

Universidade de São Paulo  
Instituto de Física

Estudo da interação de líquidos iônicos anfifílicos  
com sistemas biomiméticos de membrana: uma  
abordagem estrutural e espectroscópica

Natália Fernandes de Oliveira



Orientador: Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa - Orientador (IF-USP)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar (CCET - UFMA)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thereza Amélia Soares da Silva (IF-USP)

São Paulo

2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação**  
**do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Oliveira, Natália Fernandes de

Estudo da interação de lípidos iônicos anfífilos com sistemas biomiméticos de membrana: uma abordagem estrutural e espectroscópica. São Paulo, 2021.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Geral.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

Área de Concentração: Biofísica

Unitermos: 1. Biofísica; 2. Lipídeos; 3. Lípidos iônicos; 4. SAXS.

USP/IF/SBI-003/2021



University of São Paulo  
Physics Institute

The study of the interaction of amphiphilic ionic  
liquids with model membranes: a structural and  
spectroscopic approach

Natália Fernandes de Oliveira

Supervisor: Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

Dissertation submitted to the Physics Institute of the  
University of São Paulo in partial fulfillment of the re-  
quirements for the degree of Master of Science.

Examining Committee:

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa - Supervisor (IF-USP)

Prof. Dr. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar (CCET - UFMA)

Prof. Dr. Thereza Amélia Soares da Silva (IF-USP)

São Paulo

2021



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família: Ana, Francisco, Juliana e Fernando, por todo o amor, apoio, compreensão e paciência nesses anos. Sem eles não seria possível seguir meus sonhos. Obrigada por todo esforço e dedicação em proporcionar um ambiente perfeito para que eu me desenvolvesse profissionalmente.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Leandro R. S. Barbosa por ter confiado em mim este projeto, pela orientação, auxílio e toda aprendizagem ao longo desse trabalho.

Em terceiro, os meus colegas de laboratório: Amanda Roberta, Mayra, Bárbara, Frederico, Raphael, Giovana, Luiz, Letícia, Bruna e Amanda Santos. Obrigada pela companhia de todos os dias, pelas conversas, piadas e torcida nos experimentos. Vocês tornaram os dias no laboratório incríveis.

Também um agradecimento especial ao Gabriel Amorim por todo o tempo que passamos juntos. Obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar a ser cada dia melhor. Seu companheirismo, paciência e apoio foram essenciais para que eu nunca desistisse.

Além do mais, agradeço à Profa. Dra. Rosangela Itri e seu grupo para todas as discussões, risadas e apoio ao longo desses anos. À Profa. Dra. Maria Teresa Lamy pela disponibilização do laboratório de Biofísica, e ao Dr. Evandro e Marcelo pela ajuda e disposição nos laboratórios.

Aos Prof. Dr. Francesco Spinozzi e Prof. Dr. Paolo Mariani da Università Politecnica delle Marche por terem me recebido por 5 meses em seu laboratório e colaborado imensamente com esse trabalho.

Aos meus colegas da bateria Cherateria, pelos melhores momentos durante o período da graduação e pós-graduação.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) e Instituto de Biociências (ICB-USP) pela utilização de suas instalações para a realização dos experimentos contidos neste trabalho.

Por último, meu agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de

São Paulo (FAPESP) por todo apoio financeiro, essencial na realização desse projeto e nas oportunidades profissionais que tive durante a pós-graduação (processo nº 2018/04796-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)). Também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*"Don't let anyone rob you of your imagination, your creativity, or your curiosity. It's your place in the world; it's your life. Go on and do all you can with it, and make it the life you want to live."*

**Mae Jemison**



## RESUMO

Os Líquidos iônicos (LIs) são uma classe interessante de moléculas orgânicas que tem sido objeto de diferentes estudos nos últimos anos. Tipicamente, LIs são compostos por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico, e podem ser encontrados no estado líquido a temperaturas abaixo de 100°C. Devido à sua geometria peculiar, estes compostos possuem uma vasta gama de aplicações em diversas áreas do conhecimento como química verde, farmacologia, biomedicina e bionanotecnologia. Apesar disso, pesquisas recentes mostraram que a toxicidade dos LIs é maior do que se acreditava anteriormente, particularmente com sistemas de relevância biológica. Desta forma, vários estudos físico-químicos das interações entre LIs e sistemas de membrana biomimética foram realizados a fim de identificar os mecanismos moleculares por trás dessa toxicidade. O principal objetivo deste projeto é obter mais informações sobre a ação do líquido iônico *cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio* ( $[C_{14}mim]Cl$ ) em sistemas de membranas biomiméticas para verificar os mecanismos moleculares por trás de sua toxicidade. Para isso, utilizaram-se os lipídios POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), esfingomiéline e colesterol na composição de vesículas que simulam o comportamento da membrana plasmática de eritrócitos e analisou-se a influência de diferentes concentrações de LIs em suas propriedades estruturais. As interações entre esses sistemas lipídicos e o LI em questão foram estudadas através de diferentes técnicas biofísicas: espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), supressão de fluorescência, espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e crio-microscopia (Crio-EM). De acordo com os resultados, o LI interagiu com a bicamada. O diâmetro hidrodinâmico das vesículas aumentou de  $(133.3 \pm 0.3)nm$  para  $(138 \pm 1)nm$  conforme o LI foi adicionado, e nas micrografias foi possível observar uma região escura em torno das vesículas, ausente nos sistemas sem o líquido iônico. O potencial zeta das membranas passou de  $(-1.4 \pm 1.6)mV$  para  $(61.5 \pm 1.4)mV$  quando se adicionou 30% de LI, ficando claro que o líquido iônico alterou a carga superficial das vesículas e sua estabilidade. Com as medidas de SAXS, observou-se que as moléculas do líquido iônico estão concentradas na parte externa da membrana. O parâmetro  $f_{LI}$  relacionado com a posição do LI foi sempre maior que o parâmetro  $f_{pol}$  relacionado com a posição da cabeça polar dos lipídios, indicando que o LI está na região externa ao redor da bicamada. O líquido iônico também alterou algumas propriedades estruturais da membrana, como a área por lipídio  $A$ , que aumentou conforme o LI foi adicionado, e a posição da molécula de colesterol  $f_{chol}$ , que se aproximou cada vez mais da superfície da membrana. No entanto, mesmo para concentrações maiores, o LI não foi capaz de penetrar na membrana, fato confirmado pelas medidas de supressão de fluorescência, na qual nenhum efeito foi evidenciado, pelo menos para razões LI:Lipídio menores que 3 : 10. As intensidades do espectro de emissão permaneceram sempre próximas, e as porcentagens de vazamento com valores inferiores a 20%.

**Palavras-chave:** Membranas, líquidos iônicos, SAXS, fluorescência, DLS, microscopia, potencial zeta.





## ABSTRACT

Ionic Liquids (ILs) are an interesting class of organic molecules that have been the subject of many different studies over the last few years. Typically, they are composed of an organic cation and an organic or inorganic anion and can be found in liquid in the liquid state at temperatures below  $100^{\circ}C$ . Due to their peculiar geometry, these compounds have a vast array of potential applications in different areas of knowledge such as green chemistry, pharmacology, biomedicine, and bionanotechnology. Despite that, previous research shows that the toxicity of ILs is higher than previously believed, particularly with systems of biological relevance. Therefore, several physicochemical studies of its interactions with biomimetic membrane systems were carried out in order to identify the molecular mechanisms behind its toxicity. The main goal of this project is to get more information about the interaction of the ionic liquid *1-tetradecyl-3-methylimidazolium chloride* ( $[C_{14}mim]Cl$ ) on biomimetic membrane systems to identify the molecular factors mechanisms behind its toxicity. To do this, we used the lipids POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), sphingomyelin, and cholesterol in order to simulate erythrocytes plasmatic membrane behavior and analyze the influence of different concentrations of ILs on their structural properties. The interactions between these lipid systems and the IL in question were studied using different biophysical techniques: small-angle X-ray scattering (SAXS), fluorescence quenching, dynamic light scattering (DLS), potential zeta, transmission electron microscopy (TEM), and cryo-electron microscopy (Cryo-EM). According to the results, LI interacted with the bilayer. The hydrodynamic diameter of the vesicles increased from  $(133.3 \pm 0.3)nm$  to  $(138 \pm 1)nm$  as the LI was added, and in the micrographs, it was possible to see a dark region around the vesicles, which did not exist in the systems without ionic liquid. The zeta potential of the membranes went from  $(-1.4 \pm 1.6)mV$  to  $(61.5 \pm 1.4)mV$  for the systems with 30% of IL, making it clear that the ionic liquid changed the surface charge of the vesicles and their stability. With the SAXS measurements, it was seen that the ionic liquid molecules are concentrated on the outer membrane. The parameter  $f_{LI}$  related to the position of the IL was always greater than the parameter  $f_{pol}$  related to the position of the lipids polar head, indicating that the IL is in the outer region around the bilayer. The ionic liquid also altered some properties of the membrane, such as the area by lipid  $A$ , which increased as the IL was added, and the position of the cholesterol molecule  $f_{chol}$ , which got closer and closer to the membrane surface. However, even at higher concentrations, IL was not able to penetrate the membrane, a fact confirmed by fluorescence quenching measures, in which no effect was evident, at least for IL:Lipid ratios less than 3 : 10. The intensities of the emission spectrum remained always close, and the leakage percentages with values less than 20%.

**Keywords:** Membranes, ionic liquids, SAXS, fluorescence, DLS, microscopy, zeta potential.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Diferentes campos de aplicação dos líquidos iônicos. Figura adaptada de (VEKARIYA, 2017). . . . . 24
- Figura 2 – Estruturas químicas dos cátions e ânions típicos dos líquidos iônicos.  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  representam diferentes radicais, o mais comum é o substituinte alquil  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  com ( $n = 1, 3, 5, \dots$ ).  $X^-$  representa os haletos cloro (Cl), bromo (Br) e iodo (I). Existem muitas outras opções disponíveis. Figura adaptada de (DONG *et al.*, 2017). . . . . 25
- Figura 3 – Esquema simplificado das estruturas formadas por moléculas anfifílicas em solução. Essas estruturas podem ser previstas a partir do parâmetro crítico de empacotamento  $p$ , que depende do volume  $v$  e comprimento  $l_C$  efetivos da parte hidrofóbica e da área de superfície  $A$  efetiva do grupo hidrofílico. Figura adaptada de (LOMBARDO *et al.*, 2016). . . . . 28
- Figura 4 – Estrutura esquemática de um fosfolipídio e da sua organização em bicamadas. Na esquerda, a esquematização da estrutura química do fosfolipídio e as regiões hidrofílica e hidrofóbica. Na direita, o esboço simplificado da organização da bicamada. Figura adaptada de: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/membranes-and-transport/passive-transport/a/diffusion-and-passive-transport>. . . . . 29
- Figura 5 – Estrutura química dos lipídios utilizados neste trabalho. Figura disponível em: <https://avantilipids.com/>. . . . . 33
- Figura 6 – Ilustração simplificada da formação das lipossomas pelo método de hidratação do filme. O passo de extrusão promove a formação de lipossomas unilamelares de tamanho uniforme. As vesículas utilizadas neste trabalho foram extrudadas 31 vezes através de um filtro de policarbonato (tamanho dos poros de  $100\text{nm}$ ) em um sistema automatizado. Figura adaptada de (SEJWAL *et al.*, 2017). . . . . 40
- Figura 7 – Esquema ilustrando um equipamento de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Uma fonte de raios-X produz o feixe incidente que passa por um monocromador e colimador antes de atingir o suporte com a amostra. O feixe então é espalhado em todas as direções e um detector localizado a uma certa distância da amostra registra a intensidade do raios-X como uma função do ângulo de espalhamento  $2\theta$ . A imagem do detector integrada revela uma curva que fornece informações sobre a amostra. Na parte inferior um esquema da geometria do vetor de espalhamento. Figura adaptada de (BARBOSA *et al.*, 2013). . . . . 42
- Figura 8 – Esquema ilustrando um exemplo de separação do lipídio POPC para o modelo SDP. A região da cabeça PC é dividida em carbonila-glicerol (CG), fosfato e parte da colina (PCN) e os demais componentes da colina ( $\text{CholCH}_3$ ). Já a cauda lipídica consiste nos grupos de hidrocarbonetos metileno ( $\text{CH}_2$ ), metil terminal ( $\text{CH}_3$ ) e metino ( $\text{CH}$ ). . . . . 44

Figura 9 – Diagrama de Jablonski simplificado. Os estados singletos são representados por S, onde S <sub>0</sub> é o fundamental e S <sub>1</sub> e S <sub>2</sub> os estados excitados. Os estados tripletos são representados por T, onde T <sub>1</sub> é o primeiro estado tripleto. Setas verticais para cima correspondem a absorção, e setas para baixo os processos de emissão. As setas onduladas representam alguns dos processos não radioativos denominados conversão interna, relaxação vibracional e cruzamento entre sistemas. Figura adaptada de (HEINE; MÜLLER-BUSCHBAUM, 2013). . . . .	50
Figura 10 – Esquema simplificado dos processos de supressão de fluorescência estático e dinâmico. Na supressão dinâmica, os fluoróforos (em rosa) absorvem a luz e vão para o estado excitado (em laranja), interagem com o agente supressor (em verde) e retornam ao estado fundamental sem emissão de fótons. Na supressão estática, o fluoróforo e o agente supressor formam um complexo no estado fundamental, e quando este complexo absorve luz, ele imediatamente retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton. . . . .	51
Figura 11 – Esquema ilustrando o funcionamento de um equipamento de DLS. De forma simplificada o processo é o seguinte: um laser passa por um atenuador e ilumina a cubeta com a amostra. A luz espalhada por essa amostra é detectada a um ângulo $\theta = 90^\circ$ por um detector de fótons. Esses dados são então analisados por um processador de sinal digital chamado correlator que, por sua vez, retorna uma função que fornece a informação sobre o tamanho das partículas do sistema estudado. Figura adaptada de (LEONG <i>et al.</i> , 2018). . . . .	56
Figura 12 – Representação esquemática das flutuações na intensidade de luz espalhada e as funções de autocorrelação correspondentes para partículas de tamanhos diferentes. Figura adaptada de (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). . . . .	57
Figura 13 – Representação esquemática da distribuição de carga em torno da superfície carregada de um lipossoma. A camada de Stern é composta por íons fortemente ligada à superfície carregada e a camada difusa uma região adjacente de íons móveis vagamente associados (LOMBARDO <i>et al.</i> , 2016). . . . .	58
Figura 14 – Esquema geral simplificado de um microscópio eletrônico de transmissão e de um grid utilizado para deposição das amostras. A esquerda a coluna do microscópio com seus componentes principais: a fonte de elétrons, as várias lentes que focalizam o feixe de elétrons, o guiam através da amostra e produzem ampliação e o sistema no qual a imagem da amostra é projetada. A direita uma ilustração do suporte de amostra (os grids) compostos por uma estrutura de suporte fina feita de cobre geralmente coberta com uma camada de formvar (um tipo de resina de polivinil) e uma fina película de carbono na qual a solução das partículas analisadas pode ser aplicada. Figura adaptada de (CZARNOCKI-CIECIURA; NOWOTNY, 2016). . . . .	61
Figura 15 – Curvas SAXS de PC:SM:CL (na razão 2:1:2) na presença de diferentes concentrações de líquido iônico [C <sub>14</sub> mim]Cl. Os pontos representam os dados experimentais e as linhas pretas o melhor ajuste obtido pela análise com modelo MSDP. As curvas foram multiplicadas por um fator 10 para melhor visualização dos dados. . . . .	66

Figura 16 – Exemplo de distribuição de probabilidade de volume $P_i(z)$ obtida no modelo MSDP com a indicação da espessura hidrofóbica da monocamada, $D_{hyd}$ , a espessura Luzzati, $D_B$ e o comprimento máximo da monocamada hidratada, $D$ . . . . .	67
Figura 17 – Densidades eletrônicas de grupos químicos obtidas pela análise de dados SAXS. Os códigos de cores correspondem a $CH_2$ (vermelho), $CH_3$ (laranja), cabeça polar (verde), colesterol (amarelo), cabeça polar do líquido iônico (roxo), $H_2O$ (azul). As curvas pretas representam a densidade de elétrons total $\rho$ do sistema. . . . .	69
Figura 18 – Densidades eletrônicas de grupos químicos obtidas pela análise de dados SAXS. Os códigos de cores correspondem a $CH_2$ (vermelho), $CH_3$ (laranja), cabeça polar (verde), colesterol (amarelo), cabeça polar do líquido iônico (roxo), $H_2O$ (azul). As curvas pretas representam a densidade de elétrons total $\rho$ do sistema. . . . .	70
Figura 19 – Parâmetros $x_{chol}$ , $f_{chol}$ e $w_{pol}$ obtidos pelo ajuste das curvas SAXS em função da concentrações de líquido iônico $[C_{14}mim]Cl$ . O $x_{chol}$ representa a proporção de colesterol nas moléculas de POPC, o $f_{chol}$ a posição das moléculas de colesterol na membrana e $w_{pol}$ está relacionado com o tamanho da cabeça polar dos lipídios POPC e esfingomiélinina. . . . .	72
Figura 20 – Espectros de emissão do fluoróforo $[PTS] = 0.17\mu M$ com diferentes concentrações do supressor metil viologênio (de cima para baixo $[MV] = 0mM, 2.10^{-4}mM, 2.10^{-3}, 5.10^{-3}mM, 8.10^{-3}mM, 2.10^{-2}mM, 8.10^{-2}mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM$ e $4mM$ ). A seta indica a direção de aumento da concentração do supressor MV. . . . .	74
Figura 21 – Gráfico com os valores de intensidade de fluorescência para o comprimento de onda $\lambda = 385nm$ em função das diferentes concentrações de metil viologênio. A curva vermelha representa o ajuste de uma exponencial. . . . .	75
Figura 22 – Gráfico da razão da intensidade de fluorescência na ausência ( $F_0$ ) e na presença de diferentes concentrações de MV ( $F$ ), em função da concentração do supressor MV, para o comprimento de onda $\lambda = 385nm$ . A curva vermelha representa o ajuste da função quadrática. O eixo $x$ está em escala logarítmica para facilitar a visualização do ajuste. . . . .	75
Figura 23 – Espectros de emissão das vesículas lipídicas a $0.2mM$ de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 encapsuladas com PTS ( $[PTS] = 1.10^{-2}mM$ ) em uma solução com $2mM$ de metil viologênio. Foram adicionados diferentes concentrações de $[C_{14}mim]Cl$ (de cima para baixo $0.2\mu M, 0.4\mu M, 0.6\mu M, 0.8\mu M, 1.0\mu M, 2.0\mu M, 4.0\mu M, 8.0\mu M, 20\mu M, 40\mu M, 60\mu M$ ). . . . .	76
Figura 24 – Valores do percentual de vazamento para as vesículas lipídicas a $0.2mM$ de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 para as diferentes concentrações de líquido iônico. As duas repetições realizadas são apresentadas. O eixo $x$ está em escala logarítmica para facilitar a visualização dos dados. . . . .	77
Figura 25 – Resultados obtidos no experimento de DLS para as vesículas lipídicas de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 para as diferentes concentrações do líquido iônico $[C_{14}mim]Cl$ . Em vermelho os valores dos diâmetros hidrodinâmicos e em azul os valores dos índices de polidispersão. . . . .	79
Figura 26 – Valores de potencial zeta para as vesículas lipídicas de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 para as diferentes concentrações do líquido iônico $[C_{14}mim]Cl$ . . . . .	80

