51: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas no momento do rompimento da GUV, após 6 min de aquisição em uma temperatura de 23° C. As setas indicam a formação de uma abertura na membrana, antes do rompimento total.

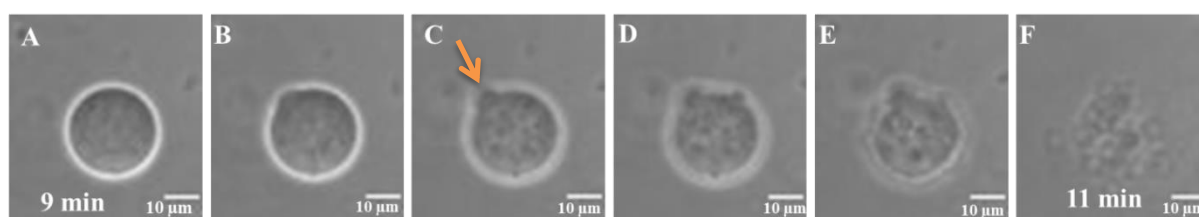


Figura 52: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas no momento do rompimento da GUV, após 8 min de aquisição em uma temperatura de 23° C. As setas indicam a formação de uma abertura na membrana, antes do rompimento total.

Já na Figura 53 é apresentada uma ruptura mais rápida e brusca “explosão” da vesícula, sem a formação de poros evidentes. Durante a “explosão”, a membrana se abre repentinamente e a vesícula, que era intacta, desaparece, deixando quase nenhum traço lipídico visível. A primeira micrografia foi obtida com 11 minutos passados da exposição ao hormônio, ocorrendo a ruptura da vesícula 15 segundos após (Figura 53-C).

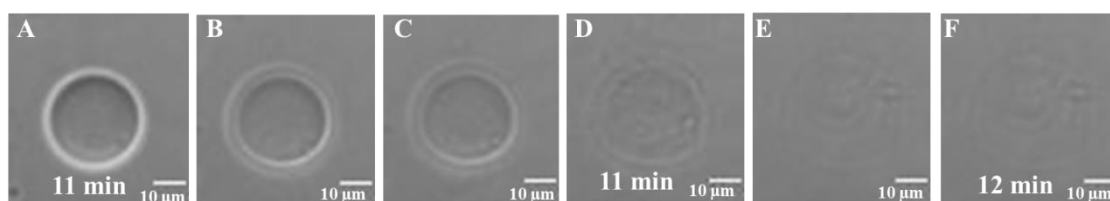


Figura 53: imagens de contraste de fase de GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas no momento da “explosão” da GUV, após 11 min de aquisição em uma temperatura de 23° C.

Ao final da análise, em um tempo de 35 minutos, um total de $67 \pm 2\%$ das GUVs que não sofreram rupturas perderam contraste de fase. Uma comparação com as vesículas analisadas com e sem o EE2 (Figura 54) mostra as GUVs intactas na ausência do hormônio, mesmo após mais de 1 hora de análise no microscópio (figura-A). Em contrapartida, com a adição do EE2 e após a verificação dos rompimentos nas vesículas, 30 min foram suficientes para não se observar mais as rupturas e se conferir a perda de contraste. Pazin et al.[42] descreveram o mesmo mecanismo da ruptura “mais lenta” de GUVs de DPPC em virtude da presença da molécula Artepilin C, nas quais as GUVs sofreram um estresse inicial na curvatura, seguido do rompimento, semelhante aos das Figura 51 e Figura 52. Apesar de usarem vesículas formadas por um único fosfolípido (DPPC), as GUVs se encontram em fases também ordenadas, como a da mistura ternária DPPC/Chol/SM 1/1/1. No trabalho de Kristanc et al.[169], os autores estudaram os efeitos do antibiótico niastina em GUVs de POPC contendo 15, 30 e 45% de ergosterol e colesterol na mistura. As medidas confirmaram que as rupturas das vesículas com niastina (inclusive as “explosões” como na Figura 53) foram detectadas em vesículas que possuíam entre 30 e 45% dos esteróis na mistura, revelando a preferência de interação do antibiótico em vesículas com maiores quantidades desses componentes na mistura.

Tanto as vesículas de DPPC/Chol/SM nas proporções 1/1/1 e 7/2/1 estão na mesma fase líquido ordenada, são homogêneas e não ocorre separação de fase entre os componentes da mistura. Assim, o fato de ocorrer proeminentes efeitos do EE2 nas vesículas formadas na proporção 1/1/1 e não na proporção 7/2/1, pode estar relacionado à composição química, uma vez que as GUV de DPPC/SM/Chol (1/1/1) possuem maiores proporções de Chol e SM, o que pode facilitar a interação com o hormônio.

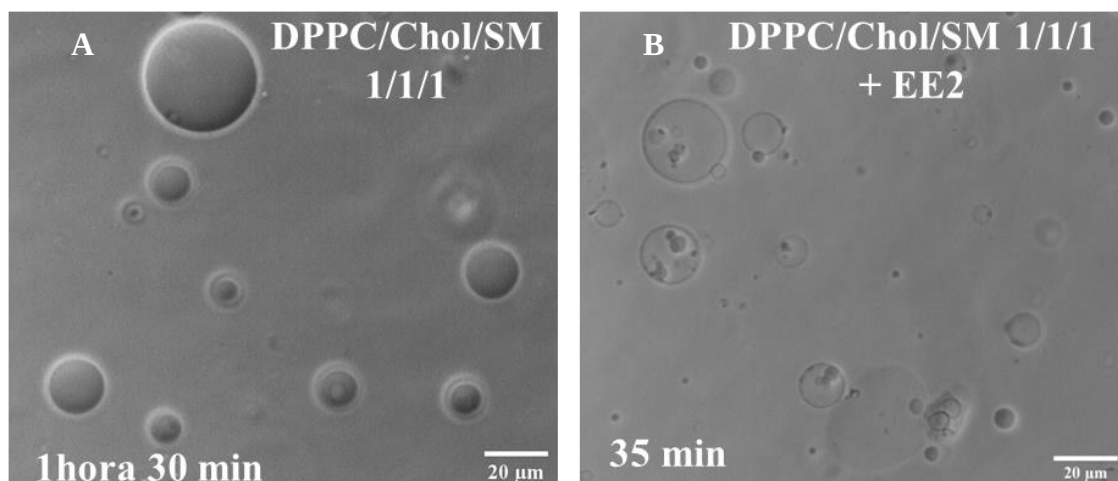


Figura 54: (A) imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC/Chol/SM, 1/1/1, coletadas na ausência do EE2 após 1 hora e 30 min e (B) 35 minutos após a adição do EE2.

4.5 POPC

As GUVs de POPC são esféricas, com um tamanho médio de 40 μm e, quando analisadas nas condições experimentais citadas, não foram percebidas flutuações nem na forma nem no agrupamento das vesículas no sistema (Figura 55).

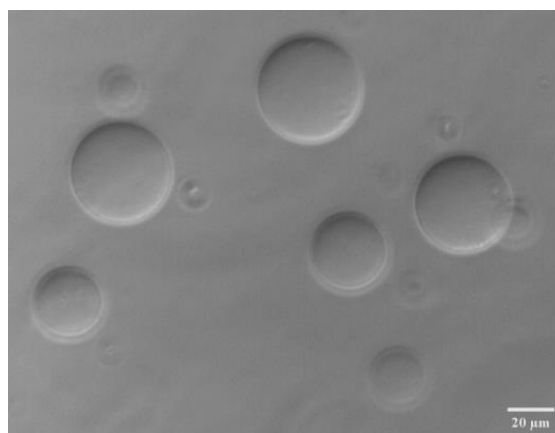


Figura 55: (A) imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de POPC coletadas na ausência do EE2 após 30 min de análise.

As alterações das vesículas formadas com POPC foram percebidas quando expostas ao EE2 (10 μM) e são mostradas nas Figura 56.