Figura 27 – Micrografias dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomielina e colesterol, na concentração de $5mg/ml$ . . . . .	82
Figura 28 – Histogramas com a distribuição de tamanho das vesículas obtidos nas medidas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Na esquerda, os sistemas sem líquido iônico e na direita com líquido iônico. . . . .	83
Figura 29 – Micrografias obtidas com microscopia eletrônica dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomielina e colesterol, na concentração de $5mg/ml$ , com a adição de $10\%mol$ do líquido iônico $[C_{14}mim]Cl$ . . . . .	83
Figura 30 – Micrografias obtidas com crio-microscopia eletrônica dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomielina e colesterol na concentração de $8mg/ml$ . . . . .	84
Figura 31 – Histogramas com a distribuição de tamanho das vesículas obtidos nas medidas de crio-microscopia (Crio-EM). Na esquerda, os sistemas com líquido iônico e na direita sem líquido iônico. . . . .	85
Figura 32 – Micrografias obtidas com crio-microscopia eletrônica dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomielina e colesterol na concentração de $8mg/ml$ e com a adição de $10\%mol$ do líquido iônico $[C_{14}mim]Cl$ . . . . .	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Materiais utilizados nesse trabalho. . . . .	39
Tabela 2	–	Lista de todos os grupos químicos e seus respectivos volumes moleculares $v_i$ , pesos moleculares $M_i$ , números de elétrons $Z_i$ e número $n_i$ de moléculas na composições dos três lipídios investigados. O grupo CS representa a região inicial da ceramida e $C_n\text{mim}^+$ representa a cabeça polar do líquido iônico (KUCERKA; NAGLE <i>et al.</i> , 2008; SPINOZZI <i>et al.</i> , 2014). . . . .	49
Tabela 3	–	Lista de parâmetros obtidos para o lipídio POPC através da análise das curvas SAXS para as vesículas formadas por PC:SM:CHOL na presença de diferentes concentrações $x_{LI}$ do líquido iônico $[C_{14}\text{mim}]\text{Cl}$ . A unidade de comprimento é Å. . . . .	68
Tabela 4	–	Lista de parâmetros obtidos para o lipídio esfingomielina através da análise das curvas SAXS para as vesículas formadas por PC:SM:CHOL na presença de diferentes concentrações $x_{LI}$ do líquido iônico $[C_{14}\text{mim}]\text{Cl}$ . A unidade de comprimento é Å. . . . .	68





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$T_m$	temperatura de transição de fase
[C14min]Cl	cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio
API-ILs	active pharmaceutical ingredient - ionic liquids
APIs	active pharmaceutical ingredients
CHOL	colesterol
CMC	concentração micelar crítica
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
Crio-EM	crio-microscopia eletrônica
DLS	espalhamento dinâmico de luz
GUVs	vesículas unilamelares gigantes
ICB	Instituto de Biociências
LIs	Líquidos Iônicos
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
LUVs	vesículas unilamelares grandes
MSDP	Modified Scattering Density Profile
MV	metil viologênio
PDI	índice de polidispersão
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PTS	1,3,6,8 pireno tetrasulfonato de sódio
SAXS	espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SM	esfingomiéline
SPD	Scattering Density Profile
SUVs	vesículas unilamelares pequenas
TEM	microscopia eletrônica de transmissão



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>1.1</b>	<b>Líquidos iônicos</b>	<b>23</b>
<b>1.2</b>	<b>Moléculas anfifílicas</b>	<b>27</b>
<b>1.3</b>	<b>Sistemas biomiméticos de membranas</b>	<b>29</b>
<b>1.4</b>	<b>A influência de líquidos iônicos em sistemas biológicos</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>37</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Protocolo de preparação de amostras</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Métodos</b>	<b>41</b>
3.3.1	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo	41
3.3.2	Espectroscopia de Fluorescência	49
3.3.2.1	Supressão de fluorescência	51
3.3.2.1.1	<i>Aplicação de supressão de fluorescência em membranas</i>	<i>54</i>
3.3.3	Espalhamento de Luz Dinâmico	55
3.3.4	Potencial Zeta	57
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Crio-EM	60
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Espalhamento de raios-X a baixos ângulos</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Espectroscopia de fluorescência - Supressão de Fluorescência</b>	<b>73</b>
<b>4.3</b>	<b>Espalhamento de Luz Dinâmico</b>	<b>78</b>
<b>4.4</b>	<b>Potencial Zeta</b>	<b>79</b>
<b>4.5</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão e Crio-EM</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>91</b>



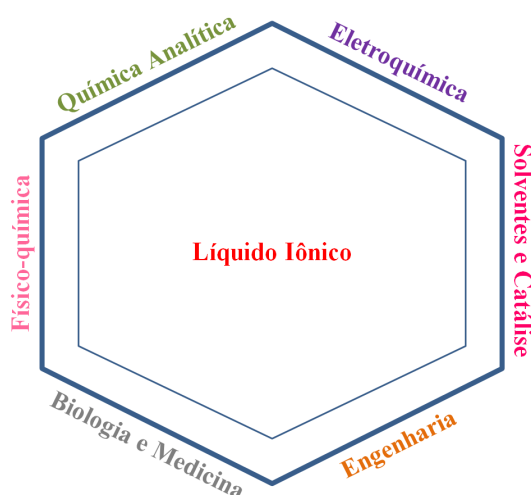
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Líquidos Iônicos

Nas últimas décadas, a procura por tecnologias industriais e acadêmicas mais limpas tem aumentado bastante em decorrência dos problemas e preocupações ambientais (MARCO *et al.*, 2019). Um dos principais focos dessa busca por ações ambientalmente favoráveis se baseiam na minimização do uso de substâncias tóxicas em processos e análises químicas, bem como na redução de resíduos gerados por esses processos. Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente é conhecido como Química Verde, do inglês "*Green Chemistry*" (MARCO *et al.*, 2019; VALEUR, 2001b).

Uma das áreas mais ativas da Química Verde é o desenvolvimento de metodologias analíticas denominada Química Analítica Verde (ARMENTA *et al.*, 2019). Novos métodos e técnicas capazes de reduzir o uso e a geração de substâncias perigosas em todas as etapas da análise química levaram ao design e uso de novos solventes para substituir os solventes orgânicos convencionais, caracterizados por sua alta volatilidade, inflamabilidade e toxicidade (PACHECO-FERNÁNDEZ; PINO, 2019). E é nesse contexto que encontramos os Líquidos Iônicos (LIs), sais iônicos formados por um cátion orgânico e uma variedade de ânions inorgânicos ou orgânicos, que se encontram na forma líquida em temperaturas abaixo de 100°C (WASSERSCHEID; WELTON, 2008).

Os líquidos iônicos podem variar em sua estrutura, natureza e tamanho, devido as inúmeras combinações de cátions e ânions que atendem à definição de LIs. Essa ampla variedade de associações leva a um conjunto diversificado de propriedades específicas facilmente ajustáveis, ampliando os campos de atuação desses compostos, como ilustrado na Figura 1 (KAR *et al.*, 2019; BORODIN, 2009). No entanto, é importante ressaltar que os cátions e ânions devem ser precisamente escolhidos para desestabilizar a formação de uma fase sólida, desfavorecendo o processo de cristalização e induzindo a permanência no estado líquido (PAUL; MOULIK, 2015). A Figura 2 mostra alguns cátions e ânions comuns descritos na literatura.

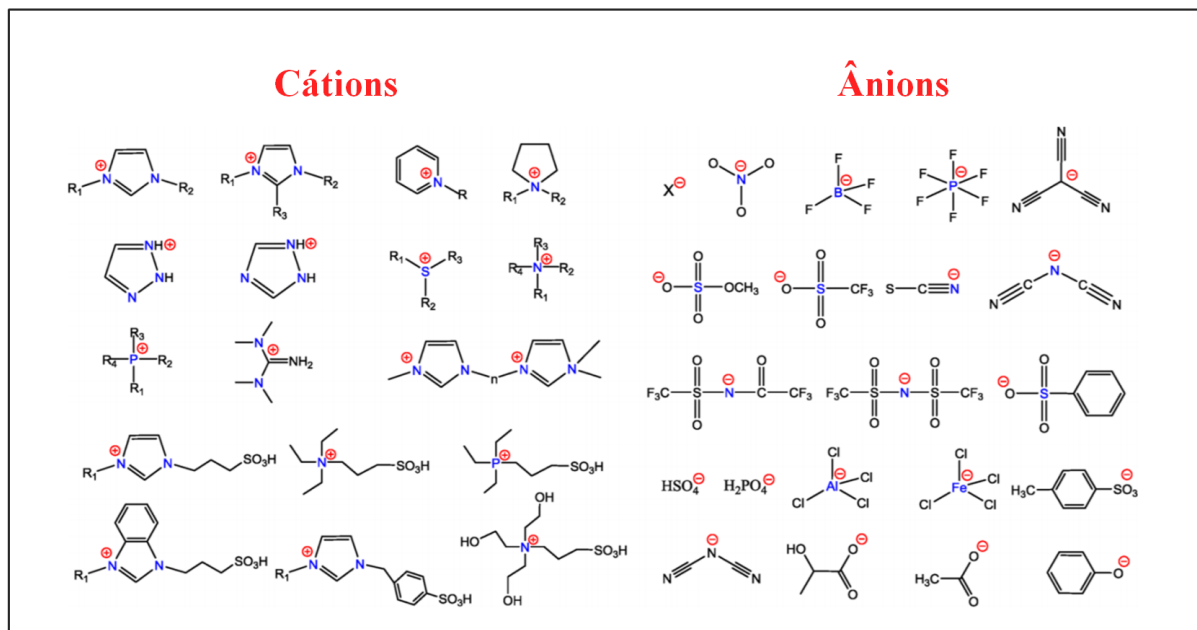


**Figura 1** – Diferentes campos de aplicação dos líquidos iônicos. Figura adaptada de (VEKARIYA, 2017).

Como consequência da ampliação de suas áreas de aplicação, as publicações sobre LIs cresceram exponencialmente (LEI *et al.*, 2017). A utilização de líquidos iônicos como meio reacional vem sendo considerado ecologicamente aceitável devido a importante vantagem de suas características iônicas, como uma alta condutividade, elevada densidade, baixa pressão de vapor e estabilidade eletroquímica e térmica (ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, através da seleção correta de ânions e cátions é possível ajustar algumas propriedades físicas como polaridade, hidrofobia, densidade e viscosidade dos LIs (SHELDON, 2005; BERTHOD; RUIZ-ANGEL; CARDA-BROCH, 2008; ZHANG *et al.*, 2017).

Essas propriedades fazem dos LIs uma escolha atraente de solvente em muitos processos químicos importantes, como catálise, biocatálise, química sintética e eletroquímica (PÂRVULESCU; HARDACRE, 2007; RANTWIJK; SHELDON, 2007; LAFUENTE *et al.*, 2016; WEI; IVASKA, 2008). Além do mais, os líquidos iônicos também vem sendo amplamente utilizado na engenharia como lubrificantes (AMIRIL; RAHIM; SYAHRULLAIL, 2017), agentes dispersantes (LE *et al.*, 2016) e também sensores biológicos (WANG *et al.*, 2014).

Além das características físicas e químicas dos líquidos iônicos, sua alta atividade biológica vem atraindo atenção significativa de bioquímicos, ecologistas e cientistas médicos (EGOROVA; GORDEEV; ANANIKOV, 2017). Devido às suas propriedades antimicrobianas e citotóxicas, seu potencial emprego em indústrias farmacêuticas e biomédicas, como



**Figura 2** – Estruturas químicas dos cátions e ânions típicos dos líquidos iônicos.  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  representam diferentes radicais, o mais comum é o substituinte alquil  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  com  $(n = 1, 3, 5, \dots)$ .  $X^-$  representa os haletos cloro (Cl), bromo (Br) e iodo (I). Existem muitas outras opções disponíveis. Figura adaptada de (DONG et al., 2017).

sistemas de síntese e administração de fármacos, é uma via extremamente promissora e ampla que pode fornecer respostas para alguns dos desafios industriais farmacêuticos da atualidade (MARRUCHO; BRANCO; REBELO, 2014; SHAMSHINA *et al.*, 2018; EGOROVA; ANANIKOV, 2018; MCQUEEN; LAI, 2019).

Sabe-se que a eficiência de um medicamento depende de sua biodisponibilidade, a qual, no caso do organismo humano, está diretamente relacionada à permeabilidade e solubilidade do medicamento (EGOROVA; GORDEEV; ANANIKOV, 2017). A solubilidade limitada em água e a baixa taxa de dissolução estão entre os principais problemas do desenvolvimento de medicamentos modernos (MARRUCHO; BRANCO; REBELO, 2014). Além do mais, as substâncias farmacêuticas são frequentemente obtidas na forma de cristais que podem ser convertidos em diferentes formas polimórficas durante os processos de obtenção, produção, armazenamento e transporte, podendo apresentar alterações em suas propriedades e com isso, consequências indesejáveis (HUANG *et al.*, 2019). Isso leva a outra complicação: polimorfismo. Assim, um produto químico cristalino pode existir como vários polimorfos ou pseudo polimorfos com propriedades diferentes, por exemplo,

características mecânicas, estabilidade, ponto de fusão, solubilidade e biodisponibilidade (BERNSTEIN, 2020).

Esses problemas farmacêuticos críticos dificultam severamente a eficácia de importantes drogas comercialmente disponíveis. Visando melhorar o desempenho desses fármacos, vem se utilizando os líquidos iônicos para formular ingredientes farmacêuticos ativos, do inglês *active pharmaceutical ingredients (APIs)*, em uma forma líquida iônica (*active pharmaceutical ingredient - ionic liquids (API-ILs)*) que se encontram na forma líquida à temperatura ambiente, resolvendo o problema do poliformismo e aumentando também a biodisponibilidade dessas substâncias (EGOROVA; GORDEEV; ANANIKOV, 2017; SHAMSHINA *et al.*, 2018). Além das API-ILs, outras aplicações possíveis de LIs na pesquisa e desenvolvimento de drogas incluem seu emprego como agentes para o aprimoramento da solubilidade e *drug-delivery* (ADAWIYAH *et al.*, 2016; EGOROVA; ANANIKOV, 2018).

Ainda nesse contexto, alguns estudos mostraram que os LIs são capazes de extrair, purificar e até mesmo armazenar DNA à temperatura ambiente, bem como podem auxiliar ou prevenir a amiloidogênese proteica, e em alguns casos até retornar as fibras amiloides em proteínas funcionais (CLARK *et al.*, 2016; TAKEKIYO; YOSHIMURA, 2018; BOWERS *et al.*, 2019).

A introdução desses compostos nos processos industriais, juntamente com seu caráter orgânico, motivaram os primeiros estudos de sua interação com biomoléculas e organismos vivos (PETKOVIC *et al.*, 2011). Esses estudos destacaram a toxicidade em organismos vivos, mostrando a alta afinidade entre LIs e biosistemas. Essa afinidade, juntamente com a variedade de LIs, é a base para o futuro das aplicações da farmacologia, biomedicina e bionanotecnologia (BENEDETTO, 2017). Apenas uma compreensão completa desses mecanismos microscópicos da toxicidade pode fornecer embasamento para a síntese de LIs mais verdes, evitando os impactos que podem ocorrer com o seu uso, como por exemplo, a contaminação de ecossistemas (YOO *et al.*, 2014; RANKE *et al.*, 2007).

Como na grande maioria dos casos, o primeiro encontro de qualquer agente químico xenobiótico com uma célula viva ocorre pela membrana plasmática, analisar a interação dos LIs com biomembranas combina os dois objetivos originais dessas investigações de



toxicidade: avaliar e reduzir a citotoxicidade dos LIs, e desenvolver novas bionanotecnologias (BENEDETTO, 2017).

## 1.2 Moléculas anfifílicas

Molécula anfifílica é um termo geral que descreve qualquer molécula composta por duas regiões com afinidades diferentes para o solvente: uma região com uma alta afinidade por solventes polares (como a água) e a outra com uma forte afinidade por solventes não polares como hidrocarbonetos, éteres e esteres (TANFORD, 1980; ISRAELACHVILI, J., 1985).

Quando estão em solução, a fim de minimizar as interações com solventes, essas moléculas se auto organizam em estruturas bem definidas, dependendo do tamanho e forma do grupo hidrofílico da cabeça e das caudas hidrofóbicas (TANFORD, 1980). Esse processo ocorre porque a água tende a maximizar o contato com o região hidrofílica das moléculas através de ligações de hidrogênio, enquanto ocorre o contrário para a parte hidrofóbica. Então, em concentrações relativamente baixas, as moléculas anfipáticas em solução se concentram principalmente na interface ar/água, e a partir de uma dada concentração, as moléculas tendem a se auto associar em estruturas mais complexas com composições e organizações definidas, buscando minimizar o contato com as moléculas de água (ISRAELACHVILI, Jacob N, 2015).

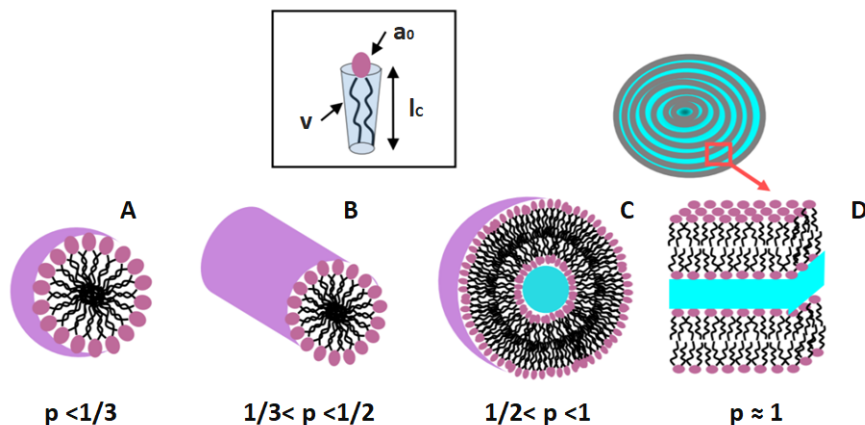
Existe um valor específico de concentração a partir do qual as moléculas se auto-agrupam em micelas ou outros agregados. Essa concentração é conhecida como concentração micelar crítica (CMC) e depende de vários fatores intrínsecos como, o tamanho da região hidrofóbica, o volume molecular das regiões hidrofóbica e hidrofílica, pH, força iônica, temperatura, entre outras (ISRAELACHVILI, J., 1985).

Por sua vez, a forma e o tamanho de um determinado agregado dependem da geometria molecular de suas moléculas anfifílicas e das condições da solução, como concentração das moléculas, temperatura, pH e força iônica (LOMBARDO *et al.*, 2016). Uma estimativa preliminar do tipo de estrutura formada na auto associação pode ser feita observando o parâmetro crítico de empacotamento  $p$  definido pela Equação (1), onde  $v$

é o volume efetivo da porção hidrofóbica da molécula,  $a_0$  e  $l_C$  são, respectivamente, a área de superfície efetiva do grupo principal hidrofílico e o comprimento efetivo máximo (comprimento crítico) da cadeia hidrofóbica (DEGIORGIO; CORTI, 1985).

$$p = \frac{v}{a_0 l_C} \quad (1)$$

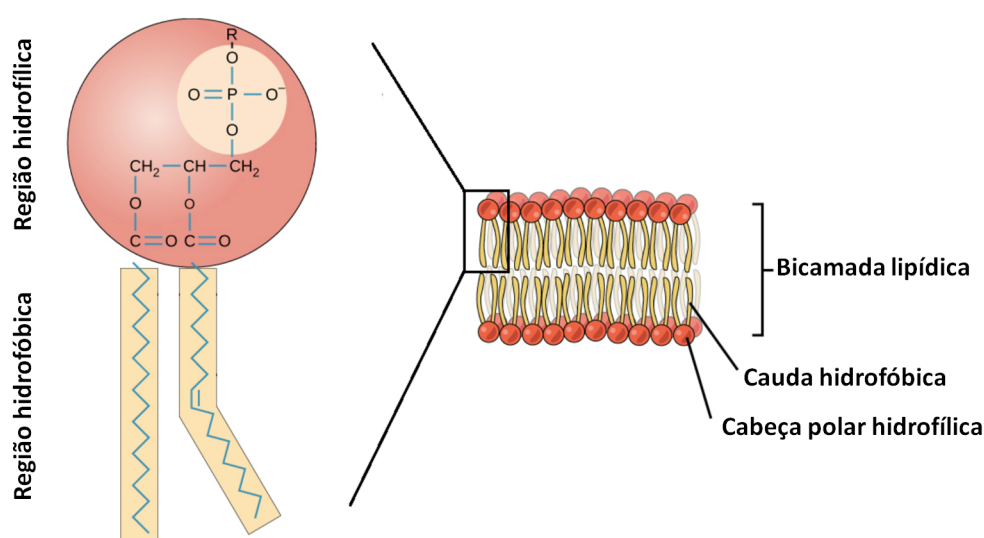
A relação do parâmetro crítico de empacotamento e a forma do agregado é bem estabelecido e pode ser resumido como relatado na Figura 3 (WHITE; KING, 1985). Com o incremento do valor  $p$ , a estrutura dos agregados pode variar de micelas esféricas ( $p < 1/3$ ), a micelas cilíndricas ( $1/3 < p < 1/2$ ), vesículas ( $1/2 < p < 1$ ) e estruturas lamelares ( $p = 1$ ). Para valores maiores do parâmetro crítico de empacotamento, as moléculas serão organizadas em estruturas reversas (por exemplo, micelas reversas) (DEGIORGIO; CORTI, 1985).



**Figura 3** – Esquema simplificado das estruturas formadas por moléculas anfifílicas em solução. Essas estruturas podem ser previstas a partir do parâmetro crítico de empacotamento  $p$ , que depende do volume  $v$  e comprimento  $l_C$  efetivos da parte hidrofóbica e da área de superfície  $A$  efetiva do grupo hidrofílico. Figura adaptada de (LOMBARDO et al., 2016).

Estruturas auto organizadas desempenham papéis importantes em muitos campos, como em sistemas de membranas biológicas, detergência e administração de medicamentos, por isso foram extensivamente estudadas por muitos anos. Surfactantes, alguns polímeros e os fosfolipídicos, são exemplos típicos de moléculas anfifílicas (GUERIN; SZLEIFER, 1999). Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares e quando

dispersos na água, se agregam espontaneamente em bicamadas que se fecham sobre si (BARBA-BON; NILAM; HENNIG, 2020). Os grupos polares da cabeça dos lipídios são orientados em direção às moléculas de água circundantes e as caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas se associam para formar uma camada hidrofóbica interna como ilustrado na Figura 4. Essas estruturas são denominadas lipossomas ou vesículas, e se assemelham as estruturas que formam as membranas biológicas, por isso são usadas para simular a membrana celular em estudos científicos (BLUME, 1993).



**Figura 4** – Estrutura esquemática de um fosfolípido e da sua organização em bicamadas. Na esquerda, a esquematização da estrutura química do fosfolípido e as regiões hidrofílica e hidrofóbica. Na direita, o esboço simplificado da organização da bicamada. Figura adaptada de: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/membranes-and-transport/passive-transport/a/diffusion-and-passive-transport>.

### 1.3 Sistemas biomiméticos de membranas

Biomembranas são estruturas biológicas complexas formadas principalmente por lipídios e algumas proteínas e representam a interface de contato da célula com o meio exterior, contribuindo para manter constante o meio intracelular, e sendo portanto, essenciais para os seres vivos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Como são alvo de vários antibióticos, uma vez que pequenas modificações na sua estrutura, sua cinética ou em suas propriedades elásticas podem afetar drasticamente a estabilidade e a viabilidade das

células, as biomembranas são um dos principais e mais amplos objetos de estudos da literatura (BENEDETTO, 2017).

Atualmente, o modelo mais aceito para a organização da membrana celular é o chamado modelo do mosaico fluído proposto por Singer e Nicolson (1972), onde os fosfolipídios formam uma estrutura planar (uma bicamada fosfolipídica) e as proteínas e glicolipídios estão inseridos nesse “mar de lipídios” (SINGER; NICOLSON, 1972). Alguns refinamentos foram adicionados com base em pesquisas adicionais, como a introdução de curvatura da membrana, a formação de poros e os domínios de membrana, aumentando a complexidade do modelo (GOÑI, 2014).

Além dos fosfolipídios, existe outros tipos de lípidos presentes na membrana celular: os esfingolipídios e os esteróis (SOMERHARJU; VIRTANEN; CHENG, 1999). Os esfingolipídios, como a esfingomiélna e os glicosfingolipídios, são outra classe de lípidos estruturais que possuem o mesmo comportamento dos fosfolipídios quando em solução aquosa. Já os esteróis, como o colesterol e o ergosterol, são os principais lípidos não polares das membranas celulares e sua concentração está relacionada com propriedades como a fluidez e permeabilidade das membranas. (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

Como a composição lipídica de cada biomembrana pode ser muito heterogênea – podendo até ser formada por mais do que 200 tipos diferentes de lípidos – lipossomas são comumente usados como um sistema biomimético para simular a membrana celular e simplificar a sua complexidade em estudos científicos (CEVC; MARSH, 1987; LEHNINGER; NELSON; COX, 1993). Tal simplificação pode ajudar a compreender as características moleculares e os mecanismos das células e organelas (CEVC; MARSH, 1987; CEVC, 1993).

Como mencionado anteriormente, os lípidos que formam as lipossomas são moléculas anfifílicas com uma região hidrofílica chamada de cabeça polar e uma região hidrofóbica, geralmente composta por cadeias alquílicas (PATRA *et al.*, 2012). A cabeça polar pode ser carregada negativamente (lípidos aniônicos) ou possuir carga negativa e positiva, formando um dipolo elétrico (lípidos zwitteriônicos). Já a cauda hidrofóbica pode apresentar diferenças estruturais tanto no comprimento, devido o número de grupos metileno, quanto na ausência ou presença de insaturações ao longo da cadeia alquílica (CEVC; MARSH, 1987; CEVC, 1993). Essas distinções nas caudas são importantes porque interferem na

fluidez da membrana e junto com a composição lipídica e a temperatura influenciam fortemente as configurações moleculares dos lipídios nas bicamadas (BARBA-BON; NILAM; HENNIG, 2020)

Dependendo da temperatura, os lipídios podem estar organizados em uma fase gel, também chamada de sólido ordenada (so) ou  $L_\beta$ , ou em uma fase fluida, também conhecida como líquido desordenada (ld) ou  $L_\alpha$ . Na fase gel as caudas hidrofóbicas estão bem compactadas, levando a uma baixa mobilidade lateral dos fosfolipídios, e na fase fluida as moléculas estão menos compactas, aumentando a mobilidade lateral (ZALBA; HAGEN, 2017). A temperatura na qual os lípidos passam da fase gel para fluida é conhecida como temperatura de transição de fase ( $T_m$ ), e seu valor varia de acordo com o tamanho da cauda de hidrocarbonetos, o grau de saturação, a carga e o tipo da cabeça polar. Conforme o comprimento da cauda de hidrocarbonetos aumenta as interações se tornam mais fortes exigindo uma maior energia para interromper o empacotamento ordenado, portanto, a temperatura de transição de fase aumenta. Da mesma forma, a introdução de uma ligação dupla nas caudas hidrofóbicas coloca uma dobra na cadeia que dificulta o empacotamento e então são requeridas temperaturas muito mais baixas para atingir a fase fluida (MARSH, 2010). Por exemplo, para fosfolipídios com insaturação na cauda o valor,  $T_m$  é geralmente muito baixo (para o lipídio POPC,  $T_m = -2^\circ C$ ), já para os fosfolipídios com cadeias saturadas as temperaturas são maiores (para o lipídio DPPC,  $T_m = 41^\circ C$ ) (BARBA-BON; NILAM; HENNIG, 2020).

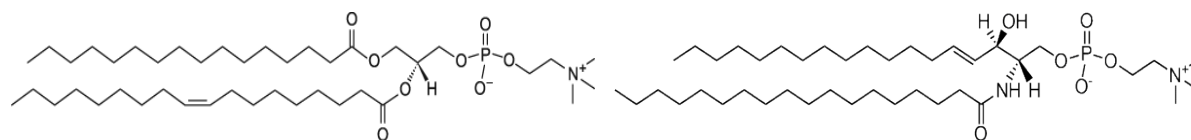
Na presença de colesterol uma terceira fase se forma, fase líquido ordenada (lo), onde as moléculas de colesterol se orientam na bicamada com seus grupos hidroxila próximos aos grupos da cabeça polar das moléculas de fosfolipídios, diminuindo a mobilidade da cadeia de hidrocarbonetos nessa região (BARBA-BON; NILAM; HENNIG, 2020). Consequentemente, a fase líquido ordenada é menos fluida em comparação com a fase líquido desordenada, mas não tão compactada quanto a fase gel. Em altas concentrações (em torno de  $20mol\%$  a  $40mol\%$ ), o colesterol também impede que as caudas hidrofóbicas se aproximem e cristalizem, de modo que a fase líquido ordenada é predominante, enquanto que para baixas concentrações de colesterol, a fase líquido ordenada coexiste com a sólido ordenada e líquido desordenada (ZALBA; HAGEN, 2017; QUINN; WOLF, 2009).

Como mencionado, a saturação dos lipídios também está relacionada com o empacotamento e na fluidez da membrana. Os lipídios saturados favorecem o empacotamento ordenado das membranas, conferindo uma membrana mais rígida e organizada. Os lipídios insaturados têm pelo menos uma ligação dupla, o que causa uma torção na cadeia hidrofóbica e impede um maior empacotamento. Assim, lipídios insaturados diminuem a aproximação dos lipídios na membrana e, conseqüentemente, aumentam a fluidez (TURK; CHAPKIN, 2013; WASSALL *et al.*, 2004).

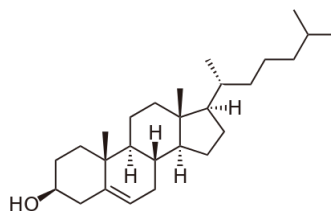
Além disso, uma membrana contém áreas que apresentam um enriquecimento em certos lipídios, chamados domínios, que possuem importantes contribuições para as propriedades, organização e funcionalidades da membrana. Um dos principais domínios lipídicos são os rafts lipídicos, formações com maior grau de ordenação e menor fluidez comparadas ao ambiente da bicamada onde se encontram, que possuem tamanho nanométrico (10–200nm), estão localizados na membrana externa e são tipicamente ricas em esfingolipídios e colesterol (NICOLSON, 2014).

Um dos sistemas modelos com formação dos rafts melhor estudado é a mistura ternária de esfingolipídios, fosfatidilcolinas insaturadas (PC) e colesterol (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008; BUNGE *et al.*, 2008). Os diagramas de fases das membranas contendo esses três componentes foram muito investigados experimentalmente e teoricamente, porque além de serem componentes essenciais dos rafts, ocorrem em grandes quantidades nas membranas das células, sendo ideais para modelar a camada externa das membranas celulares eucarióticas (FRAZIER *et al.*, 2007). Uma mistura candidata para esse sistema ternário seria o sistema com os lipídios esfingomiéline, palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e o colesterol. Essa mistura inclui um lipídio que forma uma fase ordenada na água à temperatura ambiente (esfingomiéline), um que forma uma fase fluida na água (POPC) e o colesterol, espécie química mais abundantes em membranas plasmáticas de mamíferos (FEIGENSON; BUBOLTZ, 2001; FRAZIER *et al.*, 2007). Por esse motivo, nesse trabalho utilizou-se vesículas compostas por esse sistema de POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), esfingomiéline e colesterol. As estruturas químicas desses lipídios são apresentadas na Figura 5.

Além da composição lipídica, outra característica importante das vesículas é o



(a) Esquema da estrutura química do POPC. (b) Esquema da estrutura química da esfingomielina (SM).



(c) Esquema da estrutura química do colesterol (CHOL).

**Figura 5** – Estrutura química dos lipídios utilizados neste trabalho. Figura disponível em: <https://avantilipids.com/>.

seu formato. Elas podem ser de dois tipos: várias bicamadas concêntricas separadas por uma pequena camada de água, denominadas vesículas multilamelares (MLV), ou somente uma bicamada fosfolipídica, denominadas vesículas unilamelares (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). As vesículas unilamelares são categorizadas pelo seu diâmetro externo sendo: vesículas unilamelares pequenas (SUVs), com diâmetros  $< 100nm$ , vesículas unilamelares grandes (LUVs), com diâmetros  $100 - 1000nm$ , ou vesículas unilamelares gigantes (GUVs), com diâmetros  $> 1\mu m$  (LOMBARDO *et al.*, 2016). No presente estudo focalizou-se nas LUVs e o protocolo utilizado para a sua preparação será descrito no capítulo Capítulo 3.

#### 1.4 A influência de líquidos iônicos em sistemas biológicos

Na literatura já tem-se conhecimento que os LIs funcionalizados com cadeias alquílicas exibem um comportamento semelhante aos surfactantes, incluindo a formação de micelas acima da concentração micelar crítica (CMC), e seus mecanismos de toxicidade com sistemas biológicos são provavelmente causados por esse tipo comportamento (YOO *et al.*, 2014; GAL *et al.*, 2012). Além disso, de acordo com Stolte *et al.* (2007), os efeitos biológicos de alguns tipos de LIs estão correlacionados a lipofilicidade dos seus pares

de íons – habilidade de um composto químico dissolver-se em gordura – e o sistema de membrana dos organismos é provavelmente o alvo principal da sua ação tóxica.

Jeong *et al.* (2012) mostrou que os LIs podem incorporar em membranas de DMPC dependendo do comprimento de suas cadeias alquílicas, e penetrar na vesícula induzindo desordem e causando sua destruição. El Khoury e Patra (2013) evidenciaram que a presença de LIs de cadeias mais longas desloca a temperatura de transição de fase do DMPC para valores menores na medida em que sua concentração molar aumenta, e que apesar dos LIs de cadeia mais curta não alterarem de forma tão significativa a temperatura da transição de fase dos lipídios, eles a alargam, fazendo com que esta transição seja bem menos cooperativa em relação à transição na ausência dos LIs.

Simulações de dinâmica molecular indicam que os cátions dos líquidos iônicos tendem a se inserir espontaneamente na bicamada lipídica – devido principalmente a atração coulombiana da carga positiva do cátion com os grupos carregados negativamente na região da cabeça lipídica – e podem alterar a rugosidade da superfície da bicamada lipídica, podendo ser um precursor do seu rompimento (YOO *et al.*, 2014; BENEDETTO; BINGHAM; BALLONE, 2015). Notou-se também que os LIs podem diminuir a espessura da bicamada e alterar o coeficiente de difusão das moléculas de água e dos lipídios (BENEDETTO; BINGHAM; BALLONE, 2015).

De modo geral, percebeu-se que quanto maior o comprimento da cadeia de alquílica dos cátions, maior a toxicidade dos LIs, e que as propriedades catiônicas têm um efeito maior sobre toxicidade do que sobre propriedades aniônicas (COULING *et al.*, 2006). Entretanto, alguns resultados sugerem que as bicamadas fosfolipídicas podem manter sua estrutura mesmo em contato com alguns líquidos iônicos à temperatura ambiente, particularmente aqueles que são constituídos por cátions de imidazólio de cadeia curta (EVANS, 2006).

Os líquidos iônicos também podem se comportar como agentes antimicrobianos – dependendo do ânion a partir do qual foram funcionalizados e sua miscibilidade em água – pois possuem efeitos inibitórios substanciais no crescimento de determinados microrganismos, como bactérias (DOCHERTY; KULPA JR, 2005; GANSKE; BORNSCHEUER, 2006).

Na maior parte dos casos, as semelhanças entre os fosfolipídios das membranas



e LIs são certamente responsáveis por sua afinidade mútua, porém devido às diferenças químicas das composições de ambos, não se pode afirmar isso como via de regra e estudos caso a caso são necessários. Ainda existe uma lacuna na literatura atual que necessita de uma melhor caracterização físico-química e sistemática da interação dos LIs com sistemas vesiculares mais similares ao sistema natural. Nesse contexto, o presente projeto foi desenvolvido para estudar a interação do líquido iônico *cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio* ( $[C_{14}mim]Cl$ ) com sistemas biomiméticos de membranas. Desta forma, estudou-se vesículas de composição ternária formadas por diferentes lipídios: *1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC)*, esfingomiéline (SM) e colesterol (CHOL) na proporção 2:1:2 para simular, em uma primeira aproximação, a membrana biológica de eritrócitos e obter maiores informações acerca da toxicidade desse LI com as biomembranas. O líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$  foi escolhido porque sua caracterização com diferentes sistemas tem sido amplamente estudado no grupo de pesquisa no qual este trabalho foi desenvolvido.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a influência do *cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio* ( $[C14min]Cl$ ) nas propriedades estruturais de sistemas biomiméticos de membrana compostos por POPC, esfingomiéline e colesterol na proporção 2:1:2 para simular a membrana biológica de eritrócitos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Estudar a interação do líquido iônico com a bicamada lipídica por meio da avaliação de algumas propriedades físico-químicas do sistema e realização dos seguintes experimentos:

- Obter os parâmetros estruturais das lipossomas e a possível localização dos líquidos iônicos na bicamada por meio das medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS);
- Averiguar se o líquido iônico consegue se inserir na bicamada lipídica e ocasionar a sua ruptura e/ou formação de poros, pelas medidas de supressão de fluorescência;
- Observar a estrutura do sistema e como moléculas interagem umas com as outras por meio da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e crio-microscopia eletrônica (Crio-EM);
- Controlar o tamanho das vesículas lipídicas e verificar a influência do LI sua carga superficial com medições de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta;



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Todos os materiais utilizados nesse estudos estão listados na Tabela 1 com suas respectivas especificações e códigos de referência.

**Tabela 1** – *Materiais utilizados nesse trabalho.*

Produto	Fabricante	Código	Pureza	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )
POPC	Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids	850457P	≥ 99	760.076
Esfingomielina	Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids	860062P	≥ 99	731.081
Colesterol	Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids	700100P	≥ 99	386.654
[C <sub>14</sub> mim][Cl]	Io-Li-Tec <sup>®</sup>	IL-0141	≥ 98	314.9
PTS	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	82658	≥ 98	610.43
Metil viologênio	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	856177	≥ 98	257.16

Os lipídios utilizados foram: *1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina* (POPC), esfingomielina (SM) e colesterol (CHOL). Todos adquiridos da empresa Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids e utilizados sem purificações adicionais. No processo de preparação das amostras tomou-se precauções especiais para proteger os produtos contra oxidação e hidrólise, usando apenas amostras feitas na hora.

O líquido iônico *1-tetradecil-3-metilimidazólio cloreto* ([C<sub>14</sub>mim]Cl) foi obtido da empresa Io-Li-Tec<sup>®</sup>. Já a sonda *1,3,6,8 pireno tetrasulfonato de sódio* (PTS) e o seu supressor *1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio* (metil viologênio (MV)) são do fabricante Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

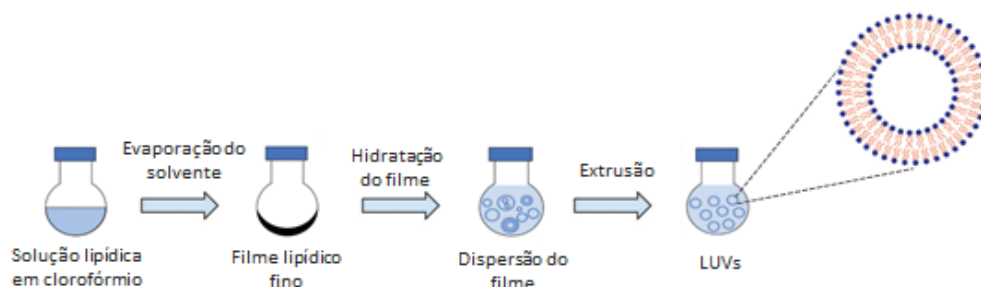
#### 3.2 Protocolo de preparação de amostras

As lipossomas foram preparadas seguindo o método de hidratação do filme descrito em Samad, Sultana e Aqil (2007). Esse protocolo é baseado na solubilização dos lipídios em clorofórmio para a formação de um filme lipídico. A concentração total de lipídio variou entre 0.5mM – 10mM, dependendo da técnica experimental empregada.

Como mencionado anteriormente, neste trabalho utilizou-se vesículas unilamelares grandes (LUVs). Para a sua preparação, dissolveu-se os lipídios em clorofórmio na quantidade desejada para a obtenção de uma solução estoque. Depois, alíquotas dessa solução

estoque foram secadas em um tubo de ensaio por um fluxo contínuo de  $N_2$  ultrapuro, para a evaporação do clorofórmio presente. Com isso, um filme lipídico formou-se nos tubos de ensaio, e para garantir que não houvesse resíduo do solvente, esses filmes foram colocados por 2h em um dessecador sob baixa pressão para evaporação completa do solvente.

A seguir as amostras foram hidratadas com água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> sob temperaturas maiores que a temperatura de transição dos lipídios  $T_M$  e submetidas ao vórtex. Para induzir a formação de lipossomas unilamelares e controlar os seus tamanhos, todas as amostras foram extrusadas pelo menos 31 vezes – também a temperaturas maiores que  $T_M$  – utilizando filtros de polycarbonato com poros no tamanho de  $100nm$ . O processo de extrusão foi realizado em um sistema automatizado desenvolvido pelo técnico do Laboratório de Biosistemas do Instituto de Física (IFUSP). A Figura 6 ilustra resumidamente todo esse processo de preparação.