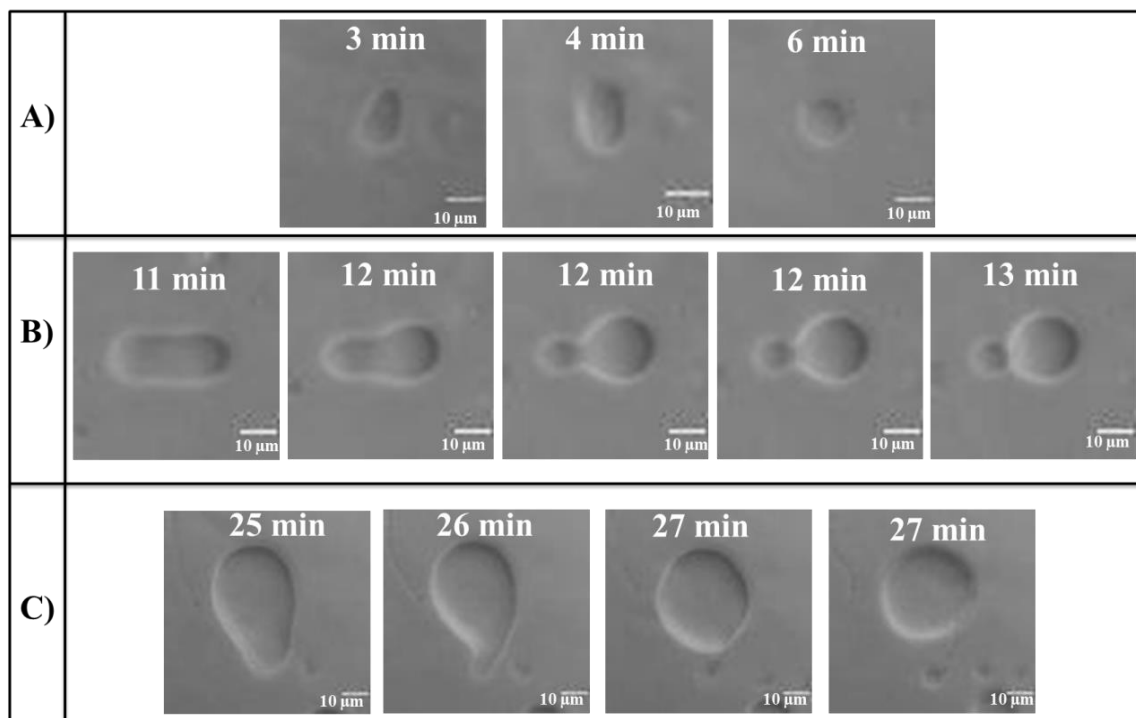


Figura 56: diferentes efeitos em GUVs de POPC expostas ao EE2 (10 µM): (A) formato pera e esférico, (B) criação de *buds* e (C) formação de protrusões tubulares. O tempo de análise é mostrado na parte superior de cada imagem capturada.

Nos primeiros momentos de aquisição dos vídeos, é possível a observação de vesículas no formato pera (Figura 56-A) que, durante cerca dois minutos, retornam a um formato esférico tradicional. Algum tempo depois (em ~10 minutos) em outra região de análise, outras GUVs de formato pera mais alongados se tornam visíveis (Figura 56-B). As vesículas nesse estágio sofreram o que os autores chamam de *budding transition*[80,178], que trata-se do processo de afunilamento da estrutura alongada inicial e a formação de um *bud* (traduzido embrião ou filho), uma vesícula esférica menor, conectada a outra vesícula esférica de maior tamanho (vesícula-mãe). Um outro perfil de mudanças nas GUV está indicado na Figura 56-C, no qual, ao invés de um vesícula menor, são formados cordões lipídicos (também chamados de protrusões tubulares[178]) ligados à superfície da vesícula em uma extremidade. Os três tipos diferentes de transformações citados foram completados em um tempo de aproximadamente 2 minutos cada. A Figura 57 revela uma imagem capturada de tais mudanças ocorrendo de forma simultânea. É possível verificar pela seta verde a mudança das GUVs do formato pera

para o formato esférico; a seta laranja indica a formação dos *buds* e a seta azul a criação de uma protrusão lipídica ligada às vesículas.

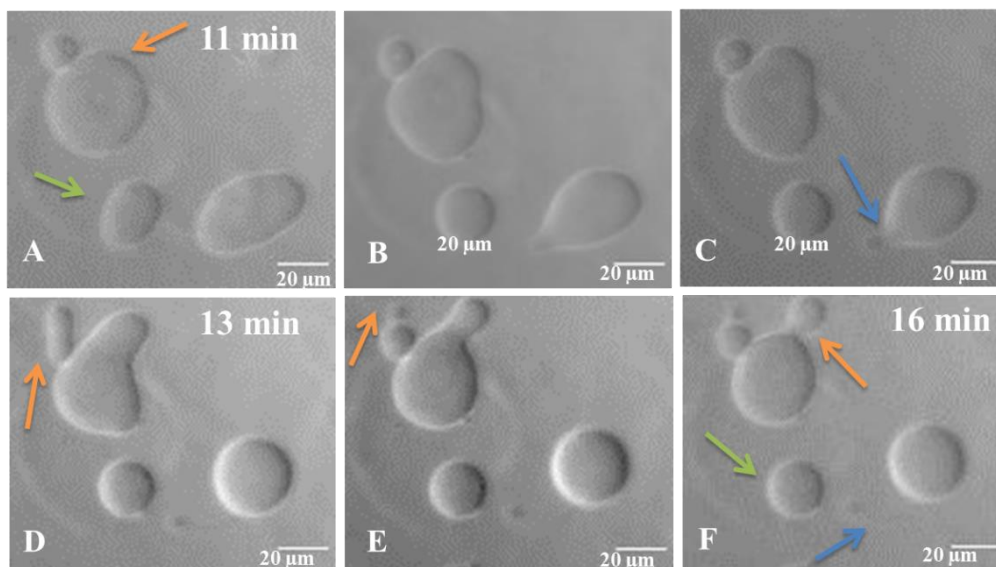


Figura 57: ocorrência simultânea dos efeitos do EE2 (10 μM) causados em GUVs de POPC. A seta verde indica a mudança das GUVs do formato pera para o formato esférico; a seta laranja indica a formação dos *buds* (GUVs “filhas”) e a seta azul a criação da protrusão lipídica. O tempo de análise é mostrado na parte superior de cada imagem capturada.

As alterações morfológicas aqui identificadas são, de um modo geral, típicas para as GUVs de POPC, podendo ser induzidas de diversas maneiras, tais como, aplicação de campo elétrico[179,180], adição de surfactante não-iônico[178], polímeros[181] e ácidos graxos[182], e adição de fotossensibilizadores induzindo o estresse oxidativo nas membranas[183].

Riske et al.[183] citam o modelo de elasticidade por diferença de área[184] para explicar as alterações nas GUVs de POPC, no qual a forma de uma vesícula depende basicamente da relação área/volume e da curvatura preferencial da membrana, dada pela área diferencial efetiva entre as duas monocamadas que formam a vesícula. Assim, a um volume constante, qualquer aumento na área da membrana modifica essa relação área/volume, provocando a deformação da vesícula.

Estas constatações podem ser utilizadas no caso desse trabalho: como o contraste de fase das GUVs de POPC expostas ao EE2 foi mantido, assim como as condições

osmóticas permaneceram inalteradas (mesma osmolaridade das soluções de sacarose e glicose/EE2), pode-se assumir que o volume da GUV também permaneceu constante[182]. Assim, como verificado qualitativamente, na presença do hormônio, a membrana do POPC ganhou um excesso de área e adquiriu um formato elipsoide. Esse aumento de área promoveu a formação de um única vesícula adjacente (os *buds*, Figura 56-B) ou a formação das protrusões (Figura 56-C), de modo a minimizar o excesso de área causado e diminuir a energia elástica de curvatura da bicamada lipídica.

Após 40 minutos de análise das GUVs na presença do EE2, observou-se a estabilização em relação ao surgimento dos *buds* e das protrusões lipídicas. Contudo, foi verificada a formação de novas estruturas, de modo que muitas vesículas esféricas pequenas surgiram a partir de vesículas maiores, formando uma espécie de cordão (Figura 58-A).

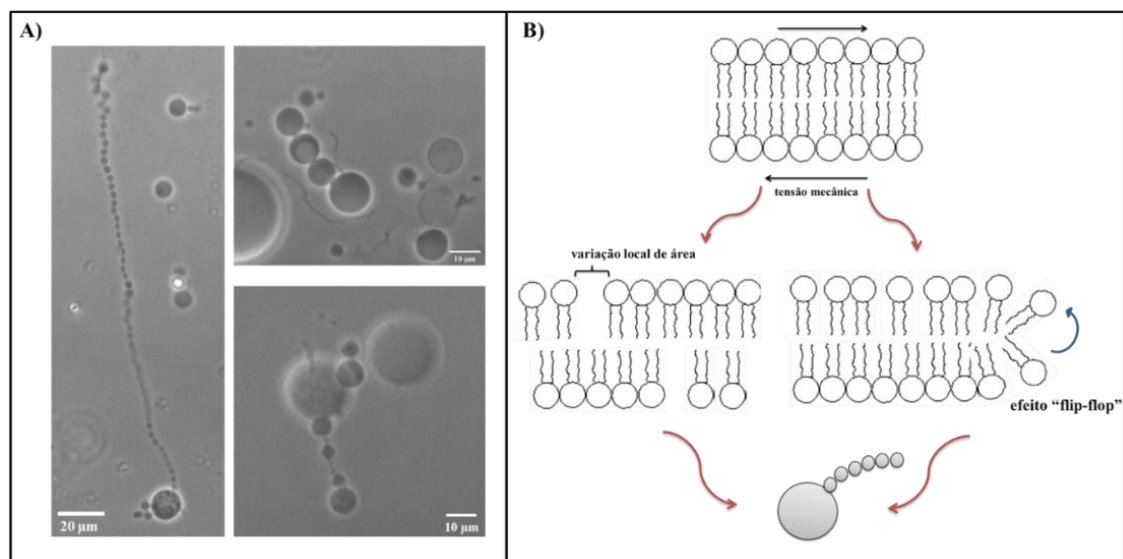


Figura 58: (A) imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de POPC coletadas 40 minutos após a adição do EE2. (B) Representação esquemática do mecanismo de formação do cordão de vesículas como resultado da exposição das GUVs de POPC ao EE2 (10 µM).