**Figura 6** – *Ilustração simplificada da formação das lipossomas pelo método de hidratação do filme. O passo de extrusão promove a formação de lipossomas unilamelares de tamanho uniforme. As vesículas utilizadas neste trabalho foram extrudadas 31 vezes através de um filtro de polycarbonato (tamanho dos poros de  $100nm$ ) em um sistema automatizado. Figura adaptada de (SEJWAL et al., 2017).*

Por outro lado, para preparar a solução estoque do líquido iônico o processo foi mais simples. O líquido iônico foi adicionado a água ultra pura e agitado no vórtex até sua total dissolução, e então foi adicionado na concentração desejada nas amostras de lipossomas extrusadas.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo

A técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, do inglês *Small Angle X-Ray Scattering (SAXS)*, é uma ferramenta muito útil no estudo de sistemas macromoleculares, como proteínas e vesículas. (BARBOSA *et al.*, 2013).

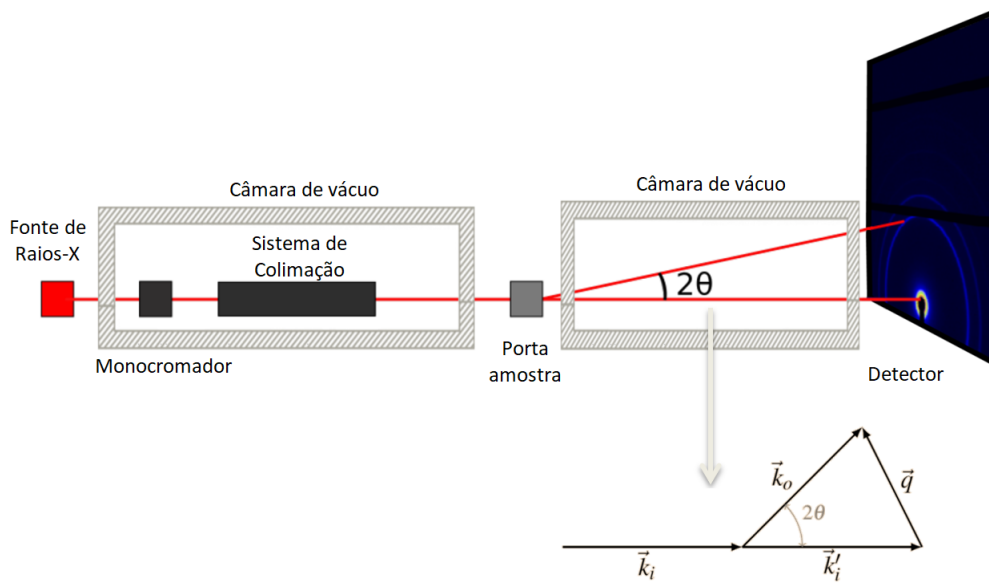
O experimento SAXS consiste na iluminação de uma amostra por um feixe monocromático de raios-X (comprimento de onda típico  $\lambda \sim 0.1nm$ ), e então um detector registra a radiação dispersada pela amostra como função do ângulo de dispersão  $2\theta$  (normalmente de  $0.01^\circ$  a  $5^\circ$ ). Se a amostra consistir em partículas ou agregados dispersos em uma solução homogênea, a intensidade espalhada nessas regiões angulares contém informações sobre a forma, tamanho e interações das partículas dispersas (BARBOSA *et al.*, 2013). Um esquema simplificado do experimento é apresentado na Figura 7.

O parâmetro relevante para analisar esse espalhamento é a transferência de momento ou vetor de espalhamento  $\vec{q}$ , definido na Equação (2) como a diferença entre o vetor da onda incidente  $\vec{k}_0$  e o vetor da onda espalhado  $\vec{k}_1$ . Esse vetor possui valores entre  $q_{min} = 0.02\text{\AA}^{-1}$  e  $q_{max} = 0.33\text{\AA}^{-1}$  (FEIGIN; SVERGUN; TAYLOR, 1987).

$$|\vec{q}| = |\vec{k}_0 - \vec{k}_1| = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda} \quad (2)$$

Vale ressaltar que o espalhamento é do tipo elástico e então o módulo do vetor de onda final é igual ao módulo do vetor de onda incidente (FEIGIN; SVERGUN; TAYLOR, 1987). Baseado nisso, o módulo do vetor de espalhamento pode ser determinado matematicamente por uma dedução geométrica simples como mostra a Figura 7.

Por sua vez, a intensidade de espalhamento  $I(q)$  pode ser modelada teoricamente por uma relação direta entre um fator de forma  $P(q)$ , relacionado com o tamanho e forma das partículas espalhadoras, e um fator de estrutura  $S(q)$ , relacionado com a interação entre essas partículas no sistema (FEIGIN; SVERGUN; TAYLOR, 1987; PILZ; GLATTER; KRATKY, 1979; GLATTER, 1980). Essa relação é apresentada na Equação (3) e é baseada na suposição de que as partículas são monodispersas, e que então podem ser descritas pelo



**Figura 7** – Esquema ilustrando um equipamento de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Uma fonte de raios-X produz o feixe incidente que passa por um monocromador e colimador antes de atingir o suporte com a amostra. O feixe então é espalhado em todas as direções e um detector localizado a uma certa distância da amostra registra a intensidade dos raios-X como uma função do ângulo de espalhamento  $2\theta$ . A imagem do detector integrada revela uma curva que fornece informações sobre a amostra. Na parte inferior um esquema da geometria do vetor de espalhamento. Figura adaptada de (BARBOSA et al., 2013).

mesmo fator de forma (FEIGIN; SVERGUN; TAYLOR, 1987).

$$I(q) \propto P(q)S(q) \quad (3)$$

Para as vesículas lipídicas é possível adotar uma aproximação de uma estrutura plana infinita, visto que seus diâmetros são muito maiores que o comprimento de onda dos raios-X. Logo, o seu fator de forma estará relacionado com a variação da densidade eletrônica na direção normal ao plano da bicamada e seu fator de estrutura com a disposição lateral de bicamadas multilamelares.

Diante disso, o fator de forma  $P(q)$  pode ser escrito pela Equação (4) como o produto de um fator  $1/q^2$ , e um fator de forma da seção transversal da bicamada  $P_t(q)$  (perpendicular ao plano basal), com  $A$  sendo a área do plano basal (GLATTER, 1980).

$$P(q) = \frac{2\pi A}{q^2} P_t(q) \quad (4)$$



A condição para o separação do termo  $1/q^2$  é que espessura da bicamada é muito menor que a extensão nas outras duas dimensões e que o raio de curvatura da bicamada é muito maior que a espessura (KRATKY; POROD, 1949; SVERGUN; KOCH, 2003). Omitindo constantes triviais, a intensidade total de espalhamento  $I(q)$  pode ser escrita como:

$$I(q) \propto \frac{P_t(q)S(q)}{q^2} \quad (5)$$

$P_t(q)$  é calculado através da transformada de Fourier da variação da densidade eletrônica na direção normal ao plano da bicamada. Como a densidade eletrônica é constante ao longo dos planos da membrana (nas direções  $x$  e  $y$ ), haverá um contraste eletrônico apenas ao longo da direção  $z$  perpendicular à mesma (FEIGIN; SVERGUN; TAYLOR, 1987). Então, considerando  $\rho(z)$  como essa densidade perpendicular ao plano da bicamada e adotando  $P_t(q) = (|F(q)|^2)$  para simplificar a notação, temos:

$$F(q) = \int_{-\infty}^{\infty} \rho(z) \cos(q \cdot z) dz \quad (6)$$

A fim de determinar esse perfil de densidade eletrônica da partícula de espalhamento e extrair a quantidade máxima de informações estruturais desses experimentos, a intensidade de espalhamento experimental é geralmente ajustada por um modelo teórico, que estará relacionado às características da partícula de dispersão, bem como eventuais interações entre as partículas dispersantes (FEIGIN; SVERGUN; TAYLOR, 1987).

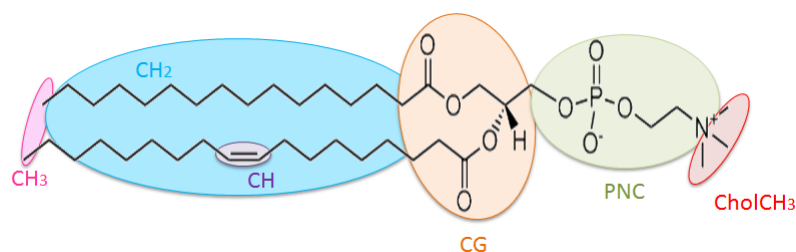
No caso das bicamadas pode-se adotar um modelo unidimensional, no qual a membrana é dividida em vários grupos sub moleculares em uma linha normal ao seu plano, e descrever esses grupos de membrana com distribuições estatísticas que permitem obter parâmetros estruturais como suas posições na bicamada (KUCERKA; HOLLAND *et al.*, 2011).

Para a determinação dessas distribuições estatísticas mencionadas acima, muitos métodos foram desenvolvidos. Um exemplo é o *Scattering Density Profile (SPD)*, desenvolvido por Wiener e White (1991) e refinado por Kucerka, Nagle *et al.* (2008), que consiste em utilizar Gaussianas e funções erro para descrever a distribuição desses componentes

sub moleculares e o componente água é determinado por complementaridade com a distribuição do volume lipídico total (WIENER; WHITE, 1991; PABST *et al.*, 2010; HVOSLEF, 1958).

Vale ressaltar que o modelo SDP não é descrito em termos de densidade eletrônica obtidos a partir de dados de raios-X, e sim por distribuições de probabilidade de volume, onde é imposta a conservação espacial local e é atribuído que todo o volume da bicamada é composto pelos lipídios e pela água (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008). Outra imposição importante é que as distribuições de probabilidades de volume totais devem ser iguais à um para cada ponto ao longo da direção normal à bicamada e o volume de um grupo de componentes é o mesmo, em média, para as diferentes posições desse grupo (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008).

Para fazer as análises do SDP é necessário separar os grupos componentes de forma que cada grupo tenha as condições de contraste similares nos raios-X. Por exemplo, para o lipídio POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine*), três gaussianas são utilizadas para descrever as distribuições de probabilidade de volume do grupo da cabeça lipídica PC: os grupos carbonila e glicerol são descritos por uma única gaussiana (CG), o fosfato e parte da colina ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) por outra gaussiana (PCN) e a colina restante ( $3\times\text{CH}_3$ ) por mais uma gaussiana (CholCH<sub>3</sub>) (KUČERKA; NIEH; KATSARAS, 2011). Um esquema dessa divisão é apresentado na Figura 8.



**Figura 8** – Esquema ilustrando um exemplo de separação do lipídio POPC para o modelo SDP. A região da cabeça PC é dividida em carbonila-glicerol (CG), fosfato e parte da colina (PCN) e os demais componentes da colina (CholCH<sub>3</sub>). Já a cauda lipídica consiste nos grupos de hidrocarbonetos metileno (CH<sub>2</sub>), metil terminal (CH<sub>3</sub>) e metino (CH).

A região total da cadeia de hidrocarbonetos é descrita por três componentes adicionais: CH<sub>2</sub>, CH e CH<sub>3</sub>. Os grupos CH e CH<sub>3</sub> são descritos por uma única gaussiana e a

região total pode ser representada pela soma de duas funções de erros, visto que gaussianas fornecem boas aproximações para pequenos grupos bem localizados, mas são inadequadas para representar os vários grupos hidrocarbonetos na cauda lipídica (KLAUDA *et al.*, 2006). Então, para obter a distribuição do CH<sub>2</sub> basta subtrair as duas gaussianas das funções erro.

A distribuição da água não é definida por nenhuma função específica, mas é calculada com base no requisito de complementaridade, pelo qual todas as probabilidades somam um (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008; KUČERKA; NIEH; KATSARAS, 2011).

Então, em geral, as distribuições de probabilidade de volume desses grupos  $i$  (onde  $i = \text{CG, PCN, CholCH}_3, \text{CH, CH}_2, \text{CH}_3$ ) são descritas a seguir (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008):

$$P_i(z) = \frac{c_i}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \left( \exp\left[\frac{-(z+z_i)^2}{2\sigma_i^2}\right] + \exp\left[\frac{-(z-z_i)^2}{2\sigma_i^2}\right] \right) \quad (7)$$

onde uma gaussiana representa a contribuição do grupo fosfato na parte superior da bicamada e uma gaussiana semelhante com o parâmetro  $-z_i$  representa o fosfato na parte inferior. A constante  $c_i$  é a área integrada abaixo da curva dada por:

$$c_i = \frac{n_i v_i}{A} \quad (8)$$

em que  $v_i$  é o volume molecular teórico do grupo  $i$ ,  $n_i$  é o número de grupos  $i$  na molécula lipídica e  $A$  é a área por molécula. Como mencionado anteriormente, a região total da cadeia de hidrocarbonetos (HC) está bem representada usando as funções de erro (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008):

$$P_{HC}(z) = \frac{1}{2} \left[ \text{erf}(z, -z_{HC}, \sigma_{HC}) - \text{erf}(z, z_{HC}, \sigma_{HC}) \right] \quad (9)$$

onde a função erro é centralizada em  $z_i$  e possui uma largura de  $\sigma_i$ :

$$\text{erf}(z, z_i, \sigma_i) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{z-z_i}{\sqrt{2}\sigma}} \exp[-x^2] dx \quad (10)$$

Para satisfazer a conservação espacial na região central de hidrocarbonetos – probabilidade total  $P_{HC}$  deve ser igual a um – a distribuição de probabilidade de volume para os grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) pode ser expressa como (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008):

$$P_{\text{CH}_2}(z) = P_{HC}(z) - P_{\text{CH}_3}(z) - P_{CH}(z) \quad (11)$$

e para a água:

$$P_W(z) = 1 - P_{CG}(z) - P_{PCN}(z) - P_{\text{CholCH}_3}(z) - P_{HC}(z) \quad (12)$$

A distribuição de densidade eletrônica subtraída da água  $\Delta\rho(z)$  será calculada através dessas distribuições de probabilidade de volume e das densidades de elétrons totais de cada componente (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008):

$$\Delta\rho(z) = \sum(\rho_i - \rho_W)P_i(z) \quad (13)$$

onde  $i = \text{CG}, \text{PCN}, \text{CholCH}_3, \text{CH}, \text{CH}_2, \text{CH}_3$ .

Com isso, é possível calcular o fator de forma que, como mencionado anteriormente, é obtido a partir da transformada de Fourier:

$$F(q) = 2 \int_0^{\frac{D}{2}} \Delta\rho(z) \cos(q \cdot z) dz \quad (14)$$

onde a integração ocorre do centro da bicamada ( $z = 0$ ) até um ponto ( $D/2$ ) a partir do qual  $P_W(z) = 1$  (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008).

A superfície de divisão de Gibbs da região de hidrocarbonetos é definida como  $D_C$ , que é dada por  $z_{HC}$  na Equação (9). Já a superfície de divisão de Gibbs para a região da água é definida como  $D_B/2$ , onde o parâmetro  $D_B$  é a espessura de Luzzati e é dado por (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008):

$$D_B = D - 2 \int_0^{D/2} P_W(z) dz \quad (15)$$

Utilizando essa espessura e o volume lipídico total  $V_L$ , é possível obter a área por lipídio  $A$  como:

$$A = \frac{2V_L}{D_B} \quad (16)$$

No entanto, embora o SDP seja muito completo, o modelo não é adequado para descrever os vários grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) nas regiões da cadeia de hidrocarbonetos, uma vez que as gaussianas fornecem apenas uma boa aproximação para grupos pequenos e localizados (KLAUDA *et al.*, 2006). Dessa forma, como mencionado, para obter a contribuição apenas das distribuições de metilenos, é necessário subtrair as distribuições de  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  de  $P_{HC}(z)$  (Equação (11)) (DE ROSA; SPINOZZI; ITRI, 2018).

Então, para aprimorar o SDP, um modificação do modelo denominado *Modified Scattering Density Profile (MSDP)* foi desenvolvido por Francesco Spinozzi para estender suas aplicações para sistemas lipídicos mais complexos e misturas lipídicas (DE ROSA; SPINOZZI; ITRI, 2018). Nesse novo método, considerou-se que a descrição da distribuições de volume com uma única gaussiana é muito simples; portanto, uma alternativa que preserva a tratabilidade matemática da gaussiana, é descrever as distribuições de probabilidade de volume de cada grupo  $i$  (à parte do  $\text{CH}_2$ ) pela seguinte combinação de duas funções erro (DE ROSA; SPINOZZI; ITRI, 2018):

$$E_2(z, z_i, w_i, \sigma_i) = \frac{1}{2} \left( \text{erf} \left[ \frac{z - z_i + w_i}{2^{1/2}\sigma_i} \right] + \text{erf} \left[ \frac{z - z_i - w_i}{2^{1/2}\sigma_i} \right] \right) \quad (17)$$

onde  $z_i$  e  $\sigma_i$  continuam sendo a posição e a suavidade do pico, respectivamente, e  $2w_i$  é a largura do pico. Também é possível definir dois picos em posições simétricas  $\pm z_i$  com base na função anterior:

$$E_{2s}(z, z_i, w_i, \sigma_i) = E_2(z, z_i, w_i, \sigma_i) + E_2(z, -z_i, w_i, \sigma_i) \quad (18)$$

Por sua vez, as distribuições de probabilidade de volume dos grupos  $i$  serão:

$$P_i(z) = \frac{n_i v_i}{A} \frac{E_{2s}(z, z_i, w_i, \sigma_i)}{2w_i} \quad (19)$$

e a fração de volume da parte hidrofóbica total do lipídio, com espessura  $D_{HC}$ , continua sendo a Equação (9), ou seja:

$$P_{HC}(z) = E_2(z, 0, D_{HC}, \sigma_{HC}) \quad (20)$$

Um aspecto desse modelo é que o MSPD leva a um aumento do número total de parâmetros: o pico da fração de volume de cada grupo é definido por três parâmetros ajustáveis,  $z_i$ ,  $w_i$  e  $\sigma_i$  em vez dos dois parâmetros  $z_i$  e  $\sigma_i$  como no modelo SPD. No entanto, ele continua se adaptando facilmente à descrição da molécula lipídica, constituída por apenas dois ou três grupos (normalmente cabeça, núcleo e cauda) (DE ROSA; SPINOZZI; ITRI, 2018).

Outra melhoria que vale a pena mencionar é que o MSPD leva em consideração o movimento da membrana, ou seja, a oscilação que podem existir nos sistemas, algo que o modelo SDP não é capaz.

Em relação ao fator de estrutura, para os sistemas estudados nesse trabalho, adotou-se a aproximação para um sistema diluído de partículas idênticas, onde a intensidade de espalhamento para ângulos pequenos é proporcional ao espalhamento médio de uma partícula calculada em todas as orientações, então:

$$S(q) \approx 1 \quad (21)$$

As medidas do SAXS deste trabalho foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP, na linha de luz SAXS-1 (D11A). A distância entre a amostra e o detector foi  $\propto 1000mm$  e a temperatura  $(22 \pm 1)^\circ C$ . As curvas experimentais de espalhamento foram corrigidas quanto à contribuição da água, atenuação da amostra e homogeneidade do detector. A concentração lipídica total foi  $10mM$  na ausência e presença das diferentes concentrações de líquido iônico.

O software utilizado para analisar as curvas de SAXS foi o GENFIT, desenvolvido pelo Prof. Francesco Spinozzi, da Università Politecnica delle Marche (SPINOZZI *et al.*, 2014). Os grupos químicos que constituem os lipídios e a água são definidos e listados na Tabela 2, juntamente com suas principais propriedades e seu número  $n_i$  em cada uma das

três moléculas lipídicas.

**Tabela 2** – Lista de todos os grupos químicos e seus respectivos volumes moleculares  $v_i$ , pesos moleculares  $M_i$ , números de elétrons  $Z_i$  e número  $n_i$  de moléculas na composições dos três lipídios investigados. O grupo CS representa a região inicial da ceramida e  $C_n\text{mim}^+$  representa a cabeça polar do líquido iônico (KUCERKA; NAGLE et al., 2008; SPINOZZI et al., 2014).

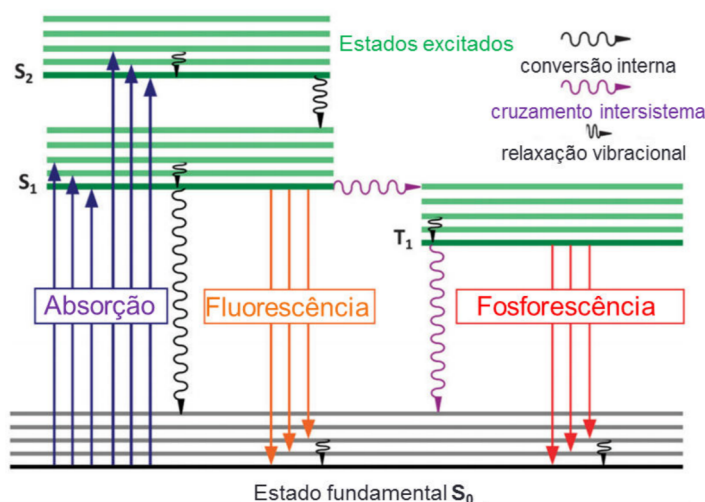
Grupo i	$v_i$	$M_i$ (g mol <sup>-1</sup> )	$Z_i$ ( $q_e$ )	$n_i$ -POPC	$n_i$ -SM	$n_i$ -C <sub>14</sub>
CH <sub>2</sub>	27.7	14.03	8	28	28	13
CH <sub>3</sub>	52.9	15.04	9	2	2	1
CH	21.5	13.02	7	2	1	-
CG	143.3	129.09	67	1	-	-
CS	125.4	100.10	57	-	1	-
PCN	87.8	137.03	70	1	1	-
CholCH <sub>3</sub>	99.9	45.11	27	1	1	-
$C_n\text{mim}^+$	103.0	82.10	44	-	-	1
Cl <sup>-</sup>	33.3	35.45	17	-	-	1
H <sub>2</sub> O	29.9	18.02	10	-	-	-

### 3.3.2 Espectroscopia de Fluorescência

Existem diversos fenômenos que envolvem a perda de energia de uma molécula que encontra-se no estado excitado. Quando uma substância é irradiada continuamente, suas moléculas excitadas estão continuamente decaindo para estado fundamental. Essa volta do sistema excitado ao estado fundamental implica em uma perda ou relaxação da energia absorvida, que pode ocorrer por processos radioativos ou não-radioativos (LAKOWICZ, 1999; VALEUR, 2001a).

Quando um fóton é liberado (processos radioativos), ocorre a fluorescência ou a fosforescência, dependendo da relação entre o spin do elétron do estado excitado e aquele do estado fundamental (LAKOWICZ, 1999; VALEUR, 2001a). Se o estado excitado é do tipo singleto, isto é, o elétron no orbital excitado está emparelhado ao elétron no estado fundamental (spins anti-paralelos), o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. O tempo de vida – tempo em que o elétron permanece no estado excitado – é da ordem de  $10^{-9}s$  e o processo é denominado fluorescência (LAKOWICZ, 1999). Mas se o estado excitado é do tipo tripleto, elétron no orbital excitado possui o spin paralelo ao elétron no estado fundamental, as transições para o estado fundamental são proibidas e o tempo de decaimento é muito maior que no primeiro caso, da ordem de  $10^{-3}s$  até  $10^0s$ , e o evento é denominado fosforescência

(LAKOWICZ, 1999). O diagrama de Jablonski na Figura 9 ilustra esses processos de emissão.



**Figura 9** – Diagrama de Jablonski simplificado. Os estados singletos são representados por  $S$ , onde  $S_0$  é o fundamental e  $S_1$  e  $S_2$  os estados excitados. Os estados tripletos são representados por  $T$ , onde  $T_1$  é o primeiro estado tripleto. Setas verticais para cima correspondem a absorção, e setas para baixo os processos de emissão. As setas onduladas representam alguns dos processos não radioativos denominados conversão interna, relaxação vibracional e cruzamento entre sistemas. Figura adaptada de (HEINE; MÜLLER-BUSCHBAUM, 2013).

Neste diagrama de Jablonski, é possível notar que ao absorver um fóton o processo de decaimento ocorre tipicamente com uma energia menor, devido a perda parcial de energia pelas moléculas de forma não radiativa por relaxação vibracional, conversões internas e conversões inter sistemas. Então a molécula fluorescente possui um comprimento de onda de excitação e um comprimento de onda de emissão diferentes, sendo a distância entre eles chamada de deslocamento de Stokes (LAKOWICZ, 1999; VALEUR, 2001a).

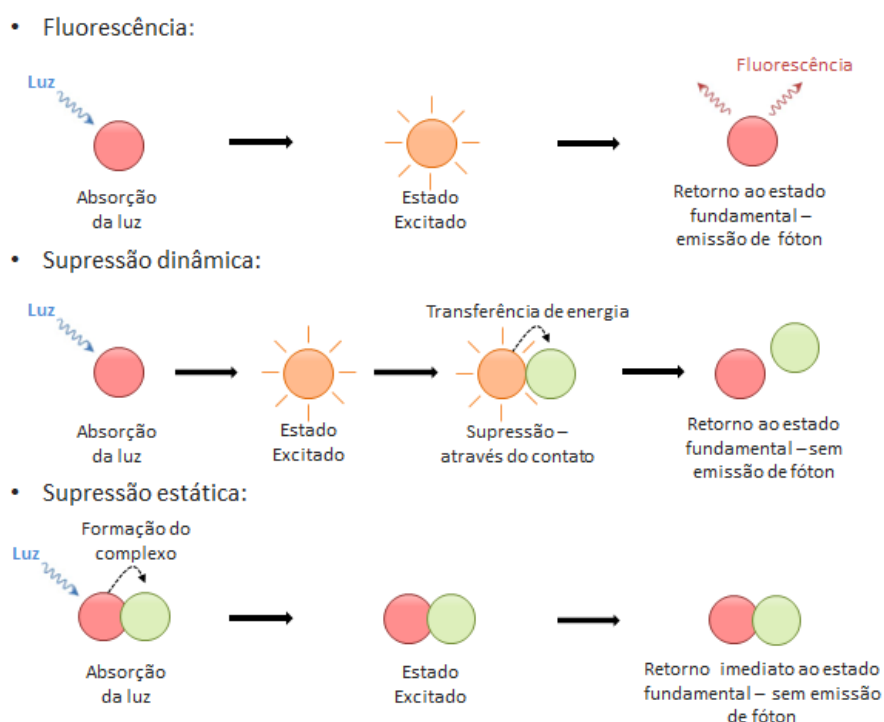
Os dados espectrais de fluorescência são geralmente apresentados como espectros de emissão, que consistem em um gráfico da intensidade da fluorescência versus comprimento de onda ( $nm$ ) ou número de onda ( $cm^{-1}$ ). Os espectros de emissão variam amplamente e dependem da estrutura química do fluoróforo e do solvente em que é dissolvido (LAKOWICZ, 1999).



### 3.3.2.1 Supressão de fluorescência

A interação entre um fluoróforo e uma molécula ou entre duas moléculas induz geralmente perturbação ou modificação nos parâmetros de fluorescência, como intensidade, rendimento quântico ou vida útil (LAKOWICZ, 1983). Essas perturbações de fluorescência permitem explicar e entender a natureza e a origem das interações entre as diferentes moléculas.

Quando essa modificação ocorre na intensidade da fluorescência, causando sua diminuição, ocorre um processo denominado supressão. Tais diminuições podem ocorrer por diversos mecanismos como rearranjo molecular, reações no estado excitado, transferência de energia, formação de complexos (supressão estática) e por colisão (supressão dinâmica) (ALBANI, 2011). A Figura 10 mostra uma simplificação desse fenômeno de supressão de fluorescência.



**Figura 10** – Esquema simplificado dos processos de supressão de fluorescência estático e dinâmico. Na supressão dinâmica, os fluoróforos (em rosa) absorvem a luz e vão para o estado excitado (em laranja), interagem com o agente supressor (em verde) e retornam ao estado fundamental sem emissão de fótons. Na supressão estática, o fluoróforo e o agente supressor formam um complexo no estado fundamental, e quando este complexo absorve luz, ele imediatamente retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton.

Tanto na supressão de fluorescência dinâmica quanto na estática é necessário o contato entre o fluoróforo e o agente supressor (LAKOWICZ, 1983; ALBANI, 2011). Como consequência, esses tipos de supressão fornecem informações importantes sobre o fluoróforo, como a sua acessibilidade a determinados supressores situados em regiões específicas de uma proteína ou de uma bicamada lipídica e também suas permeabilidades para esses supressores, possibilitando inúmeras aplicações. Por esse motivo, focou-se nesses dois métodos de supressão (LAKOWICZ, 1983).

A supressão dinâmica (ou por colisão) que ocorre quando o fluoróforo no estado excitado é desativado após o contato com alguma outra molécula em solução, chamada de agente supressor, durante o tempo de vida do estado excitado e depois retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas – as duas moléculas não formam um complexo (LAKOWICZ, 1983; ALBANI, 2011; VALEUR, 2001b). Os parâmetros de fluorescência permitem determinar as constantes de supressão que dependem da dinâmica do sistema estudado através da equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_D[Q] \quad (22)$$

onde  $F_0$  e  $F$  representam, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor,  $k_q$  é a constante bimolecular de supressão,  $\tau_0$  é o tempo vida na ausência do agente supressor e  $[Q]$  é a concentração do agente supressor. A constante de Stern-Volmer  $K_D$  indica a sensibilidade do fluoróforo ao supressor e como mostra a Equação (22) é dada por  $k_q\tau_0$ , onde  $k_q$  reflete a eficiência da supressão ou a acessibilidade do fluoróforo ao supressor.

Por sua vez, na supressão estática os fluoróforos formam complexos não fluorescentes com os supressores. Quando este complexo absorve luz, ele imediatamente retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton, isto é, o processo ocorre no estado fundamental e não depende de difusão ou colisões moleculares. Esse tipo de supressão pode ser descrito pela

Equação (23), onde  $K_S$  é a constante de associação.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (23)$$

Note que na supressão estática observa-se apenas o fluoróforo que ainda está emitindo, isto é, fluoróforo livre em solução. O fluoróforo complexado não floresce de novo e não é observado nas equações derivadas.

Normalmente representa-se graficamente  $F_0/F$  em função de  $[Q]$  e espera-se que essa razão das fluorescências varie linearmente com a concentração do supressor, indicando uma única classe de fluoróforos todos igualmente acessíveis ao supressor. A reta obtida desse gráfico intercepta o eixo das ordenadas em  $F_0/F = 1$  e sua inclinação nos fornece a constante  $K_D$  ou  $K_S$ , dependendo do tipo de supressão. O valor de  $K_D^{-1}$  (ou  $K_S^{-1}$ ) é a concentração do supressor para a qual  $F_0/F = 2$ , ou seja, quando 50% da intensidade é suprimida.

Porém, em muitos casos, o fluoróforo pode ser suprimido tanto por colisões como por formação de um complexo com o extintor (ALBANI, 2011). Nessas circunstâncias, o gráfico de Stern-Volmer não será linear, e sim uma curva com concavidade para cima e segunda ordem em  $[Q]$  (LAKOWICZ, 1983). Então, a razão das fluorescências ( $F/F_0$ ) pode ser descrita como:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (24)$$

Um fator fundamental é que através da observação do gráfico linear não é possível identificar se a supressão é dinâmica ou estática. Essas supressões podem ser distinguidas por meio de suas diferentes dependências da temperatura e viscosidade, e principalmente por medições do tempo de vida (LAKOWICZ, 1983). Como na supressão estática tem-se os fluoróforos complexados que não são fluorescentes e observa-se apenas a fluorescência dos fluoróforos não complexados – não perturbados – o tempo de vida vai permanecer o mesmo. Em contraste, a supressão dinâmica é um processo que diminui a população no estado excitado por um decaimento não radiativo, implicando no decréscimo do tempo de vida (LAKOWICZ, 1983).

### 3.3.2.1.1 Aplicação de supressão de fluorescência em membranas

Como mencionado na seção anterior, os estudos de supressão de fluorescência podem ser utilizados para investigar estruturas de dimensões moleculares, como proteínas e membranas, através da localização do fluoróforo nesse sistema (LAKOWICZ, 1983; ALBANI, 2011).

Uma forma de efetuar esses estudos consiste em encapsular um fluoróforo no interior de uma lipossoma. Se a membrana for impermeável ao supressor e o fluoróforo estiver localizado no interior da macromolécula, então não se verificará uma supressão na intensidade de fluorescência. Caso ocorra a permeabilização da membrana por algum agente externo, o supressor entrará em contato com o fluoróforo e o evento de supressão será observado (YAMAZAKI, 2008; MATTEI *et al.*, 2017).

A observação desse vazamento do conteúdo interno da vesícula permite obter informações sobre interações de vários tipos de substâncias – por exemplo, substâncias antimicrobianas, proteínas e surfactantes com membranas lipídicas (YAMAZAKI, 2008; MATTEI *et al.*, 2017). Uma grande quantidade de vazamento indica que a substância interage fortemente com as membranas lipídicas, induzindo instabilidade nas estruturas das vesículas e até causando eventualmente a sua ruptura (YAMAZAKI, 2008).

No presente trabalho, para checar se o líquido iônico era capaz de permeabilizar as lipossomas, realizou-se alguns experimentos de vazamento utilizando o fluoróforo *1,3,6,8-pireno tetrasulfonato de sódio (PTS)* e o supressor de fluorescência cloreto de *1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (metil viologênio - MV)*. Esse par fluoróforo/supressor (PTS/MV) interage formando um complexo molecular na razão 1 : 1 e permite observar o vazamento das lipossomas em baixa força iônica (SANTANA *et al.*, 2014).

Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Biomembranas do Instituto de Física (IFUSP) utilizando um fluorímetro de estado estacionário Cary-Eclipse. As amostras foram colocadas em cubetas de acrílico com caminhos ópticos de  $10\text{mm} \times 10\text{mm}$  e efetuou-se medidas em triplicadas.

### 3.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmico

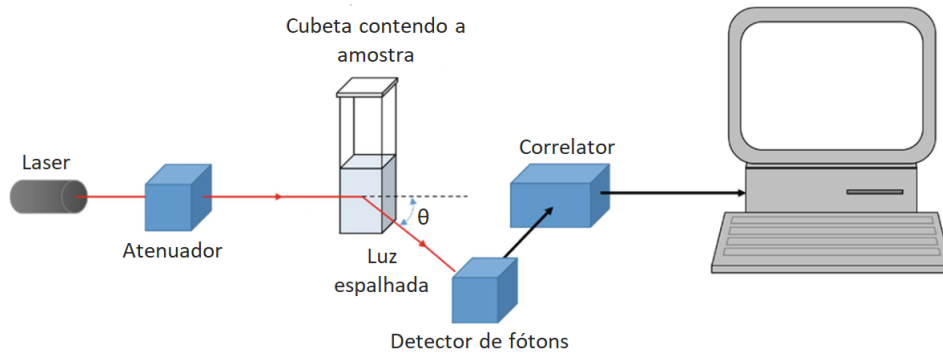
O espalhamento de luz dinâmico, do inglês "*Dynamic Light Scattering (DLS)*", é uma técnica baseada no espalhamento de luz visível que permite medir o coeficiente de difusão de uma amostra, e por meio do movimento Browniano, obter as dimensões de partículas em suspensão, quando essas possuem diâmetros hidrodinâmicos  $D_H \leq 1\mu m$  (RADAIC *et al.*, 2016; BHATTACHARJEE, 2016; HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

Entre outros fatores, a intensidade da luz dispersada de uma suspensão coloidal depende do ângulo de dispersão  $\theta$  e do tempo de observação  $t$ . Isso leva ao desenvolvimento de dois tipos de experimentos: o espalhamento de luz estático (SLS), no qual a intensidade de espalhamento média é medida em vários ângulos de espalhamento e o DLS, no qual a dependência no tempo da intensidade é medida (HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

Essa dependência temporal da intensidade de espalhamento decorre do fato de que, devido a sua energia térmica, partículas e moléculas em suspensão estão constantemente movendo-se aleatoriamente e colidindo com outras moléculas presentes – por exemplo, água no caso de uma solução aquosa. Esse movimento é conhecido como Movimento Browniano (ZHOU; SU; CAI, 2017; BHATTACHARJEE, 2016).

Para tomar esses dados, utiliza-se um aparelho que emite um feixe de laser de comprimento  $\lambda = 633nm$ . Esse feixe interage com as partículas, é disperso pela amostra e depois detectado em um ângulo de  $90^\circ$  em relação a sua direção inicial, como apresentado na Figura 11. A luz detectada é um padrão de interferência que possui intensidades diferentes de acordo com o tamanho das partículas. As partículas pequenas se difundem no meio de forma relativamente rápida, resultando em um sinal de intensidade flutuando rapidamente em comparação com as partículas grandes, que se difundem mais lentamente (HASSAN; RANA; VERMA, 2015; ZHOU; SU; CAI, 2017).

O software do equipamento interpreta essas flutuações das intensidade dispersas por uma função de autocorrelação. Essa função normalizada é calculada através da relação apresentada na Equação (25), a partir dos valores para a intensidade  $I(t)$  da luz espalhada em um instante de tempo  $t$  e a correspondente quantidade  $I(t + \tau)$  em um instante posterior  $t + \tau$ , para todo  $t$  dentro do intervalo em que o sinal é observado (HASSAN;



**Figura 11** – Esquema ilustrando o funcionamento de um equipamento de DLS. De forma simplificada o processo é o seguinte: um laser passa por um atenuador e ilumina a cubeta com a amostra. A luz espalhada por essa amostra é detectada a um ângulo  $\theta = 90^\circ$  por um detector de fótons. Esses dados são então analisados por um processador de sinal digital chamado correlator que, por sua vez, retorna uma função que fornece a informação sobre o tamanho das partículas do sistema estudado. Figura adaptada de (LEONG et al., 2018).

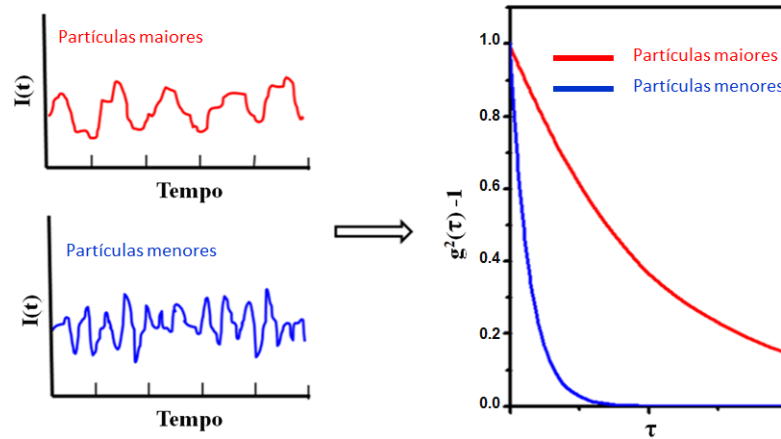
RANA; VERMA, 2015).

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (25)$$

Considerando que para uma suspensão de partículas esféricas monodispersas em movimento browniano é possível obter o coeficiente de difusão translacional da partícula  $D$  a partir da análise da função de autocorrelação, então através equação de Stokes-Einstein obtemos o diâmetro hidrodinâmico de partículas esféricas  $D_H$  (MANAIA et al., 2017). A Equação (26) mostra a relação entre o diâmetro hidrodinâmico e o coeficiente de difusão, que depende da temperatura  $T$  e da viscosidade do meio  $\eta$ , uma vez que o movimento browniano é alterado por esses parâmetros, e da constante de Boltzmann  $k_B$  (MANAIA et al., 2017).

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (26)$$

É importante ressaltar que esse diâmetro efetivo, engloba tanto o diâmetro da partícula, como contra-íons e camadas de hidratação que podem estar difundidas junto com a partícula. A Figura 12 mostra um esquema a relação da intensidade detectada e a função de correlação calculada com o tamanho das partículas presentes no sistema.