Com relação à formação dos cordões de vesículas a partir de uma vesícula-mãe, Raphael e Waugh[77] descreveram dois mecanismos para explicar tais efeitos, ligados à diferença de tensão de cisalhamento (estresse) causada nos dois folhetos (ou

monocamadas), interno e externo, da bicamada. O primeiro mecanismo seria propagação de lacunas sobre a superfície da vesícula pelo movimento lateral da monocamada externa localmente expandida em relação à monocamada interna, localmente comprimida. O segundo é a permeação de lipídios de uma monocamada para outra, chamado de efeito, "flip-flop", causado também pelas diferenças de tensão da monocamada interna comprimida para a externa expandida. Essas diferenças de tensão gerariam uma desigualdade na área por molécula das monocamadas adjacentes no local onde o cordão é formado, de modo que a minimização dessa diferença ocasionaria tais alterações morfológicas e a formação dessas estruturas. Esses dois mecanismos estão ilustrados na Figura 58-B. De fato, a forte interação do EE2 com as caudas do POPC (verificado nos espectros de PM-IRRAS, Figura 40) poderia causar tais perturbações mecânicas nas bicamadas. Dentre as GUVs de POPC contadas, 25% das vesículas não sofreram mudanças quando expostas ao hormônio, ao passo que 63% apresentaram *buds*, protrusões tubulares e cordões de vesículas e 12%, ao final da análise, permaneceram no formato pera. Os principais efeitos do hormônio nas GUVs estudadas estão esquematizados na Figura 59.

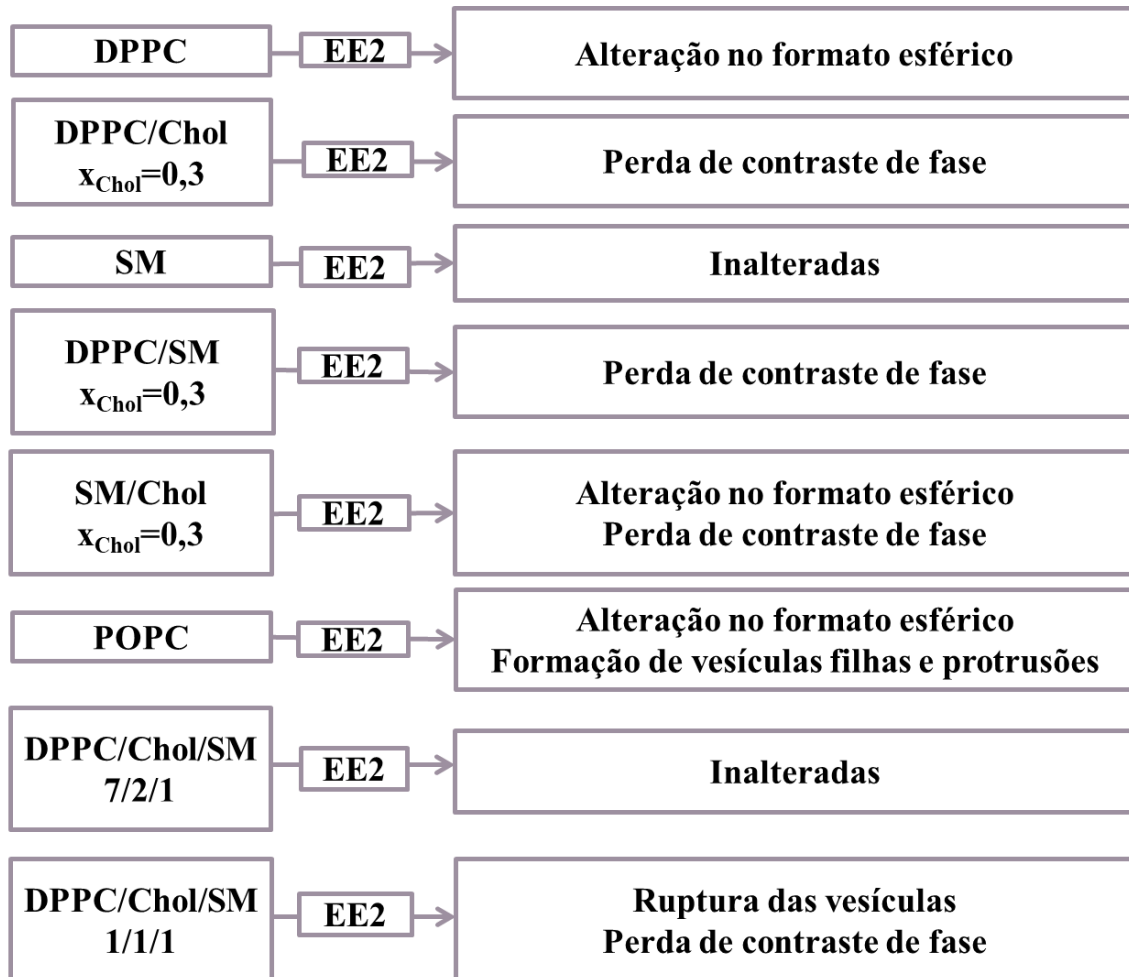


Figura 59: resumo dos efeitos do EE2 sobre as bicamadas lipídicas.

Capítulo 5. Conclusões

5.1 Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir mostraram que o EE2 interage na interface líquido/ar com as monocamadas puras dos lipídios –POPC, DPPC, Chol e SM– e também com as monocamadas mistas em diferentes proporções molares (DPPC/Chol, DPPC/SM e SM/Chol). O maior efeito nas monocamadas formadas pelos componentes individuais se deu para a SM, visto que o hormônio se manteve na interface e a isoterma permaneceu deslocada para maiores áreas em todos os estágios de pressão de superfície. Para o DPPC e Chol a interação se deu principalmente na fase líquido-expandida da monocamada, e, na pressão de 30 mN.m⁻¹, o EE2 foi expelido da interface, como verificado pela sobreposição das curvas obtidas na ausência e na presença do hormônio nessa pressão.

Nas monocamadas compostas pelas misturas binárias, em altas pressões de superfície, o EE2 também foi expelido da interface ar/água, com exceção da fração molar de Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ para DPPC/Chol e SM/Chol. No caso na mistura binária DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$; esse maior efeito causado pelo EE2 ocorreu na monocamada mista que mais se assemelha à composição real da membrana de mamíferos, ao passo que, para SM/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$, provavelmente tal interação se deu por se tratar da monocamada mista que apresenta maior quantidade de SM (70%) – componente individual que possui maior interação com o hormônio.

Na presença do EE2, os deslocamentos observados nas isotermas π -A não foram suficientes para alterar a transição de fase das monocamadas puras e mistas. Contudo, de um modo geral, em 30 mN.m⁻¹, o hormônio causou a diminuição dos valores de C_s^{-1} (diminuindo a rigidez) em todas as monocamadas puras e mistas. Nessa pressão de superfície, a presença do EE2 leva à fase LC ($C_s^{-1} = 100\text{-}250$ mN.m⁻¹) as monocamadas de DPPC, SM, todas as misturas DPPC/SM, DPPC/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$ e SM/Chol, $x_{\text{Chol}} = 0,3$. As misturas binárias contendo 50% ou mais de Chol (tanto com DPPC como SM)

possuem maior rigidez, com valores de C_s^{-1} próximos ao da monocamada composta somente por Chol.

Nas misturas contendo colesterol, as interações atrativas entre os componentes (DPPC/Chol e SM/Chol) foram confirmadas pelos valores negativos de área de excesso. Na pressão de 30 mN.m^{-1} , principalmente nas monocamadas com $x_{\text{Chol}}=0,3$; a presença do EE2, por estar acomodado na interface (verificado pela isoterma deslocada), causou alterações nesses valores: um desvio positivo obtido para a mistura DPPC/Chol, e a aproximação da curva à linha da idealidade para SM/Chol, mas ainda com valores negativos. Os valores de A_{exc} mais negativos para SM/Chol em comparação com DPPC/Chol confirmam que a magnitude do efeito de condensação induzido pelo colesterol é maior na mistura com a SM, causado pela formação de interações de hidrogênio mais intensas. Assim, no caso da mistura SM/Chol a presença do hormônio na interface não foi suficiente para desfavorecer as interações atrativas entre SM e Chol. Na mistura DPPC/SM, os valores de A_{exc} mostrando os desvios positivos da idealidade sugerem que as interações intermoleculares entre DPPC/DPPC e SM/SM são mais favorecidas em relação às que ocorrem entre os dois componentes da mistura. A presença do EE2 na subfase aquosa parece possibilitar as interações DPPC-SM, pois, especialmente para $X_{\text{SM}} = 0,3$; a A_{exc} assume valores negativos, indicando o aumento da estabilidade e miscibilidade das monocamadas.