**Figura 12** – Representação esquemática das flutuações na intensidade de luz espalhada e as funções de autocorrelação correspondentes para partículas de tamanhos diferentes. Figura adaptada de (HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

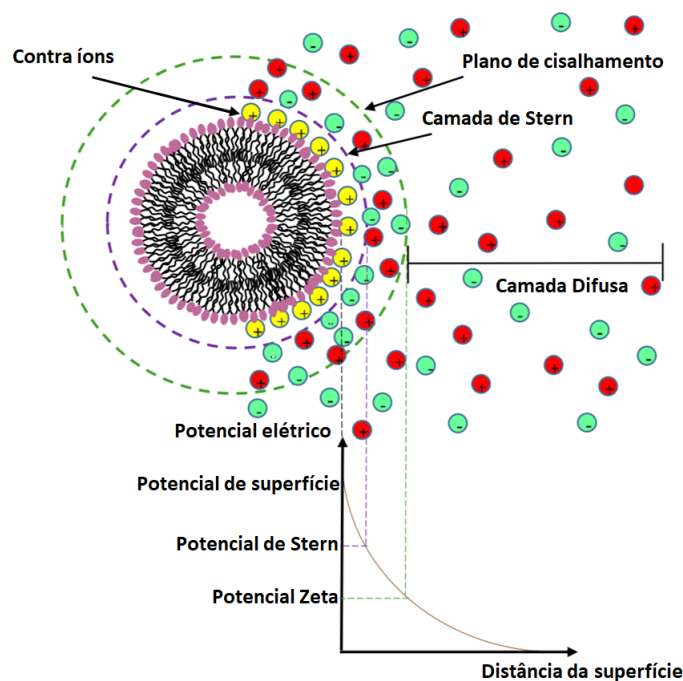
Este experimento também fornece uma estimativa da polidispersão da amostra através das informações da função de correlação e da análise de quais populações de tamanhos de partículas podem produzir o sinal de leitura detectado. O índice de polidispersão (PDI), do inglês *polydispersivity index*, informa se a amostra possui partículas de tamanho semelhante ( $PDI \leq 0.2$ ) ou se a amostra possui muitas populações de partículas em diferentes tamanhos ( $PDI > 0.2$ ) (KHATUN *et al.*, 2016). Deve-se ressaltar que sistemas com  $PDI > 0.5$  não são adequadas para medições de DLS.

Esses experimentos foram realizadas no Laboratório de Biomembranas do Instituto de Física (IFUSP) usando um analisador Malvern ZetaSizer ZS90. Em uma cubeta de acrílico de  $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ , foram medidas triplicadas de  $100\mu\text{l}$  da amostra na temperatura de  $22^\circ\text{C}$ . Para a análise da função de correlação, foi utilizado o software Malvern, onde foram obtidos os diâmetros hidrodinâmicos e as polidispersões das vesículas.

### 3.3.4 Potencial Zeta

Em uma solução iônica, nanopartículas com carga líquida possuem uma camada de íons (de carga oposta a sua) fortemente ligada à sua superfície, conhecida como camada Stern. Ainda existe uma segunda camada externa difusa composta por íons fracamente

associados (CLOGSTON; PATRI, 2011). A medida que essas partículas se movem (devido ao movimento browniano ou alguma força aplicada), dentro dessa camada difusa, existe um plano hipotético que atua como a interface entre os íons que se movem junto da partícula e a camada de dispersante (BHATTACHARJEE, 2016). Essa a interface é conhecida como plano de cisalhamento. Por sua vez, o potencial eletrostático nesse plano de cisalhamento é chamado de potencial zeta ( $\zeta$ ) e está relacionado à carga superficial da nanopartícula (SMITH *et al.*, 2017). A Figura 13 ilustra essas diferentes camadas citadas acima.



**Figura 13** – Representação esquemática da distribuição de carga em torno da superfície carregada de um lipossoma. A camada de Stern é composta por íons fortemente ligados à superfície carregada e a camada difusa uma região adjacente de íons móveis vagamente associados (LOMBARDO *et al.*, 2016).

O potencial zeta só pode ser medido indiretamente, então utiliza-se algum tipo de medida direta, a partir da qual se calcula o potencial zeta. A técnica mais usada e mais aceita é a medição do potencial zeta através da mobilidade eletroforética, onde introduz-se uma suspensão coloidal diluída em uma cubeta com dois eletrodos e aplica-se um campo elétrico nessa suspensão. Quando esse campo elétrico é aplicado na amostra, as partículas carregadas suspensas são atraídas para o eletrodo de carga oposta, processo conhecido como eletroforese. Como é possível ver na Equação (27), o quociente da velocidade de



deslocamento  $\vec{v}$  pelo campo elétrico  $\vec{E}$  é denominado mobilidade eletroforética.

$$\mu_e = \frac{\vec{v}}{\vec{E}} \quad (27)$$

Nos equipamentos para medições de potencial zeta, incide-se um laser na amostra e as partículas espalham essa radiação durante a eletroforese. Como essas partículas são móveis, a luz dispersada tem uma frequência ligeiramente diferente da luz do laser original e a mudança de frequência é proporcional à velocidade das partículas. Então, por meio do efeito Doppler é possível medir o deslocamento na luz espalhada e determinar a velocidade das partículas e com isso obter a mobilidade eletroforética pela Equação (27).

Por fim, através da Equação (28), conhecida como equação de Henry, o potencial zeta pode ser determinado como:

$$\mu_e = \frac{2\epsilon_r\epsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (28)$$

onde  $\epsilon_r$  é permissividade relativa,  $\epsilon_0$  permissividade do vácuo,  $\zeta$  o potencial zeta,  $f(Ka)$  a função de Henry e  $\eta$  viscosidade do fluido. Para obter a função de Henry, geralmente são utilizados dois métodos de aproximação. Para partículas maiores (até  $1\mu m$ ) em soluções aquosas de alta concentração de sal ( $10^{-2}M$ ), temos  $f(Ka) \approx 1.5$  e a equação de Henry modifica-se na equação de Helmholtz-Smoluchowski (BHATTACHARJEE, 2016):

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r\epsilon_0\zeta}{\eta} \quad (29)$$

Por sua vez, para partículas menores ( $\leq 100nm$ ) dispersas em baixa concentração de sal ( $10^{-5}M$ ), temos  $f(Ka) \approx 1$  e a equação de Henry pode ser modificada como a equação de Hückel (BHATTACHARJEE, 2016):

$$\mu_e = \frac{2\epsilon_r\epsilon_0\zeta}{3\eta} \quad (30)$$

No presente estudo, devido as lipossomas e as concentrações de líquido iônico utilizadas, a aproximação de Helmholtz-Smoluchowski foi adotada.

Os experimentos de potencial zeta foram realizados no Laboratório de Biomembranas do Instituto de Física (IFUSP) utilizando um aparelho Malvern ZetaSizer Nano-ZS90.

O dispositivo está equipado com um laser He-Ne de  $4mW$  com um comprimento de onda de  $633nm$  e um detector fixo a  $90^\circ$ . A temperatura foi fixada em  $25^\circ C$ . Para as medições foi utilizada uma cubeta para potencial zeta do modelo DTS1061 da Malvern. A concentração total dos lipídios foi fixada em  $1mM$  e diferentes razões molares da LI foram adicionadas.

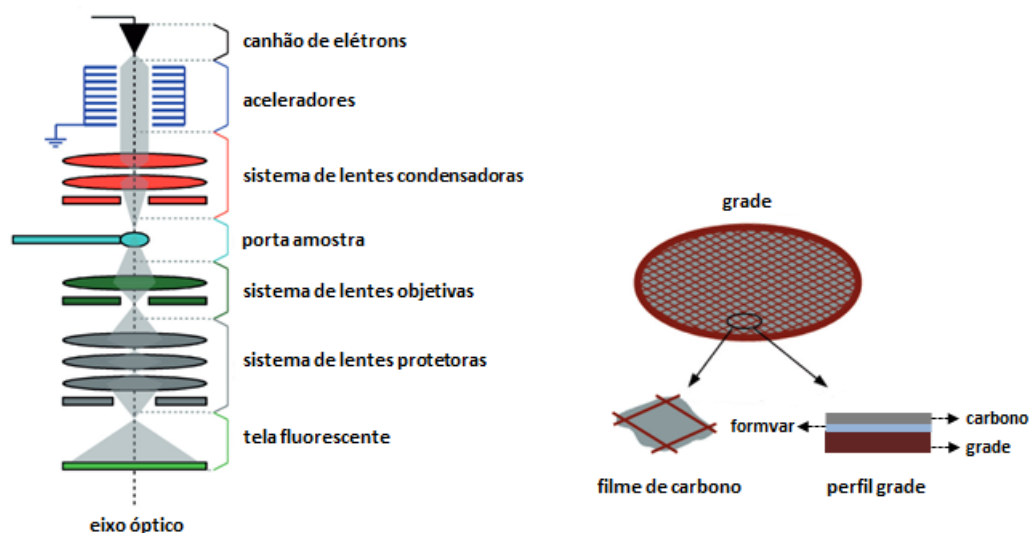
### 3.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Crio-EM

A Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês "*Transmission Electron Microscopy (TEM)*", é um dos métodos mais comumente utilizados para caracterização qualitativa de nanopartículas (KHATUN *et al.*, 2016). A técnica usa um feixe de elétrons altamente focado para estudar a amostra, proporcionando uma alta resolução e maior detalhes sobre a estrutura e organização de uma única partícula do sistema (MANAIA *et al.*, 2017). Esse feixe de elétrons é acelerado (tipicamente  $100 - 300keV$ ) e quando aplicado em uma amostra interage com os elétrons do sistema por meio de espalhamento elástico ou inelástico fazendo desvios e/ou sendo absorvidos (CZARNOCKI-CIECIURA; NOWOTNY, 2016).

A detecção dos elétrons transmitidos é geralmente feita por um dispositivo CCD/CMOS, no qual a intensidade dos fótons gerado pela interação dos elétrons recebidos com um cintilador é detectada em cada pixel e uma imagem em preto em branco da amostra é criada (CZARNOCKI-CIECIURA; NOWOTNY, 2016; KHATUN *et al.*, 2016). Devido ao comprimento de onda dos elétrons, é possível ver a estrutura atômica de um sistema. No caso das lipossomas, deseja-se obter o seu formato e tamanho, e investigar possíveis agregados na dispersão.

A Figura 14 mostra um esquema do aparato experimental. O feixe de elétrons sob alta tensão é emitido por um canhão de elétrons e percorre a coluna do microscópio passando por uma série de lentes magnéticas (lentes condensadoras) que focalizam o feixe para interagir com a amostra. Então, os elétrons transmitidos passam novamente por outra série de lentes magnéticas (lentes objetivas e projetoras) até atingirem uma tela fluorescente onde as imagens são formadas e podem ser vistas pelo observador. Para registrar as micrografias, o feixe é coletado pelo dispositivo CCD ou CMOS acoplado a uma um cintilador devido à alta energia dos elétrons. Um componente principal de um microscópio

eletrônico é o porta amostra localizado perto do sistema de lentes objetivas. Vale ressaltar que no cryo-EM o porta amostra deve ser resfriado com nitrogênio líquido para manter uma temperatura constante da amostra vitrificada (CZARNOCKI-CIECIURA; NOWOTNY, 2016).



**Figura 14** – Esquema geral simplificado de um microscópio eletrônico de transmissão e de um grid utilizado para deposição das amostras. À esquerda a coluna do microscópio com seus componentes principais: a fonte de elétrons, as várias lentes que focalizam o feixe de elétrons, o guiam através da amostra e produzem ampliação e o sistema no qual a imagem da amostra é projetada. À direita uma ilustração do suporte de amostra (os grids) compostos por uma estrutura de suporte fina feita de cobre geralmente coberta com uma camada de formvar (um tipo de resina de polivinil) e uma fina película de carbono na qual a solução das partículas analisadas pode ser aplicada. Figura adaptada de (CZARNOCKI-CIECIURA; NOWOTNY, 2016).

Muitas técnicas de preparação de amostras microscópicas eletrônicas foram desenvolvidas, cada um fornecendo informações diferentes e exigindo interpretações diferentes. Para sistemas coloidais, existe três técnicas de preparação de amostras mais utilizadas: secagem, coloração e crio-EM. A secagem é o método mais acessível e amplamente aplicado para estudar vesículas (FRANKEN; BOEKEMA; STUART, 2017). Porém, é a técnica mais arriscada para coloides, visto que a secagem pode alterar possivelmente a estrutura das nanopartículas e dar origem à possíveis agregados. Por isso, é adequado utilizá-la combinado com outros desses métodos de preparação, e também outras técnicas complementares como o DLS (FRANKEN; BOEKEMA; STUART, 2017; BAXA, 2018).

O melhor método para visualizar lipossomas próximos à sua estrutura nativa é o

crio-EM, onde as partículas são incorporadas em uma fina camada de água vitrificada, e como o processo de vitrificação é muito rápido, a amostra é fisicamente fixa em seu estado atual, sem ter as distorções de vácuo (BAXA, 2018). Então, nesse trabalho utilizou-se esses dois processos de preparação de amostras, a secagem e a crio-EM.

Para a preparação de amostras com secagem, seguiu-se o protocolo descrito por (MIELANCZYK *et al.*, 2014). Os grids utilizados foram do modelo Formvar/Carbon de 200*mesh*, da Electron Microscopy Sciences. Como o carbono é geralmente hidrofóbico, esses grids passaram por um procedimento de descarga no qual foram submetidos a um plasma negativo (14mA por 20 segundos) a fim de se obter uma superfície hidrofílica. Depois, uma gota de 5μL de amostra foi aplicada nos grids e após 1min30s, o excesso de amostra foi retirado com um papel absorvedor. Em seguida 5μL de ácido fosfotúngstico a 2%p/t foi adicionado e após 30s o excesso também foi retirado. Finalmente, os grids foram deixados por 2min para a secagem total em temperatura ambiente antes de serem armazenados. Os experimentos foram realizados em um microscópio FEI Tecnai G<sup>2</sup> F20 a 200kV, equipado com uma câmera CCD Eagle 4k HS.

Já para as amostras da crio microscopia seguiu-se o protocolo (MCKENZIE; HOLDER; SOMMERDIJK, 2012). Foi utilizado uma grade Holey Lacey Carbon de 300*mesh* da Ted Pella®. As amostras de crio-EM foram preparadas de forma que o gelo amorfo fosse formado no grid. Resumidamente, antes da parte do procedimento que é automatizado, os grids também foram submetidos ao procedimento de descarga luminescente (15mA por 10 segundos). Em seguida, esses grids foram colocados em um equipamento Vitrobot®, onde adicionou-se 3μL de amostra e esperou-se por 20s para fixação (IANCU *et al.*, 2006). Posteriormente, o excesso de amostra foi retirado e os grids foram rapidamente mergulhados em etano líquido envolvido em um ambiente de nitrogênio líquido. Por fim, foram armazenados em um ambiente com nitrogênio líquido. As medidas foram realizadas em um microscópio JEM-2100 JEOL a 120kV.

Os experimentos de TEM foram realizados no Instituto de Biociências (ICB) da Universidade de São Paulo e o Crio-EM no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-São Paulo. Para a análise das imagens foi utilizado o software ImageJ®. Quando muitas

partículas puderam ser vistas em um campo único, os tamanhos foram calculados e construí-se histogramas com as informações do software.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos

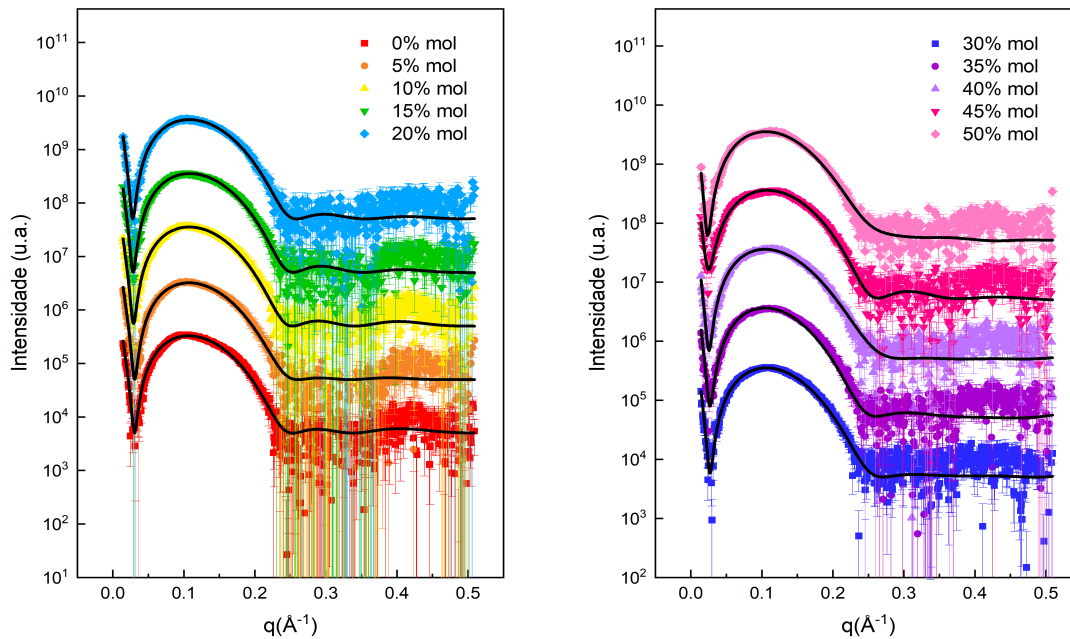
Para obter informações sobre a organização da membrana e sobre a localização das moléculas de líquido iônico na bicamada foram realizados experimentos de SAXS. Depois, utilizando o software Genfit desenvolvido pelo Prof. Francesco Spinozzi, realizou-se os ajustes para as curvas de espalhamento com o modelo *Modified Scattering Density Profile - MSDP* e obteve-se os parâmetros que melhor descreviam os dados (SPINOZZI *et al.*, 2014). Esses parâmetros possuem algumas informações sobre a estrutura interna da bicamada, como por exemplo, seu volume, área ocupada por lipídio e a localização das diferentes grupos químicos da molécula lipídica (KUCERKA; NAGLE *et al.*, 2008). Através dessas informações, conseguiu-se mapear o perfil de densidade eletrônica para os sistemas estudados.

A Figura 15 mostra os resultados das medidas de SAXS e os ajustes realizados para as LUVs compostas por POPC, esfingomiéline e colesterol na razão 2:1:2 na ausência e presença do líquido iônico [C<sub>14</sub>mim]Cl em diferentes concentrações (5mol%, 10mol%, 15mol%, 20mol%, 30mol%, 35mol%, 40mol%, 50mol%).

As curvas experimentais são típicas de uma dispersão de vesículas unilamelares, com um mínimo em  $q \sim 0.05 \text{Å}^{-1}$  que evidencia uma estrutura do tipo core-shell: um região interna (core) coberta por uma “casca” (shell) (FERNANDEZ *et al.*, 2008). Outro fator que se pode notar é a existência de um valor mínimo de intensidade não tão acentuado em comparação com vesículas simples, indicando a presença de não homogeneidade na distribuição lateral de lipídios, isto é, provavelmente os lipídios estão organizados em domínios ou existem poros nas bicamadas (DE ROSA; SPINOZZI; ITRI, 2018).

O modelo MSDP descrito no Capítulo 3 (linha sólida na Figura 15) foi capaz de reproduzir muito bem todo o conjunto de experimentos SAXS e observou-se que a adição de uma quantidade crescente de [C<sub>14</sub>mim]Cl não afetou significativamente o perfil de espalhamento de bicamada.