Os espectros de PM-IRRAS analisados em 30 mN.m^{-1} foram obtidos para as monocamadas de DPPC, SM e as misturas contendo frações molares x_{Chol} ou $x_{\text{SM}} = 0,3$. Foi constatado que o EE2 interage eletrostaticamente com a cabeça polar do DPPC, como verificado pelo deslocamento das bandas referentes aos grupos colina (CN^+C) e fosfato ($\nu_s\text{PO}_2^-$). Contudo, as maiores mudanças espectrais em decorrência do EE2 ocorrem para a mistura DPPC/Chol, $X_{\text{Chol}} = 0,3$; pois o hormônio afeta praticamente todas as bandas relativas às vibrações dos grupos químicos presentes na cabeça do fosfolipídio. Tais

mudanças na região da cabeça afetam a organização das cadeias apolares do DPPC das monocamadas puras e mistas: na presença do EE2 as intensidades relativas entre os estiramentos simétrico e antissimétrico $-\text{CH}_2$ ($\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$) diminuem para ambas as composições (DPPC e DPPC/Chol), indicando o aumento do grau de ordenamento das monocamadas. De fato, como consequência da miscibilidade e da interação atrativa entre DPPC-Chol, a relação ($\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$) para o DPPC aumentou com a introdução do Chol na mistura, indicando uma diminuição na organização das cadeias na monocamada.

Nas monocamadas de SM, a alteração significativa nos espectros de PM-IRRAS em virtude da presença EE2 ocorre na banda referente ao estiramento do grupo carbonila não hidratado ($\text{C}=\text{O}$), que, por ter se deslocado para menores números de onda, sugere-se a diminuição do empacotamento da monocamada. Na região da cauda apolar da SM, a intensidade relativa entre as bandas do estiramento simétrico e antissimétrico $-\text{CH}_2$ ($\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$) praticamente não se altera, indicando que tal interação com o grupo carbonila não-hidratado na região da cabeça polar não afeta a organização das cadeias hidrofóbicas do esfingolípido. Na monocamada mista de DPPC/SM, $x_{\text{SM}} = 0,3$, exposta ao hormônio, em uma comparação com as monocamadas puras, foi possível constatar que parte das moléculas de EE2 interagem com o DPPC (deslocamentos observados nas bandas referentes aos estiramentos dos grupos colina) e parte com a SM (deslocamentos na região da carbonila). Além disso, a diminuição da repulsão entre as moléculas de DPPC e SM (como confirmado pelos valores de A_{exc}) causada pelo EE2 foi confirmada no PM-IRRAS em termos de ordenamento das caudas hidrofóbicas do DPPC e SM.

Para a mistura SM/Chol, $x_{\text{Chol}}=0,3$, na presença do EE2, a banda referente ao $\text{C}=\text{O}$ foi deslocada para menores números de onda, indicando também a diminuição do empacotamento da monocamada mista. Ainda na região da cabeça, houve alteração na banda referente ao estiramento simétrico, ν_s do fosfato hidratado ($\text{P}=\text{O}$), confirmando a interação do EE2 com a monocamada mista por meio da hidroxila $-\text{OH}$ presente no anel

fenólico da molécula do hormônio. O EE2 ainda provoca a diminuição na intensidade relativa entre os estiramentos simétrico e antissimétrico $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), indicando o ordenamento das cadeias hidrofóbicas, visto que também o hormônio EE2 é responsável por desfavorecer as interações atrativas intermoleculares entre SM e Chol.

No caso das misturas ternárias formadas por DPPC/Chol/SM, a condensação e o aumento da rigidez das monocamadas foram causados pela presença do colesterol, sendo maiores para a proporção 1/1/1. Em regiões de altas pressões superficiais, a presença do hormônio causa o deslocamento da isoterma π -A para menores áreas em relação à mistura na ausência do EE2 nas pressões de $\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$ para a proporção 1/1/1 e $\pi = 15 \text{ mN.m}^{-1}$ para 7/2/1. Tal efeito, juntamente com as interações observadas via PM-IRRAS ($\nu_{\text{as}} \text{P=O}$, δCH_2 e o grupo amida da SM) são relacionadas à diminuição do contato das moléculas de colesterol com a água.

Por fim, a maior interação no EE2 em monocamadas se deu para o fosfolípídio POPC, no qual o hormônio permaneceu na interface até o colapso da monocamada. Por se tratar de uma monocamada mais fluida, a elasticidade foi pouco afetada pelo hormônio. Por possuir o mesmo grupo cabeça que o DPPC, foram também constatadas as mesmas interações eletrostáticas com os grupos químicos desta região polar (fosfato e colina). Porém, as maiores mudanças ocorreram na região das cadeias hidrofóbicas, indicando que o hormônio penetra na monocamada de POPC e interage também na região das caudas.

5.2 Vesículas unilamelares gigantes

Os efeitos do EE2 observados para as monocamadas de Langmuir foram correlacionados com as bicamadas (GUVs). Nas GUVs de DPPC, o EE2 causa uma alteração apenas no formato esférico da vesícula. Na monocamada mista composta por DPPC/Chol; $x_{\text{Chol}} 0,3$, a presença do hormônio permite as trocas entre os conteúdos

internos e externos das vesículas, o que provoca a perda de contraste de fase, causada pelo aumento da permeabilidade da membrana.

O EE2 não afeta estruturalmente as vesículas compostas por SM, não sendo verificadas mudanças morfológicas nem perdas no contraste de fase das GUVs. Nas imagens de GUVs de DPPC/SM ($x_{SM}=0,3$), obtidas por fluorescência, a presença da fase não-fluorescente nas GUVs (indicando a separação de fases dos componentes da vesícula mista) não é alterada na presença do EE2. Contudo, o hormônio causa a perda de contraste de fase em mais da metade das vesículas, indicando o aumento da permeabilidade do sistema.

Dois efeitos simultâneos em virtude da presença do EE2 ocorrem nas GUVs compostas por SM/Chol, $x_{Chol}=0,3$, a perda do formato esférico das vesículas e a perda de contraste de fase. As mudanças de conformação somando-se ao efeito de perda de contraste de fase podem indicar que o EE2 causa diferenças na pressão osmótica do sistema SM/Chol.

Não foram constatadas alterações morfológicas nem perda de contraste nas GUVs de DPPC/Chol/SM, 7/2/1, na presença do EE2. Entretanto, na proporção 1/1/1 diversas rupturas nas vesículas são verificadas quando adicionado o hormônio, indicando o seu efeito em vesículas que estão em fase mais ordenadas. Das vesículas formadas (1/1/1) que permaneceram estruturadas, a grande maioria perdeu contraste de fase.

O hormônio também afeta morfológicamente as vesículas estruturadas em fase fluida, como as de POPC, contudo sem romper a bicamada. As vesículas de POPC inicialmente esféricas, adquirem três diferentes transformações quando expostas ao EE2: formato pera, presença de protrusões tubulares e formação de cordões de vesículas.

Este trabalho evidencia a importância da compreensão do comportamento interfacial do hormônio EE2 e seus efeitos em modelos complexos da membrana celular. Tais modelos são formados por misturas binárias e ternárias de componentes reais

presentes na membrana celular dos seres humanos. Visto que esses sistemas podem ser correlacionados com os processos biológicos que ocorrem *in-vitro* ou *in-vivo*, este trabalho oferece um avanço significativo nos estudos sobre as consequências da exposição crônica da saúde humana ao hormônio EE2.

Referências

- [1] T. Deblonde, C. Cossu-Leguille, P. Hartemann, Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214 (2011) 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>.
- [2] R. Rosal, A. Rodríguez, J.A. Perdigón-Melón, A. Petre, E. García-Calvo, M.J. Gómez, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation, *Water Res.* 44 (2010) 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.004>.
- [3] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, A review on emerging contaminants in wastewater and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res.* 72 (2015) 3–27.
- [4] V. Geissen, H. Mol, E. Klumpp, G. Umlauf, M. Nadal, M. van der Ploeg, S.E.A.T.M. van de Zee, C.J. Ritsema, Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management, *Int. Soil Water Conserv. Res.* 3 (2015) 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>.
- [5] S.E. Grineski, T.W. Collins, D.X. Morales, Asian Americans and disproportionate exposure to carcinogenic hazardous air pollutants: A national study, *Soc. Sci. Med.* 185 (2017) 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2017.05.042>.
- [6] K. Kümmerer, Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review, *Chemosphere.* 45 (2001) 957–969. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8).
- [7] D. Guillemot, Antibiotic use in humans and bacterial resistance, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 494–498. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00006-5).
- [8] X. Bai, X. Ma, F. Xu, J. Li, H. Zhang, X. Xiao, The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance., *Sci. Total Environ.* 533 (2015) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.082>.
- [9] F. Ju, B. Li, L. Ma, Y. Wang, D. Huang, T. Zhang, Antibiotic resistance genes and human bacterial pathogens: Co-occurrence, removal, and enrichment in municipal sewage sludge digesters, *Water Res.* 91 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.071>.
- [10] H. Segner, A. Casanova-Nakayama, R. Kase, C.R. Tyler, Impact of environmental estrogens on Yfish considering the diversity of estrogen signaling., *Gen. Comp.*

- Endocrinol. 191 (2013) 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.015>.
- [11] M.A. Rempel, D. Schlenk, Effects of environmental estrogens and antiandrogens on endocrine function, gene regulation, and health in fish., *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267 (2008) 207–52. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00605-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00605-9).
- [12] A.M. Hanson, J.D. Kittilson, L.E. Martin, M.A. Sheridan, Environmental estrogens inhibit growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by modulating the growth hormone-insulin-like growth factor system., *Gen. Comp. Endocrinol.* 196 (2014) 130–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.11.013>.
- [13] S. Tohyama, S. Miyagawa, A. Lange, Y. Ogino, T. Mizutani, M. Ihara, H. Tanaka, N. Tatarazako, T. Kobayashi, C.R. Tyler, T. Iguchi, Evolution of estrogen receptors in ray-finned fish and their comparative responses to estrogenic substances., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.009>.
- [14] I.J. Kang, H. Yokota, Y. Oshima, Y. Tsuruda, T. Yamaguchi, M. Maeda, N. Imada, H. Tadokoro, T. Honjo, Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere.* 47 (2002) 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00205-3).
- [15] A. Lange, M. Sebire, P. Rostkowski, T. Mizutani, S. Miyagawa, T. Iguchi, E.M. Hill, C.R. Tyler, Environmental chemicals active as human antiandrogens do not activate a stickleback androgen receptor but enhance a feminising effect of oestrogen in roach., *Aquat. Toxicol.* 168 (2015) 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.014>.
- [16] V.D.J. Keller, P. Lloyd, J.A. Terry, R.J. Williams, Impact of climate change and population growth on a risk assessment for endocrine disruption in fish due to steroid estrogens in England and Wales., *Environ. Pollut.* 197 (2015) 262–8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.11.017>.
- [17] Z. Yan, G. Lu, J. Liu, S. Jin, An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84 (2012) 334–40. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.010>.
- [18] L.. Folmar, M. Hemmer, R. Hemmer, C. Bowman, K. Kroll, N.. Denslow, Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay, *Aquat. Toxicol.* 49 (2000) 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00076-4).
- [19] P.T.C. Harrison, P. Holmes, C.D.N. Humfrey, Reproductive health in humans and

- wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?, *Sci. Total Environ.* 205 (1997) 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00212-X).
- [20] K.B. Delclos, C.C. Weis, T.J. Bucci, G. Olson, P. Mellick, N. Sadovova, J.R. Latendresse, B. Thorn, R.R. Newbold, Overlapping but distinct effects of genistein and ethinyl estradiol (EE2) in female Sprague–Dawley rats in multigenerational reproductive and chronic toxicity studies, *Reprod. Toxicol.* 27 (2009) 117–132. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.12.005>.
- [21] C. Partridge, A. Boettcher, A.G. Jones, Short-term exposure to a synthetic estrogen disrupts mating dynamics in a pipefish, *Horm. Behav.* 58 (2010) 800–807. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.002>.
- [22] O. Picazo, A. Becerril-Montes, D. Huidobro-Perez, L.M. Garcia-Segura, Neuroprotective Actions of the Synthetic Estrogen 17 α -Ethinylestradiol in the Hippocampus, *Cell. Mol. Neurobiol.* 30 (2010) 675–682. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9490-3>.
- [23] X. Zhang, Y. Gao, Q. Li, G. Li, Q. Guo, C. Yan, Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (2011) 93–100. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9588-0>.
- [24] J. Li, L. Jiang, X. Liu, J. Lv, Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil?water system, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 76 (2013) 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.004>.
- [25] M.N. Andrew, W.A. O'Connor, R.H. Dunstan, G.R. MacFarlane, Exposure to 17 α -ethinylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster, *Ecotoxicology.* 19 (2010) 1440–1451. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0529-5>.
- [26] T. de Mes, G. Zeeman, G. Lettinga, Occurrence and Fate of Estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in STPs for Domestic Wastewater, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* 4 (2005) 275–311. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-3216-x>.
- [27] G. Pojana, A. Gomiero, N. Jonkers, A. Marcomini, Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon, *Environ. Int.* 33 (2007) 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.05.003>.
- [28] A.Z. Aris, A.S. Shamsuddin, S.M. Praveena, Occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review., *Environ. Int.* 69

- (2014) 104–19. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>.
- [29] M. De Wit, D. Keil, K. van der Ven, S. Vandamme, E. Witters, W. De Coen, An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 α -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 167 (2010) 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.003>.
- [30] L.S. Shore, M. Shemesh, Estrogen as an Environmental Pollutant, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97 (2016) 447–448. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1873-9>.
- [31] E. Baatrup, P.G. Henriksen, Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2), *Aquat. Toxicol.* 160 (2015) 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.020>.
- [32] P.F. Siegenthaler, P. Bain, F. Riva, K. Fent, Effects of antiandrogenic progestins, chlormadinone and cyproterone acetate, and the estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2), and their mixtures: Transactivation with human and rainbowfish hormone receptors and transcriptional effects in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquat. Toxicol.* 182 (2017) 142–162. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.001>.
- [33] P. Silva, M.J. Rocha, C. Cruzeiro, F. Malhão, B. Reis, R. Urbatzka, R.A.F. Monteiro, E. Rocha, Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads—A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model, *Aquat. Toxicol.* 124–125 (2012) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.002>.
- [34] Y. Liu, N.F.Y. Tam, Y. Guan, B. Gao, Influence of a Marine Diatom on the Embryonic Toxicity of 17 β -Ethinylestradiol to the Abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, *Water, Air, Soil Pollut.* 223 (2012) 4383–4395. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1202-9>.
- [35] G.-G. Ying, R.S. Kookana, Y.-J. Ru, Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, *Environ. Int.* 28 (2002) 545–551. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2).
- [36] L. Racz, R.K. Goel, Fate and removal of estrogens in municipal wastewater, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 58–70. <https://doi.org/10.1039/B917298J>.
- [37] S. Larcher, G. Delbès, B. Robaire, V. Yargeau, Degradation of 17 α -ethinylestradiol by ozonation: Identification of the by-products and assessment of

- their estrogenicity and toxicity, *Environ. Int.* 39 (2012) 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.09.008>.
- [38] Y. Lee, U. von Gunten, Transformation of 17 α -Ethinylestradiol during Water Chlorination: Effects of Bromide on Kinetics, Products, and Transformation Pathways, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 480–487. <https://doi.org/10.1021/es8023989>.
- [39] F. Yang, W. Huang, W. Xie, C. Lu, W. Liu, Targeted analytical toxicology: simultaneous determination of 17 α -ethynylestradiol and the estrogen-induced vitellogenin biomarker., *Environ. Int.* 74 (2015) 119–24. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.015>.
- [40] J. Chayen, Micelles, monolayers and biomembranes., *Cell Biochem. Funct.* 14 (1996) 75–75. <https://doi.org/10.1002/cbf.640>.
- [41] M.D. Maximino, C.J.L. Constantino, O.N. Oliveira, P. Alessio, Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers, *Appl. Surf. Sci.* 476 (2019) 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.01.065>.
- [42] W.M. Pazin, G.C.M. Ruiz, O.N. de Oliveira, C.J.L. Constantino, Interaction of Artepillin C with model membranes: Effects of pH and ionic strength, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861 (2019) 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.008>.
- [43] L.N. Furini, L.F.C. Morato, D.S. Olivier, M. Lemos, E. Feitosa, C.J.L. Constantino, Interactions of Lipid Polar Headgroups with Carbendazim Fungicide, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 19 (2019) 3734–3743. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16739>.
- [44] I. Langmuir, THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS. 1, *J. Am. Chem. Soc.* 39 (1917) 1848–1906. <https://doi.org/10.1021/ja02254a006>.
- [45] A. Pockels, On the relative contamination of the water-surface by equal quantities of different substances, *Nature.* 46 (1892) 418–419. <https://doi.org/10.1038/046418e0>.
- [46] M. Edidin, Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 414–8. <https://doi.org/10.1038/nrm1102>.
- [47] E. Gorter, F. Grendel, On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood, *J. Exp. Med.* 41 (1925) 439–443. <https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>.
- [48] J.F. Danielli, H. Davson, A contribution to the theory of permeability of thin films,

- J. Cell. Comp. Physiol. 5 (1935) 495–508.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030050409>.
- [49] W. Stoeckenius, D.M. Engelman, Current models for the structure of biological membranes, *J. Cell Biol.* 42 (1969) 613–646. <https://doi.org/10.1083/jcb.42.3.613>.
- [50] J.D. Robertson, The ultrastructure of cell membranes and their derivatives., *Biochem. Soc. Symp.* 16 (1959) 3–43.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13651159>.
- [51] J.D. Robertson, The molecular structure and contact relationships of cell membranes., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 10 (1960) 343–418.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13742209>.
- [52] P. De Weer, A Century of Thinking About Cell Membranes, *Annu. Rev. Physiol.* 62 (2000) 919–926. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.919>.
- [53] A.S.J. Singer, G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* (80-.). 175 (1972) 720–731.
- [54] M.M.L. Nelson, D.L.; Cox, *Principles of biochemistry*, 4th ed., 2002.
- [55] D.M. Engelman, Membranes are more mosaic than fluid, *Nature*. 438 (2005) 578–580.
- [56] K. Simons, G. Van Meer, Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry*. 27 (1988) 6197–6202. <https://doi.org/10.1021/bi00417a001>.
- [57] D.A. Brown, E. London, Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998) 111–136.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.111>.
- [58] M. Edidin, The state of lipid rafts: from model membranes to cells., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32 (2003) 257–83.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142439>.
- [59] K. Simons, W.L.C. Vaz, Model systems, lipid rafts, and cell membranes., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 269–95.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>.
- [60] J. Hjort Ipsen, G. Karlström, O.G. Mouritsen, H. Wennerström, M.J. Zuckermann, Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 905 (1987) 162–172. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90020-4).
- [61] L.A. Bagatolli, O.G. Mouritsen, Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing?, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 1–6.