Como mencionado no Capítulo 1, a organização dos lipídios em vesículas compostas



**Figura 15** – *Curvas SAXS de PC:SM:CL (na razão 2:1:2) na presença de diferentes concentrações de líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ . Os pontos representam os dados experimentais e as linhas pretas o melhor ajuste obtido pela análise com modelo MSDP. As curvas foram multiplicadas por um fator 10 para melhor visualização dos dados.*

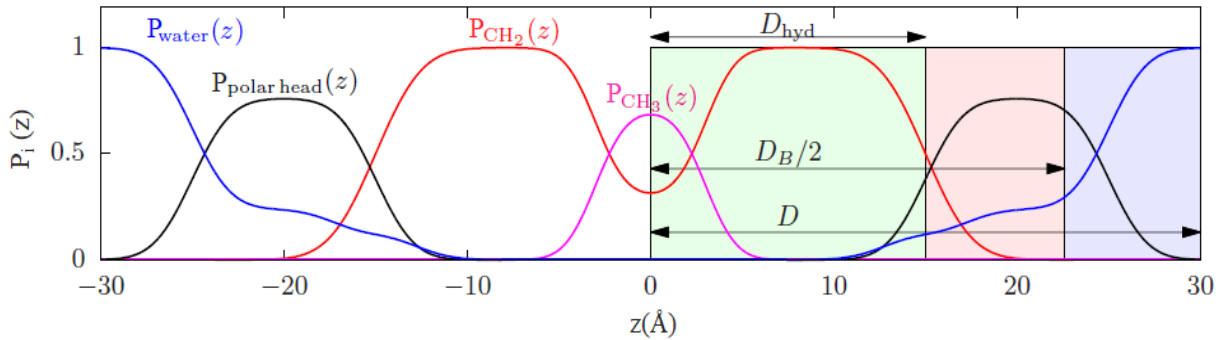
por POPC, esfingomielina e colesterol é bem conhecida. A esfingomielina e o colesterol ficam concentrados em certas regiões da bicamada formando domínios, com os grupos hidroxila do colesterol orientados próximos aos grupos de cabeça polar da esfingomielina (BARBA-BON; NILAM; HENNIG, 2020). Então, como a bicamada é composta por duas regiões distintas – região concentrada em POPC e região concentrada em esfingomielina e colesterol – para realizar o ajuste foi necessário aplicar uma combinação do modelo MSDP nos dados experimentais, um com os parâmetros do lipídio POPC e outro da esfingomielina. O colesterol foi considerado como uma molécula inserida na bicamada, em maior proporção entre as moléculas de esfingomielina, mas também levou-se em conta que uma parte das moléculas poderiam estar nas regiões de POPC.

Para o POPC e a esfingomielina, adotou-se que existem dois grupos hidrofóbicos ( $CH_2$  e  $CH_3$ ) e um grupo polar – como o número de parâmetros totais era alto, preferiu-se considerar a cabeça polar dos lipídios como um grupo, para melhorar a precisão da análise. Já o colesterol foi considerado como um único grupo hidrofóbico. Além disso, uma vez



que buscava-se determinar a localização dos líquidos iônicos na bicamada, considerou-se que é possível encontrar essa molécula tanto na região hidrofóbica da membrana quanto na região da cabeça polar. Desta forma, mais um grupo hidrofóbico e mais grupo polar relacionados com o LI foram adicionados nos ajustes. Também definiu-se o parâmetro  $x_{LI}$  como a fração do número total de moléculas de LI nos sistemas.

Como no modelo MSDP muitos parâmetros são obtidos, as Tabela 3 e Tabela 4 mostram os mais importante para a análise pretendida. Tem-se os principais parâmetros dos diferentes grupos para os lipídios POPC e esfingomiéline: o volume  $v_i$  e o parâmetro relacionado com o comprimento  $w_i$ . O parâmetros da membrana: área por lipídio  $A$ , a espessura hidrofóbica da monocamada  $D_{hyd}$ , a espessura de Luzzati  $D_B$  e a espessura lipídica hidratada  $D$ . E os parâmetros do líquido iônico: o comprimento  $w_{LI}$  da cabeça polar e a sua concentração  $x_{LI}$  no sistema. As posições de pico  $z_i$  de todos os grupos (exceto o terminal  $CH_3$  que é fixado na posição  $z = 0$ ) foram escritos como  $z_i = f_i D_{hyd}$ , onde o parâmetro  $f_i$  ajustado foi deixado variar entre 0 e 1 para o grupo hidrofóbico e de 1 a 3 para os grupos polares. A Figura 16 ilustra um exemplo de distribuições  $P_i(z)$  e parâmetros obtidos no MSDP.



**Figura 16** – Exemplo de distribuição de probabilidade de volume  $P_i(z)$  obtida no modelo MSDP com a indicação da espessura hidrofóbica da monocamada,  $D_{hyd}$ , a espessura Luzzati,  $D_B$  e o comprimento máximo da monocamada hidratada,  $D$ .

Conforme mencionado anteriormente, considerou-se a molécula de colesterol como um único grupo hidrofóbico e obteve-se a sua proporção  $x_{chol}$  presente nas diferentes regiões da bicamada (regiões concentradas em POPC ou em esfingomiéline), e também sua largura  $w_{chol}$  e posição  $f_{chol}$ .

**Tabela 3** – Lista de parâmetros obtidos para o lipídio POPC através da análise das curvas SAXS para as vesículas formadas por PC:SM:CHOL na presença de diferentes concentrações  $x_{LI}$  do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ . A unidade de comprimento é Å.

$x_{LI}$	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
$A$	$64 \pm 1$	$68 \pm 1$	$72 \pm 1$	$73 \pm 2$	$70.4 \pm 0.2$	$73 \pm 1$	$73 \pm 1$	$78 \pm 1$	$85.4 \pm 0.3$	$85.7 \pm 0.7$
$D_{hyd}$	$14.38 \pm 0.24$	$13.87 \pm 0.52$	$14.03 \pm 0.35$	$14.12 \pm 0.46$	$14.58 \pm 0.61$	$14.48 \pm 0.28$	$14.99 \pm 0.20$	$14.51 \pm 0.32$	$12.47 \pm 0.31$	$14.09 \pm 0.04$
$D_B$	$38.8 \pm 0.7$	$39.1 \pm 0.3$	$37 \pm 1$	$36 \pm 1$	$39.8 \pm 0.8$	$39.4 \pm 0.5$	$39 \pm 1$	$38.1 \pm 0.6$	$36.1 \pm 0.2$	$37.6 \pm 0.8$
$2D$	$56.3 \pm 0.2$	$58 \pm 2$	$55 \pm 2$	$54 \pm 2$	$58.3 \pm 0.5$	$59.9 \pm 0.8$	$58 \pm 3$	$58 \pm 2$	$57.6 \pm 0.9$	$54.8 \pm 0.8$
$v_{CH_2}$	$27.2 \pm 0.2$	$27.17 \pm 0.12$	$27.6 \pm 0.1$	$27.64 \pm 0.08$	$27.87 \pm 0.11$	$27.9 \pm 0.1$	$27.9 \pm 0.1$	$27.8 \pm 0.04$	$27.78 \pm 0.07$	$27.9 \pm 0.03$
$r$	$1.99 \pm 0.05$	$1.99 \pm 0.01$	$1.99 \pm 0.02$	$1.99 \pm 0.04$	$1.99 \pm 0.01$	$1.99 \pm 0.1$	$1.99 \pm 0.02$	$1.99 \pm 0.04$	$1.99 \pm 0.01$	$1.99 \pm 0.01$
$v_{pol}$	$328 \pm 2$	$335 \pm 1$	$335 \pm 2$	$335 \pm 4$	$335 \pm 1$	$335 \pm 1$	$335 \pm 2$	$334 \pm 4$	$364 \pm 1$	$365 \pm 1$
$x_{chol}$	$0.31 \pm 0.08$	$0.35 \pm 0.08$	$0.36 \pm 0.06$	$0.32 \pm 0.06$	$0.29 \pm 0.08$	$0.33 \pm 0.06$	$0.34 \pm 0.02$	$0.35 \pm 0.08$	$0.29 \pm 0.07$	$0.35 \pm 0.06$
$v_{chol}$	$534 \pm 14$	$550 \pm 1$	$550 \pm 1$	$554 \pm 2$	$550 \pm 28$	$603 \pm 26$	$610 \pm 1$	$609 \pm 10$	$612 \pm 21$	$626 \pm 2$
$w_{CH_3}$	$3.50 \pm 0.10$	$3.51 \pm 0.22$	$3.50 \pm 0.05$	$3.52 \pm 0.02$	$3.50 \pm 0.01$	$3.52 \pm 0.02$	$3.51 \pm 0.07$	$3.50 \pm 0.09$	$3.00 \pm 0.01$	$3.50 \pm 0.01$
$f_{chol}$	$0.69 \pm 0.02$	$0.69 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.05$	$0.77 \pm 0.05$	$0.82 \pm 0.03$	$0.93 \pm 0.05$	$0.85 \pm 0.01$	$0.91 \pm 0.05$
$w_{chol}$	$3.0 \pm 0.8$	$3.51 \pm 0.04$	$3.01 \pm 0.11$	$3.02 \pm 0.01$	$3.01 \pm 0.01$	$3.03 \pm 0.19$	$3.00 \pm 0.01$	$3.00 \pm 0.36$	$3.02 \pm 0.02$	$3.49 \pm 0.21$
$f_{pol}$	$1.42 \pm 0.15$	$1.38 \pm 0.01$	$1.38 \pm 0.04$	$1.32 \pm 0.04$	$1.26 \pm 0.06$	$1.25 \pm 0.01$	$1.23 \pm 0.01$	$1.27 \pm 0.02$	$1.28 \pm 0.04$	$1.22 \pm 0.02$
$w_{pol}$	$7.55 \pm 0.59$	$7.31 \pm 0.30$	$6.95 \pm 0.66$	$6.14 \pm 0.64$	$5.13 \pm 0.85$	$5.21 \pm 0.37$	$4.96 \pm 0.24$	$5.5 \pm 0.45$	$4.98 \pm 0.61$	$4.90 \pm 0.36$
$f_{LI}$	-	$1.73 \pm 0.13$	$1.81 \pm 0.10$	$1.80 \pm 0.02$	$1.81 \pm 0.03$	$1.86 \pm 0.01$	$1.83 \pm 0.03$	$1.88 \pm 0.02$	$1.79 \pm 0.05$	$1.79 \pm 0.03$
$w_{LI}$	-	$3.17 \pm 0.41$	$2.50 \pm 0.04$	$2.701 \pm 0.016$	$2.50 \pm 0.47$	$1.76 \pm 0.06$	$2.50 \pm 0.08$	$2.51 \pm 0.15$	$2.51 \pm 0.39$	$2.50 \pm 0.33$

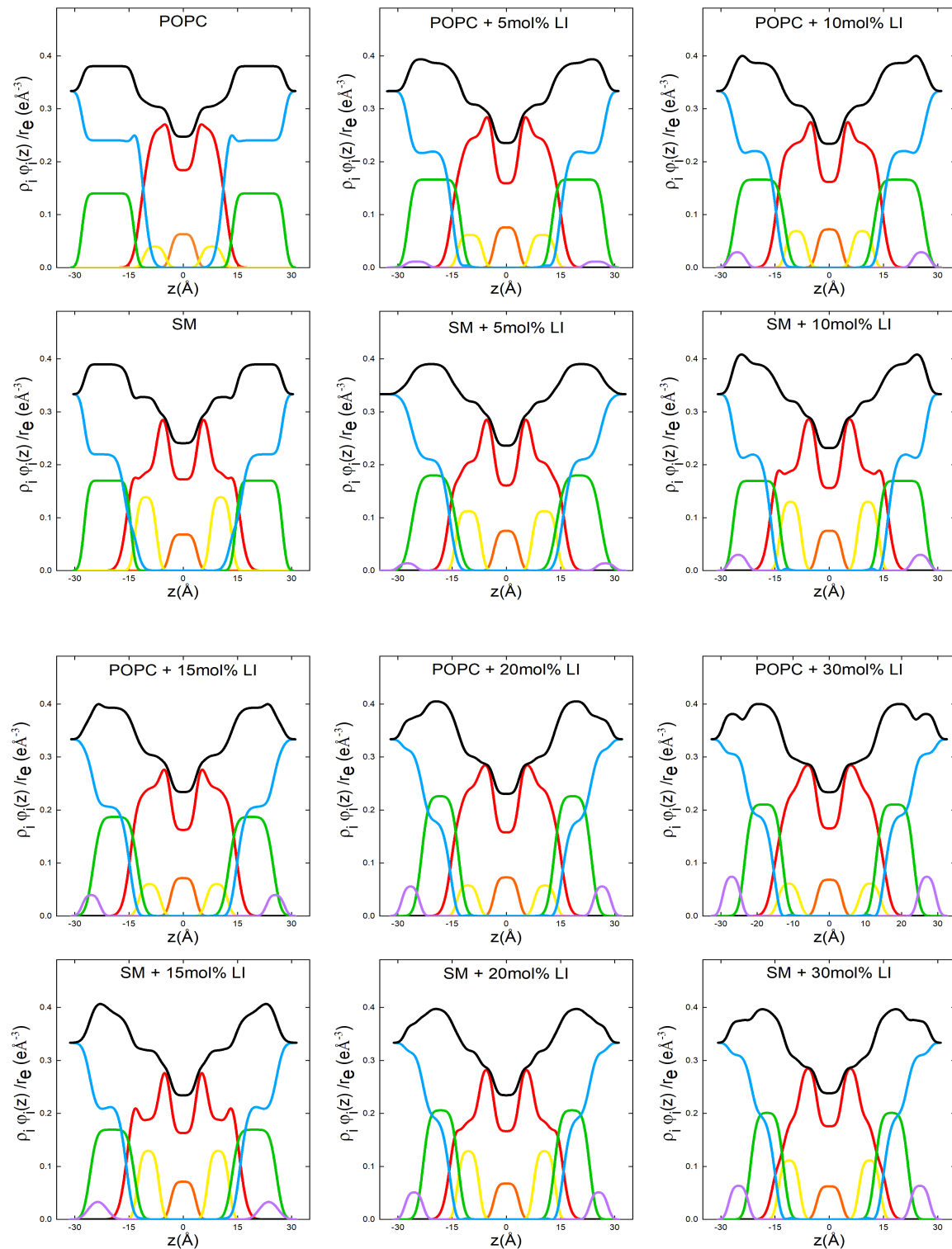
**Legenda:**  $v_i$  é o volume molecular do grupo químico representado,  $w_i$  é a largura da distribuição do  $i$ -ésimo grupo químico.  $A$  é a área da secção transversal da cabeça polar dos lipídeos,  $D_{hyd}$  a espessura hidrofóbica da monocamada,  $D_B$  a espessura Luzzati e  $D$  a espessura lipídica hidratada de uma monocamada. Com relação aos líquidos iônicos:  $w_{LI}$  é a largura da cabeça polar, sendo sua concentração  $x_{LI}$ . As posições de pico  $z_i$  de todos os grupos (exceto o terminal  $CH_3$  que é fixado na posição  $z = 0$ ) foram escritos como  $z_i = f_i D_{hyd}$ , onde o parâmetro  $f_i$  ajustado foi deixado variar entre 0 e 1 para o grupo hidrofóbico e de 1 a 3 para os grupos polares.

**Tabela 4** – Lista de parâmetros obtidos para o lipídio esfingomiélinea através da análise das curvas SAXS para as vesículas formadas por PC:SM:CHOL na presença de diferentes concentrações  $x_{LI}$  do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ . A unidade de comprimento é Å.

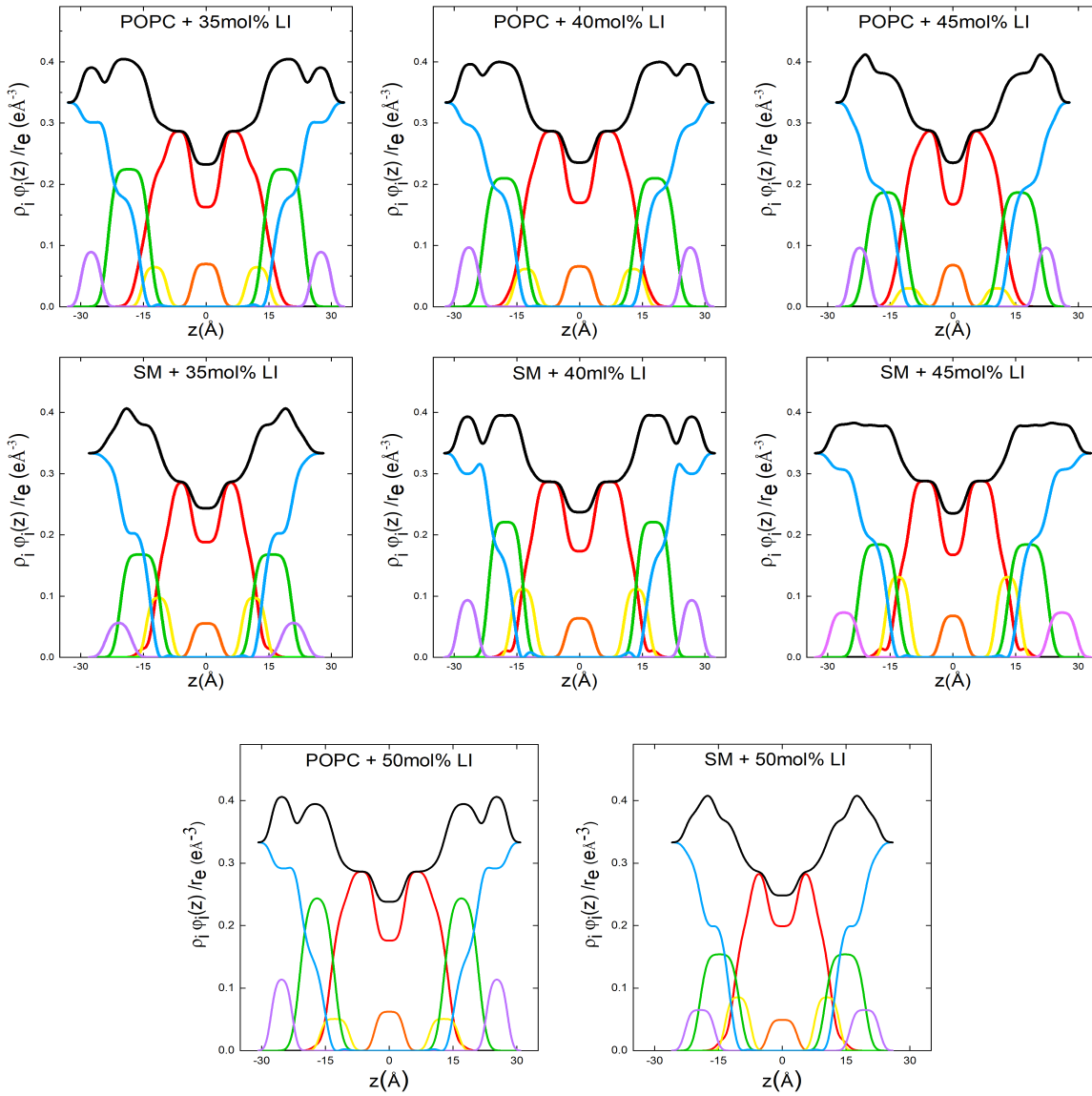
$x_{LI}$	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
$A$	$68 \pm 1$	$69 \pm 1$	$73 \pm 1$	$74 \pm 1$	$81 \pm 5$	$80 \pm 3$	$80 \pm 3$	$83 \pm 4$	$87 \pm 1$	$87 \pm 1$
$D_{hyd}$	$14.9 \pm 0.7$	$14.72 \pm 0.37$	$15.57 \pm 0.72$	$15.11 \pm 0.33$	$14.88 \pm 0.97$	$14.24 \pm 1$	$12.74 \pm 0.42$	$14.85 \pm 0.53$	$14.75 \pm 0.13$	$11.85 \pm 0.26$
$D_B$	$38.5 \pm 0.3$	$39.04 \pm 0.36$	$39 \pm 1$	$38 \pm 2$	$38.9 \pm 0.4$	$34 \pm 2$	$34 \pm 1$	$41 \pm 2$	$39 \pm 2.00$	$36.32 \pm 0.14$
$2D$	$54.8 \pm 0.2$	$58 \pm 3$	$57 \pm 2$	$54 \pm 2$	$57 \pm 3$	$49 \pm 6$	$50 \pm 3$	$58 \pm 1$	$56 \pm 3$	$55 \pm 1$
$v_{pol,m}$	$308 \pm 7$	$300 \pm 3$	$299 \pm 4$	$306 \pm 5$	$309 \pm 6$	$306 \pm 9$	$322 \pm 1$	$321 \pm 5$	$337 \pm 5$	$337 \pm 1$
$w_{CH_3}$	$3.83 \pm 0.67$	$3.5 \pm 0.4$	$3.51 \pm 0.11$	$3.50 \pm 0.02$	$3.53 \pm 0.11$	$3.53 \pm 0.29$	$3.50 \pm 0.02$	$3.58 \pm 0.04$	$3.12 \pm 0.76$	$3.5 \pm 0.01$
$f_{chol}$	$0.69 \pm 0.02$	$0.69 \pm 0.01$	$0.68 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.05$	$0.70 \pm 0.02$	$0.78 \pm 0.05$	$0.89 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.05$	$0.89 \pm 0.02$	$0.88 \pm 0.05$
$w_{chol}$	$3.01 \pm 0.02$	$3.5 \pm 0.3$	$3.01 \pm 0.02$	$3.03 \pm 0.02$	$3.01 \pm 0.23$	$3.0 \pm 1.35$	$1.18 \pm 0.03$	$3.01 \pm 0.06$	$3.00 \pm 0.02$	$3.00 \pm 0.03$
$f_{pol}$	$1.41 \pm 0.07$	$1.32 \pm 0.04$	$1.29 \pm 0.06$	$1.30 \pm 0.05$	$1.22 \pm 0.02$	$1.21 \pm 0.08$	$1.23 \pm 0.07$	$1.18 \pm 0.03$	$1.21 \pm 0.01$	$1.24 \pm 0.05$
$w_{pol}$	$6.43 \pm 0.65$	$6.11 \pm 0.88$	$6.5 \pm 0.6$	$6.14 \pm 0.64$	$4.84 \pm 0.68$	$4.57 \pm 0.37$	$4.82 \pm 0.24$	$4.23 \pm 0.45$	$4.80 \pm 0.36$	$4.66 \pm 0.36$
$f_{LI}$	-	$1.81 \pm 0.04$	$1.61 \pm 0.03$	$1.56 \pm 0.03$	$1.71 \pm 0.06$	$1.76 \pm 0.06$	$1.64 \pm 0.03$	$1.78 \pm 0.06$	$1.77 \pm 0.05$	$1.63 \pm 0.06$
$w_{LI}$	-	$2.55 \pm 0.51$	$2.52 \pm 0.32$	$2.72 \pm 0.12$	$2.56 \pm 0.15$	$2.73 \pm 0.43$	$3.13 \pm 0.21$	$2.50 \pm 0.44$	$3.46 \pm 0.51$	$3.49 \pm 0.13$

**Legenda:**  $v_i$  é o volume molecular do grupo químico representado,  $w_i$  é a largura da distribuição do  $i$ -ésimo grupo químico.  $A$  é a área da secção transversal da cabeça polar dos lipídeos,  $D_{hyd}$  a espessura hidrofóbica da monocamada,  $D_B$  a espessura Luzzati e  $D$  a espessura lipídica hidratada de uma monocamada. Com relação aos líquidos iônicos:  $w_{LI}$  é a largura da cabeça polar, sendo sua concentração  $x_{LI}$ . As posições de pico  $z_i$  de todos os grupos (exceto o terminal  $CH_3$  que é fixado na posição  $z = 0$ ) foram escritos como  $z_i = f_i D_{hyd}$ , onde o parâmetro  $f_i$  ajustado foi deixado variar entre 0 e 1 para o grupo hidrofóbico e de 1 a 3 para os grupos polares.