- <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00457>.
- [62] D. Lingwood, K. Simons, Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle, *Science* (80-.). 327 (2010) 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
- [63] G. Daum, Lipids of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 822 (1985) 1–42. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90002-4).
- [64] M.M. Wright, A.G. Howe, V. Zaremborg, Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues., *Biochem. Cell Biol.* 82 (2004) 18–26. <https://doi.org/10.1139/o03-092>.
- [65] M.P. Veiga, J.L. Arrondo, F.M. Goñi, A. Alonso, Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases., *Biophys. J.* 76 (1999) 342–50. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77201-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77201-2).
- [66] S. Chiantia, N. Kahya, J. Ries, P. Schwille, Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS., *Biophys. J.* 90 (2006) 4500–8. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.081026>.
- [67] J.P. Slotte, Biological functions of sphingomyelins., *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 424–37. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.05.001>.
- [68] I. Solomonov, J. Daillant, G. Fragneto, K. Kjaer, J.S. Micha, F. Rieutord, L. Leiserowitz, Hydrated cholesterol: phospholipid domains probed by synchrotron radiation., *Eur. Phys. J. E. Soft Matter.* 30 (2009) 215–21. <https://doi.org/10.1140/epje/i2009-10498-2>.
- [69] W.K. Subczynski, A. Wisniewska, J.-J. Yin, J.S. Hyde, A. Kusumi, Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol, *Biochemistry.* 33 (1994) 7670–7681. <https://doi.org/10.1021/bi00190a022>.
- [70] D. Lingwood, J. Ries, P. Schwille, K. Simons, Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10005–10010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804374105>.
- [71] D. Casares, P. V. Escribá, C.A. Rosselló, Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>.
- [72] F.A. Heberle, G.W. Feigenson, Phase separation in lipid membranes., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004630>.
- [73] A. Radhakrishnan, Phase separations in binary and ternary cholesterol-phospholipid mixtures., *Biophys. J.* 98 (2010) L41-3.

- <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.005>.
- [74] D. Marsh, Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams., *Biochim. Biophys. Acta.* 1798 (2010) 688–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.027>.
- [75] M. Jurak, M. Golabek, L. Holysz, E. Chibowski, Properties of Langmuir and solid supported lipid films with sphingomyelin., *Adv. Colloid Interface Sci.* 222 (2015) 385–97. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.008>.
- [76] R.S. Petruzielo, F. a Heberle, P. Drazba, J. Katsaras, G.W. Feigenson, Phase behavior and domain size in sphingomyelin-containing lipid bilayers., *Biochim. Biophys. Acta.* 1828 (2013) 1302–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.007>.
- [77] R.M. Raphael, R.E. Waugh, Accelerated interleaflet transport of phosphatidylcholine molecules in membranes under deformation, *Biophys. J.* 71 (1996) 1374–1388. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79340-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79340-2).
- [78] R. Pignatello, T. Musumeci, L. Basile, C. Carbone, G. Puglisi, Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: Involvement in drug design and development, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3 (2011) 4. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76461>.
- [79] Y.S. Lee, *Self-Assembly and Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470292525>.
- [80] O.G. Mouritsen, L.A. Bagatolli, Lipids Speak the Language of Curvature, in: *Life-As a Matter Fat*, 2016: pp. 45–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22614-9_4.
- [81] D. Lombardo, M.A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra, Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches, *Adv. Condens. Matter Phys.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/151683>.
- [82] T.M. Nobre, F.J. Pavinatto, L. Caseli, A. Barros-Timmons, P. Dynarowicz-Łątka, O.N. Oliveira, Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models, *Thin Solid Films.* 593 (2015) 158–188. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2015.09.047>.
- [83] A. Casadó, M.C. Giuffrida, M.L. Sagristá, F. Castelli, M. Pujol, M.A. Alsina, M. Mora, Langmuir monolayers and Differential Scanning Calorimetry for the study of the interactions between camptothecin drugs and biomembrane models., *Biochim. Biophys. Acta.* 1858 (2016) 422–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.007>.
- [84] M. Ceccarelli, R. Germani, S. Massari, C. Petit, A. Nurisso, J.-L. Wolfender, L.

- Goracci, Phospholipidosis effect of drugs by adsorption into lipid monolayers., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 136 (2015) 175–84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.003>.
- [85] RAYLEIGH, Surface Tension, *Nature*. 43 (1891) 437–439. <https://doi.org/10.1038/043437c0>.
- [86] G.T. Barnes, I.R. Gentle, *Interfacial Science: an introduction*, 2nd ed., New York, 2011.
- [87] Rayleigh, XXXVI. Investigations in Capillarity:—The size of drops.—The liberation of gas from supersaturated solutions.—Colliding jets.—The tension of contaminated water-surfaces, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 48 (1899) 321–337. <https://doi.org/10.1080/14786449908621342>.
- [88] I. Langmuir, THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS., *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>.
- [89] K.B. Blodgett, Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface, *J. Am. Chem. Soc.* 57 (1935) 1007–1022. <https://doi.org/10.1021/ja01309a011>.
- [90] D.K. Schwartz, Langmuir-Blodgett film structure, *Surf. Sci. Rep.* 27 (1997) 245–334. [https://doi.org/10.1016/S0167-5729\(97\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5729(97)00003-4).
- [91] W.A.B. e A.J.M.H. Maria E. D. Zaniquelli, Construção de uma Cuba de Langmuir para Preparação e Estudo de Monocamadas Líquidas, *Quim. Nov.* 16 (1992) 229–233.
- [92] A.M. Brzozowska, M.H.G. Duits, F. Mugele, Stability of stearic acid monolayers on Artificial Sea Water, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 407 (2012) 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.04.055>.
- [93] G.C.M. Ruiz, M.A.E. Cruz, A.N. de Faria, D.C. Zancanela, P. Ciancaglini, A.P. Ramos, Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium, *Mater. Sci. Eng. C*. 77 (2016) 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.204>.
- [94] Ò. Domènech, F. Sanz, M.T. Montero, J. Hernández-Borrell, Thermodynamic and structural study of the main phospholipid components comprising the mitochondrial inner membrane, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758 (2006) 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.008>.
- [95] K. Hac-Wydro, K. Jedrzejek, P. Dynarowicz-Łatka, Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary

- Langmuir monolayers., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 72 (2009) 101–11. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.019>.
- [96] R. Worch, K. Piecyk, A.B. Kolasa, M. Jankowska-Anyszka, Translocation of 5' mRNA cap analogue - peptide conjugates across the membranes of giant unilamellar vesicles., *Biochim. Biophys. Acta*. 1858 (2016) 311–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.002>.
- [97] N. Kaszás, T. Bozó, M. Budai, P. Gróf, Ciprofloxacin encapsulation into giant unilamellar vesicles: membrane binding and release., *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 694–705. <https://doi.org/10.1002/jps.23410>.
- [98] C.A. Moreno Aguilar, V. Pérez Luna, J.L. Arauz Lara, S. Eduardo, A. Espinoza, M. Quintana Ruiz, Carbon Nanostructures Interaction with Giant Unilamellar Vesicles as a Cellular Model, *Biophys. J.* 110 (2016) 242a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.1334>.
- [99] D. Boytsov, C. Hanneschlaeger, A. Horner, P. Pohl, Determining Unitary Water Permeability of Membrane Proteins Reconstituted into Giant Unilamellar Vesicles, *Biophys. J.* 110 (2016) 215a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.1195>.
- [100] L.A. Bagatolli, Microscopy imaging of membrane domains., *Biochim. Biophys. Acta*. 1798 (2010) 1285. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.023>.
- [101] G.H. Zan, C. Tan, M. Deserno, F. Lanni, M. Lösche, Hemifusion of giant unilamellar vesicles with planar hydrophobic surfaces: a fluorescence microscopy study., *Soft Matter*. 8 (2012) 10877–10886. <https://doi.org/10.1039/C2SM25702E>.
- [102] J. Katsaras, *Characterization of Biological Membranes*, De Gruyter, Berlin, Boston, 2019. <https://doi.org/10.1515/9783110544657>.
- [103] C.K. Haluska, A.P. Schröder, P. Didier, D. Heissler, G. Duportail, Y. Mély, C.M. Marques, Combining fluorescence lifetime and polarization microscopy to discriminate phase separated domains in giant unilamellar vesicles., *Biophys. J.* 95 (2008) 5737–47. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131490>.
- [104] W.M. Pazin, *Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno Pythium aphanidermatum e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas biomiméticos de membranas*, Universidade de São Paulo - USP, 2016.
- [105] M. Angelova, S. Soleau, P. Meleard, F. Faucon, P. Bothorel, Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications., *Trends Colloid Interface Sci.* 89 (1992) 127–131.
- [106] A. Weinberger, F.-C. Tsai, G.H. Koenderink, T.F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar

- Vesicles, *Biophys. J.* 105 (2013) 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.024>.
- [107] D. Marsh, Lateral pressure in membranes, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1286 (1996) 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3).
- [108] P.A. Janmey, P.K.J. Kinnunen, Biophysical properties of lipids and dynamic membranes, *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.009>.
- [109] R.S. Cantor, Lateral Pressures in Cell Membranes: A Mechanism for Modulation of Protein Function, *J. Phys. Chem. B.* 101 (1997) 1723–1725. <https://doi.org/10.1021/jp963911x>.
- [110] S.E. Horvath, G. Daum, Progress in Lipid Research Lipids of mitochondria, *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>.
- [111] S. Ortiz-Collazos, Y.M.H. Gonçalves, B.A.C. Horta, P.H.S. Picciani, S.R.W. Louro, O.N. Oliveira, A.S. Pimentel, Langmuir films and mechanical properties of polyethyleneglycol fatty acid esters at the air-water interface, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 498 (2016) 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.032>.
- [112] D. Vollhardt, V.B. Fainerman, Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility., *Adv. Colloid Interface Sci.* 127 (2006) 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.006>.
- [113] K. Gong, S.S. Feng, M.L. Go, P.H. Soew, Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 207 (2002) 113–125. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00043-2).
- [114] Y.-L. Lee, J.-Y. Lin, C.-H. Chang, Thermodynamic characteristics and Langmuir-Blodgett deposition behavior of mixed DPPA/DPPC monolayers at air/liquid interfaces., *J. Colloid Interface Sci.* 296 (2006) 647–54. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.09.050>.
- [115] T.-H. Chou, C.-H. Chang, Thermodynamic behavior and relaxation processes of mixed DPPC/cholesterol monolayers at the air/water interface, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 17 (2000) 71–79. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00102-2).
- [116] H. Nakahara, S. Lee, O. Shibata, Specific interaction restrains structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems: an in situ PM-

- IRRAS investigation., *Biochim. Biophys. Acta.* 1798 (2010) 1263–71.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.018>.
- [117] D. Blaudez, T. Buffeteau, J.C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, J.M. Turllet, Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 869–874.
<https://doi.org/10.1366/0003702934415273>.
- [118] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 303. <https://doi.org/10.1039/dc9868100303>.
- [119] P. Husen, L.R. Arriaga, F. Monroy, J.H. Ipsen, L. a. Bagatolli, Morphometric image analysis of giant vesicles: A new tool for quantitative thermodynamics studies of phase separation in lipid membranes, *Biophys. J.* 103 (2012) 2304–2310.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.031>.
- [120] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1376 (1998) 91–145.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(98)00006-9).
- [121] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the sphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1255 (1995) 213–236.
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00202-A](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00202-A).
- [122] K. Kim, C. Kim, Y. Byun, Preparation of a Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Langmuir–Blodgett Monolayer That Suppresses Protein Adsorption, *Langmuir.* 17 (2001) 5066–5070.
<https://doi.org/10.1021/la0102096>.
- [123] E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, F. Ravera, Mixed DPPC-cholesterol Langmuir monolayers in presence of hydrophilic silica nanoparticles., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 105 (2013) 284–93.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.020>.
- [124] H.E. Ries, H. Swift, Electron microscope and pressure-area studies on a gramicidin and its binary mixtures with cerebronic acid, cholesterol and valinomycin, *Colloids and Surfaces.* 40 (1989) 145–165. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(89\)80015-0](https://doi.org/10.1016/0166-6622(89)80015-0).
- [125] A. Więcek, P. Dynarowicz-Łątka, J. Miñones, O. Conde, M. Casas, Interactions between an anticancer drug – edelfosine – and cholesterol in Langmuir monolayers, *Thin Solid Films.* 516 (2008) 8829–8833.
<https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.11.054>.
- [126] K. Sabatini, J.-P. Mattila, P.K.J. Kinnunen, Interfacial Behavior of Cholesterol, Ergosterol, and Lanosterol in Mixtures with DPPC and DMPC, *Biophys. J.* 95

- (2008) 2340–2355. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.132076>.
- [127] P. V. Escribá, X. Busquets, J.I. Inokuchi, G. Balogh, Z. Török, I. Horváth, J.L. Harwood, L. Víg, Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment, *Prog. Lipid Res.* 59 (2015) 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.003>.
- [128] G. van Meer, A.I.P.M. de Kroon, Lipid map of the mammalian cell., *J. Cell Sci.* 124 (2011) 5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.
- [129] K. Dopierala, M. Skrzypiec, Morphology, compressibility and viscoelasticity of the mixed lipid monolayers in the presence of β -carotene, *Chem. Phys. Lipids*. 213 (2018) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.04.001>.
- [130] A.A. Arima, F.J. Pavinatto, O.N. Oliveira, E.R.P. Gonzales, The negligible effects of the antifungal natamycin on cholesterol-dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers may explain its low oral and topical toxicity for mammals, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 122 (2014) 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.058>.
- [131] T. Miyoshi, S. Kato, Detailed Analysis of the Surface Area and Elasticity in the Saturated 1,2-Diacylphosphatidylcholine/Cholesterol Binary Monolayer System, *Langmuir*. 31 (2015) 9086–9096. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01775>.
- [132] C. Ohe, T. Sasaki, M. Noi, Y. Goto, K. Itoh, Sum frequency generation spectroscopic study of the condensation effect of cholesterol on a lipid monolayer, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 73–79. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1030-0>.
- [133] F.J. Pavinatto, C.P. Pacholatti, É.A. Montanha, L. Caseli, H.S. Silva, P.B. Miranda, T. Viitala, O.N. Oliveira, Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and langmuir-blodgett films, *Langmuir*. 25 (2009) 10051–10061. <https://doi.org/10.1021/la901019p>.
- [134] P.H.B. Aoki, L.F.C. Morato, F.J. Pavinatto, T.M. Nobre, C.J.L. Constantino, O.N. Oliveira, Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin, *Langmuir*. 32 (2016) 3766–3773. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00693>.
- [135] G.M. Stunges, C.S. Martin, G.C.M. Ruiz, O.N. Oliveira, C.J.L. Constantino, P. Alessio, Interaction between 17 α -ethynylestradiol hormone with Langmuir monolayers: The role of charged headgroups, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 158 (2017) 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.034>.

- [136] W. Hübner, A. Blume, Interactions at the lipid-water interface, *Chem. Phys. Lipids*. 96 (1998) 99–123. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00083-8).
- [137] J.L.R. Arrondo, F.M. Goñi, J. Macarulla, Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations, *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 794 (1984) 165–168. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(84\)90310-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(84)90310-2).
- [138] E.M. Adams, C.B. Casper, H.C. Allen, Effect of cation enrichment on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers at the air-water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 478 (2016) 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.06.016>.
- [139] E.M. Adams, D. Verreault, T. Jayarathne, R.E. Cochran, E.A. Stone, H.C. Allen, Surface organization of a DPPC monolayer on concentrated SrCl₂ and ZnCl₂ solutions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016) 32345–32357. <https://doi.org/10.1039/C6CP06887A>.
- [140] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. Peter Slotte, Cholesterol interactions with phospholipids in membranes, *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 66–97. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0).
- [141] T.E. Goto, L. Caseli, The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition, *J. Colloid Interface Sci.* 431 (2014) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.050>.
- [142] V.P.N. Geraldo, F.J. Pavinatto, T.M. Nobre, L. Caseli, O.N. Oliveira, Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids, *Chem. Phys. Lett.* 559 (2013) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.12.064>.
- [143] G. Neunert, J. Makowiecki, E. Piosik, R. Hertmanowski, K. Polewski, T. Martynski, Miscibility of dl- α -tocopherol β -glucoside in DPPC monolayer at air/water and air/solid interfaces, *Mater. Sci. Eng. C*. 67 (2016) 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.004>.
- [144] R.F. Vázquez, M.A. Daza Millone, F.J. Pavinatto, M.L. Fanani, O.N. Oliveira, M.E. Vela, S.M. Maté, Impact of sphingomyelin acyl chain (16:0 vs 24:1) on the interfacial properties of Langmuir monolayers: a PM-IRRAS study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.018>.
- [145] D.S. Alvares, M.L. Fanani, J. Ruggiero Neto, N. Wilke, The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral

- electrostatic attractions, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.010>.
- [146] D.S. Alvares, N. Wilke, J. Ruggiero Neto, M.L. Fanani, The insertion of Polybia-MP1 peptide into phospholipid monolayers is regulated by its anionic nature and phase state, *Chem. Phys. Lipids.* 207 (2017) 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.08.001>.
- [147] A. Szcześ, M. Jurak, E. Chibowski, Stability of binary model membranes—Prediction of the liposome stability by the Langmuir monolayer study, *J. Colloid Interface Sci.* 372 (2012) 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.01.035>.
- [148] R. Mendelsohn, G. Mao, C.R. Flach, Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films, *BBA - Biomembr.* 1798 (2010) 788–800. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.024>.
- [149] Q. Huo, L. Dziri, B. Desbat, K.C. Russell, R.M. Leblanc, Polarization-Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopic Studies of a Hydrogen-Bonding Network at the Air–Water Interface, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 2929–2934. <https://doi.org/10.1021/jp984389c>.
- [150] J.P. Slotte, The importance of hydrogen bonding in sphingomyelin’s membrane interactions with co-lipids, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.008>.
- [151] S. Nakata, A. Ikeguchi, T. Shiota, R. Komori, N. Kumazawa, M. Tsutsumi, M. Denda, Interactions 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, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 84 (2011) 283–289. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20100256>.
- [152] M. Rujoi, D. Borchman, D.B. DuPré, M.C. Yappert, Interactions of Ca²⁺ with Sphingomyelin and Dihydrosphingomyelin, *Biophys. J.* 82 (2002) 3096–3104. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75651-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75651-8).
- [153] M. Deleu, J.M. Crowet, M.N. Nasir, L. Lins, Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 3171–3190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023>.
- [154] T.E. Goto, L. Caseli, The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air-water interface is modulated by the monolayer lipid composition, *J. Colloid Interface Sci.* 431 (2014) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.050>.

- [155] R.F. Lopez, T.M. Nobre, C. de M. Accardo, P.C.P. Filho, H.B. Nader, C.C. Lopes, L. Caseli, Effect of carrageenans of different chemical structures in biointerfaces: A Langmuir film study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 111 (2013) 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.039>.
- [156] S. Ali, J.M. Smaby, H.L. Brockman, R.E. Brown, Cholesterol's Interfacial Interactions with Galactosylceramides, *Biochemistry*. 33 (1994) 2900–2906. <https://doi.org/10.1021/bi00176a020>.
- [157] B. Ramstedt, J.P. Slotte, Interaction of Cholesterol with Sphingomyelins and Acyl-Chain-Matched Phosphatidylcholines: A Comparative Study of the Effect of the Chain Length, *Biophys. J.* 76 (1999) 908–915. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77254-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77254-1).
- [158] J.M. Boggs, Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes., *Can. J. Biochem.* 58 (1980) 755–770. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(87)90017-7).
- [159] K. Hac-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łatka, M. Paluch, Cholesterol and phytosterols effect on sphingomyelin/phosphatidylcholine model membranes- Thermodynamic analysis of the interactions in ternary monolayers, *J. Colloid Interface Sci.* 329 (2009) 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.057>.
- [160] P. Wydro, The magnitude of condensation induced by cholesterol on the mixtures of sphingomyelin with phosphatidylcholines-Study on ternary and quaternary systems, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 82 (2011) 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.023>.
- [161] R.F. Vázquez, M.A. Daza Millone, F.J. Pavinatto, V.S. Herlax, L.S. Bakás, O.N. Oliveira, M.E. Vela, S.M. Maté, Interaction of acylated and unacylated forms of *E. coli* alpha-hemolysin with lipid monolayers: a PM-IRRAS study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 158 (2017) 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.020>.
- [162] U.P. Fringeli, H.H. Günthard, Infrared Membrane Spectroscopy, in: *Membr. Spectrosc.*, Springer, Berlin, 1981: pp. 270–332. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81537-9_6.
- [163] G.C.M. Ruiz, W. Moreira, L. Fernando, O.N. Oliveira, C. José, L. Constantino, Correlating mono- and bilayers of lipids to investigate the pronounced effects of steroid hormone 17 α -ethynylestradiol on membrane models of DPPC / cholesterol, *J. Mol. Liq.* 311 (2020) 113324. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113324>.

- [164] L.S.A. Pereira, S.A. Camacho, A.A. Malfatti-Gasperini, K. Jochelavicius, T.M. Nobre, O.N. Oliveira, P.H.B. Aoki, Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 171 (2018) 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.002>.
- [165] T.F. Schmidt, L. Caseli, O.N. Oliveira, R. Itri, Binding of methylene blue onto langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy, *Langmuir*. 31 (2015) 4205–4212. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00166>.
- [166] S. Nagarajan, E.E. Schuler, K. Ma, J.T. Kindt, R.B. Dyer, Dynamics of the Gel to Fluid Phase Transformation in Unilamellar DPPC Vesicles, *J. Phys. Chem. B*. 116 (2012) 13749–13756. <https://doi.org/10.1021/jp309832u>.
- [167] K.J. Tierney, D.E. Block, M.L. Longo, Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol, *Biophys. J.* 89 (2005) 2481–2493. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057943>.
- [168] T. Franke, C. Leirer, A. Wixforth, M.F. Schneider, Phase Transition Induced Adhesion of Giant Unilamellar Vesicles, *ChemPhysChem*. 10 (2009) 2858–2861. <https://doi.org/10.1002/cphc.200800555>.
- [169] L. Kristanc, B. Božič, G. Gomišček, The role of sterols in the lipid vesicle response induced by the pore-forming agent nystatin, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 2635–2645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.019>.
- [170] S.L. Veatch, S.L. Keller, Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol, *Biophys. J.* 85 (2003) 3074–3083. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74726-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74726-2).
- [171] T. Baumgart, S.T. Hess, W.W. Webb, Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension, *Nature*. 425 (2003) 821–824. <https://doi.org/10.1038/nature02013>.
- [172] C.K. Haluska, A.P. Schröder, P. Didier, D. Heissler, G. Duportail, Y. Mally, C.M. Marques, Combining Fluorescence Lifetime and Polarization Microscopy to Discriminate Phase Separated Domains in Giant Unilamellar Vesicles, *Biophys. J.* 95 (2008) 5737–5747. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131490>.
- [173] T. Bhatia, P. Husen, J. Brewer, L. a Bagatolli, P.L. Hansen, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures., *Biochim. Biophys. Acta*. 1848 (2015) 3175–80.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.020>.
- [174] K.C. Courtney, W. Pezeshkian, R. Raghupathy, C. Zhang, A. Darbyson, J.H. Ipsen, D.A. Ford, H. Khandelia, J.F. Presley, X. Zha, C24 Sphingolipids Govern the Transbilayer Asymmetry of Cholesterol and Lateral Organization of Model and Live-Cell Plasma Membranes, *Cell Rep.* 24 (2018) 1037–1049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.104>.
- [175] J. Juhasz, J.H. Davis, F.J. Sharom, Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of ‘lipid raft’ mixtures, *Biochem. J.* 430 (2010) 415–423. <https://doi.org/10.1042/bj20100516>.
- [176] M. Yanagisawa, M. Imai, T. Taniguchi, Shape Deformation of Ternary Vesicles Coupled with Phase Separation, *Phys. Rev. Lett.* 100 (2008) 148102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.148102>.
- [177] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: A temperature-controlled force spectroscopy study, *Langmuir*. 28 (2012) 12851–12860. <https://doi.org/10.1021/la302620t>.
- [178] B. Babnik, D. Miklavčič, M. Kandušer, H. Hägerstrand, V. Kralj-Iglič, A. Iglič, Shape transformation and burst of giant POPC unilamellar liposomes modulated by non-ionic detergent C12E8, *Chem. Phys. Lipids*. 125 (2003) 123–138. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00084-7](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00084-7).
- [179] V. Kralj-Iglic, A. Iglic, G. Gomiseck, F. Sevsek, V. Arrigler, H. Hägerstrand, Microtubes and nanotubes of a phospholipid bilayer membrane, *J. Phys. A: Math. Gen.* 35 (2002) 1533–1549. <https://doi.org/10.1088/0305-4470/35/7/305>.
- [180] V. Kralj-Iglič, G. Gomišček, J. Majhenc, V. Arrigler, S. Svetina, Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 181 (2001) 315–318. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00802-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00802-5).
- [181] V. Passos Gibson, M. Fauquignon, E. Ibarboure, J. Leblond Chain, J.-F. Le Meins, Switchable Lipid Provides pH-Sensitive Properties to Lipid and Hybrid Polymer/Lipid Membranes, *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 637. <https://doi.org/10.3390/polym12030637>.
- [182] P. Peterlin, V. Arrigler, K. Kogej, S. Svetina, P. Walde, Growth and shape transformations of giant phospholipid vesicles upon interaction with an aqueous oleic acid suspension, *Chem. Phys. Lipids*. 159 (2009) 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.03.005>.
- [183] K.A. Riske, T.P. Sudbrack, N.L. Archilha, A.F. Uchoa, A.P. Schroder, C.M.

- Marques, M.S. Baptista, R. Itri, Giant Vesicles under Oxidative Stress Induced by a Membrane-Anchored Photosensitizer, *Biophys. J.* 97 (2009) 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.023>.
- [184] L. Miao, U. Seifert, M. Wortis, H.-G. Döbereiner, Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity, *Phys. Rev. E.* 49 (1994) 5389–5407. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.49.5389>.