Também obteve-se todas as densidades eletrônicas dos sistemas investigados e construiu-se os gráficos apresentados na Figura 17 e Figura 18.



**Figura 17** – Densidades eletrônicas de grupos químicos obtidas pela análise de dados SAXS. Os códigos de cores correspondem a  $\text{CH}_2$  (vermelho),  $\text{CH}_3$  (laranja), cabeça polar (verde), colesterol (amarelo), cabeça polar do líquido iônico (roxo),  $\text{H}_2\text{O}$  (azul). As curvas pretas representam a densidade de elétrons total  $\rho$  do sistema.



**Figura 18** – Densidades eletrônicas de grupos químicos obtidas pela análise de dados SAXS. Os códigos de cores correspondem a  $\text{CH}_2$  (vermelho),  $\text{CH}_3$  (laranja), cabeça polar (verde), colesterol (amarelo), cabeça polar do líquido iônico (roxo),  $\text{H}_2\text{O}$  (azul). As curvas pretas representam a densidade de elétrons total  $\rho$  do sistema.

Por meio das Tabelas 3 e 4, pode-se comparar os valores de alguns parâmetros característicos obtidos para o POPC e SM utilizando o método MSDP com outros métodos na literatura. O valor obtido para a área por lipídio para o POPC foi de  $A = (64 \pm 1) \text{Å}^2$  e está de acordo com os dados previamente relatados utilizando o método SPD de  $(64.4 \pm 1.3) \text{Å}^2$  (HEFTBERGER *et al.*, 2014). Além do mais, os valores de  $D_B = (38.8 \pm 0.7) \text{Å}$  e  $D_{hyd} = (14.38 \pm 0.24) \text{Å}$  encontrados para POPC também concordam com os resultados obtidos nesse mesmo estudo utilizando o modelo SPD, respectivamente  $(39.0 \pm 0.8) \text{Å}$  e

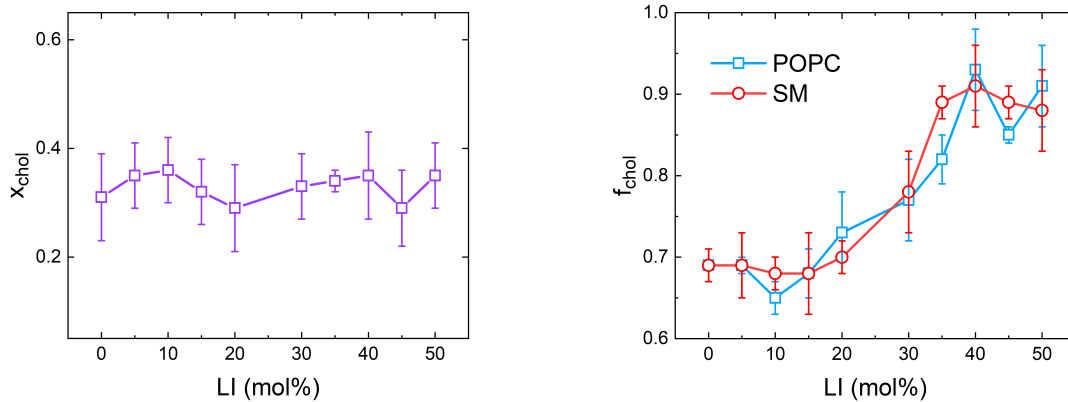
$(14.4 \pm 0.3)\text{\AA}$  (HEFTBERGER *et al.*, 2014).

Para a esfingomielina o valor da área por lipídio obtida foi  $A = (68 \pm 1)\text{\AA}^2$ , valor próximo do resultado  $(62.5 \pm 1.3)\text{\AA}^2$  obtido para bicamadas de esfingomielina (HEBERLE *et al.*, 2017). Da mesma forma, os parâmetros encontrados para  $D_B = (38.5 \pm 0.3)\text{\AA}$  e para  $D_{hyd} = (14.9 \pm 0.7)\text{\AA}$  estão em concordância com os obtidos no estudo citado acima, respectivamente  $(39.3 \pm 0.8)\text{\AA}$  e  $(15.02 \pm 0.3)\text{\AA}$ . Para a cabeça polar temos que seu comprimento (largura  $w_i$  da curva) seria de  $(6.43 \pm 0.28)\text{\AA}$ . No trabalho de Heberle *et al.* (2017) a região da cabeça polar da esfingomielina foi dividida em três grupos, somando os valores obtidos para o comprimento de cada grupo dessa divisão tem-se que tamanho da cabeça polar é aproximadamente  $(7.55 \pm 0.15)\text{\AA}$ , um valor  $1.12\text{\AA}$  maior em comparação com o valor de  $(6.43 \pm 0.28)\text{\AA}$  encontrado com o modelo utilizado nesse trabalho. Essa diferença pode ocorrer devido a presença de outros lipídios na membrana, que alteraram a organização da esfingomielina na bicamada, e também a temperatura em que a mesma se encontra.

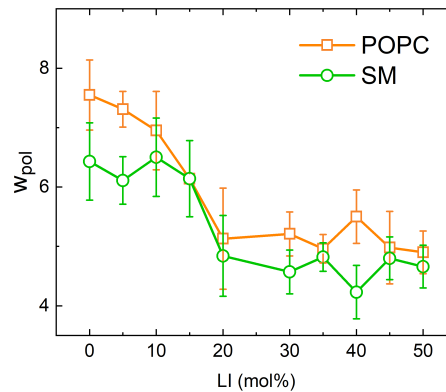
O volume das molécula de colesterol na ausência do líquido iônico  $V_L = (550 \pm 2)\text{\AA}^3$  difere daqueles relatados por estudos anteriores utilizando outros métodos (PAN *et al.*, 2012). Porém, isso é esperado já que a disposição do colesterol na membrana varia bastante com as diferentes composições da membrana e a temperatura em que a mesma se encontra (GREENWOOD; TRISTRAM-NAGLE; NAGLE, 2006).

Em relação a posição do colesterol na membrana, tem-se que a maioria das moléculas está concentrada nas regiões da bicamada ricas em esfingomielina como apresentado nas Tabela 3 e Tabela 4. O parâmetro  $x_{chol}$  que representa a proporção de colesterol nas moléculas de POPC possui valores próximos que variam entre 0.29 e 0.36 independente das diferentes concentrações de líquido iônico, como pode ser visto na Figura 19. Esse resultado corrobora com o fato de que as moléculas de colesterol e esfingomielina ficam concentradas em algumas regiões da membrana formando os domínios, como relatado em diversos trabalhos na literatura (NICOLSON, 2014; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008; BUNGE *et al.*, 2008; FRAZIER *et al.*, 2007).

Com a adição do líquido iônico é possível ver nas Tabela 3 e Tabela 4 que não há uma mudança significativa na maioria dos parâmetros estruturais da membrana tanto



(a) Proporção de colesterol  $x_{chol}$  nas moléculas de POPC em função das concentrações de LI. (b) Posição da molécula de colesterol  $f_{chol}$  na bicamada em função das concentrações de LI



(c) Tamanho da cabeça polar dos lipídios  $w_{pol}$  em função das concentrações de LI.

**Figura 19** – Parâmetros  $x_{chol}$ ,  $f_{chol}$  e  $w_{pol}$  obtidos pelo ajuste das curvas SAXS em função da concentrações de líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ . O  $x_{chol}$  representa a proporção de colesterol nas moléculas de POPC, o  $f_{chol}$  a posição das moléculas de colesterol na membrana e  $w_{pol}$  está relacionado com o tamanho da cabeça polar dos lipídios POPC e esfingomiélinea.

para o POPC como a esfingomiélinea. Os valores de  $D_{hyd}$ ,  $D_B$ , dos volumes e tamanhos dos grupos moleculares possuem valores próximos independente da concentração de LI. Porém, é possível ver um aumento gradual da área por lipídio  $A$ . Para o POPC, seu valor inicial de  $(64 \pm 1)\text{Å}^2$  alcança  $(85.7 \pm 0.7)\text{Å}^2$  para os sistemas com 50% de LI. Já no caso da esfingomiélinea, o valor se altera de  $(68 \pm 1)\text{Å}^2$  para  $(87 \pm 1)\text{Å}^2$ .

Outro parâmetro modificado é o volume ocupado pela cabeça polar. Como apresentado na Figura 19, o valor de  $w_{pol}$  relacionado com a largura da distribuição de volume da

cabeça polar diminui a medida que a concentração de LI aumenta. No caso do POPC,  $w_{pol}$  muda de  $(7.55 \pm 0.15)\text{Å}$  para  $(4.90 \pm 0.36)\text{Å}$ , e no caso da esfingomielina, de  $(6.43 \pm 0.65)\text{Å}$  para  $(4.66 \pm 0.36)\text{Å}$ . Esse decréscimo pode significar que líquido iônico está comprimindo a membrana.

A Figura 19 também mostra que posição do colesterol  $f_{chol}$  é alterada conforme o  $[\text{C}_{14}\text{mim}]\text{Cl}$  é adicionado. Os valores variam de  $(0.69 \pm 0.02)$  para  $(0.91 \pm 0.05)$  e de  $(0.69 \pm 0.02)$  para  $(0.88 \pm 0.05)$  para o POPC e esfingomielina, respectivamente. Isto é, a molécula de colesterol se aproxima cada vez mais da região polar do POPC e esfingomielina.

Através dos parâmetros  $f_{LI}$  e  $w_{LI}$  referentes a cabeça polar do líquido iônico foi possível determinar a posição da molécula ao longo da bicamada. Como apresentado nas Figuras 17 e 18 e nas Tabelas 3 e 4, os valores da posição  $f_{LI}$  são maiores que 1.0 para todos os sistemas, variando sempre em torno de 1.80, revelando que as moléculas de  $[\text{C}_{14}\text{mim}]\text{Cl}$  estão na região polar dos lipídios.

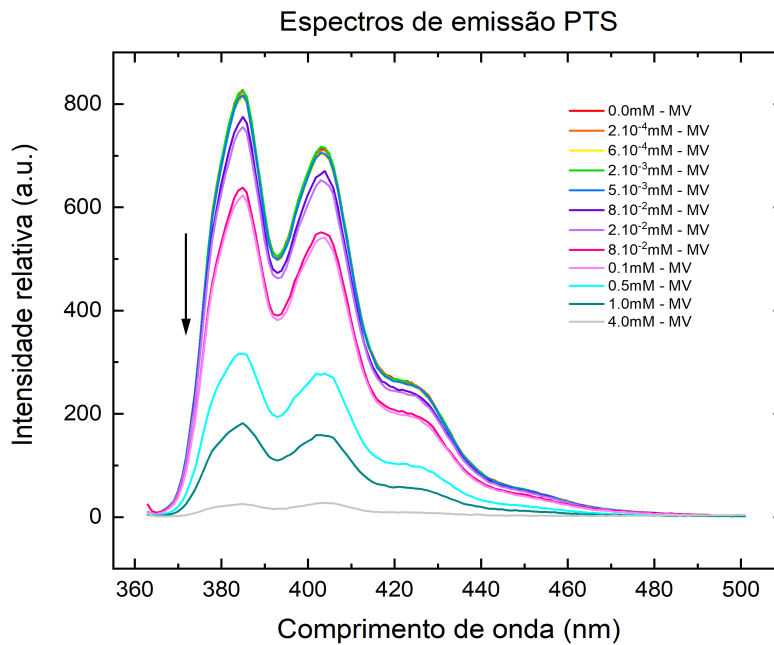
Além disso,  $f_{LI}$  é sempre maior que o parâmetro  $f_{pol}$  da posição da cabeça polar do POPC e esfingomielina, independente da concentração de LI, inferindo que os grupos de cabeças do líquido iônico estão concentrados na parte externa da membrana ao redor da bicamada, não sendo capaz de penetrar na membrana.

## 4.2 Espectroscopia de fluorescência - Supressão de Fluorescência

Nas medidas de vazamento, utilizou-se como par fluoróforo/supressor a sonda PTS e o metil viologênio. Primeiro foi necessário determinar qual a concentração adequada de metil viologênio para suprimir a fluorescência do PTS. Para isso, preparou-se o fluoróforo na concentração de  $0.17\mu\text{M}$  em tampão PBS  $10\text{mM}$  pH 7.4 e registrou-se seus espectros de emissão ( $\lambda_{exc} = 355\text{nm}$ ) na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor MV ( $0\text{mM}$ ,  $2.10^{-4}\text{mM}$ ,  $2.10^{-3}$ ,  $5.10^{-3}\text{mM}$ ,  $8.10^{-3}\text{mM}$ ,  $2.10^{-2}\text{mM}$ ,  $8.10^{-2}\text{mM}$ ,  $0.1\text{mM}$ ,  $0.5\text{mM}$ ,  $1\text{mM}$  e  $4\text{mM}$ ). A Figura 20 mostra os espectros de emissão obtidos.

Depois, utilizando os valores das intensidades de fluorescência para  $\lambda = 385\text{nm}$ , construiu-se um gráfico em função da concentração do MV, como apresentado na Figura 21. Através desse gráfico, é possível observar que o decaimento das intensidades tem um

comportamento exponencial, e que concentrações de MV maiores que  $1mM$  contribuem pouco para a diminuição da intensidade de fluorescência do PTS. Como a adição de MV aumenta muito a força iônica do meio o que pode modificar a interação do líquido iônico com os sistemas biomiméticos de membrana, visto que provavelmente essa interação tenha cunho eletrostático, optamos por realizar o experimentos de vazamento com concentrações de MV da ordem de  $1mM$ .

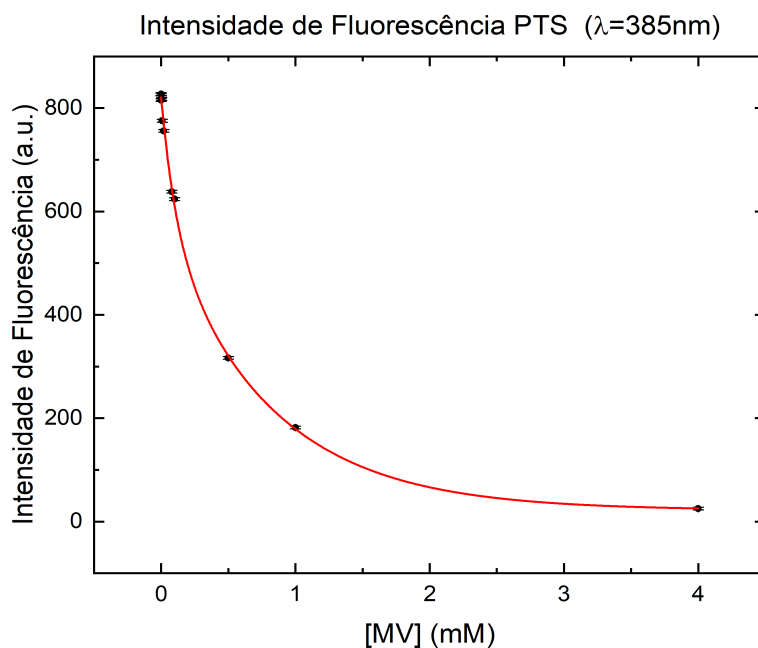


**Figura 20** – Espectros de emissão do fluoróforo  $[PTS] = 0.17\mu M$  com diferentes concentrações do supressor metil viologênio (de cima para baixo  $[MV] = 0mM, 2.10^{-4}mM, 2.10^{-3}, 5.10^{-3}mM, 8.10^{-3}mM, 2.10^{-2}mM, 8.10^{-2}mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM$  e  $4mM$ ). A seta indica a direção de aumento da concentração do supressor MV.

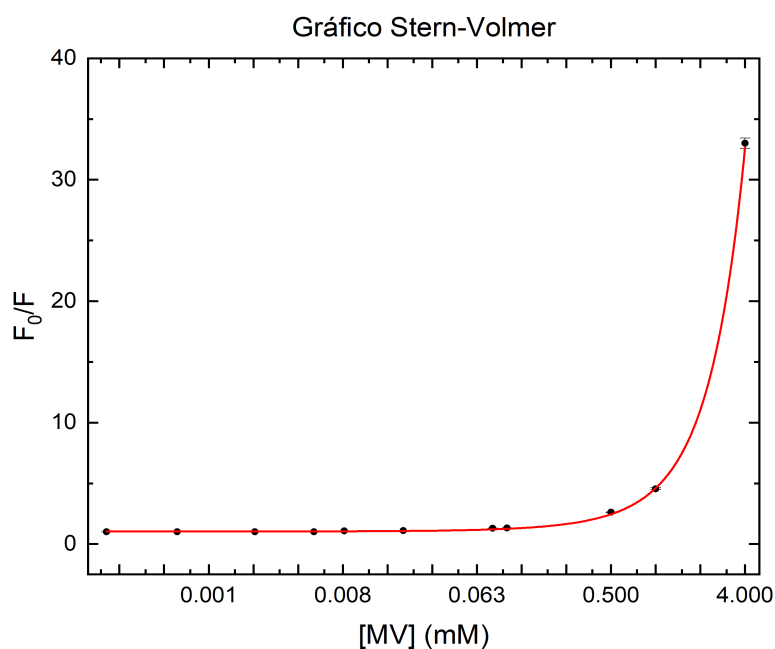
Para determinar os mecanismos de supressão entre o PTS e MV construiu-se um gráfico da razão das intensidades de fluorescência na ausência ( $F_0$ ) e presença ( $F$ ) do supressor (gráfico de Stern-Volmer). Como é possível ver na Figura 22 o comportamento do gráfico não é linear, então provavelmente está ocorrendo os dois tipos de supressão. Por isso, ajustou-se a Equação (24) que pode ser modificada para permitir uma separação gráfica das constantes  $K_S$  e  $K_D$  (LAKOWICZ, 1983):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (31)$$





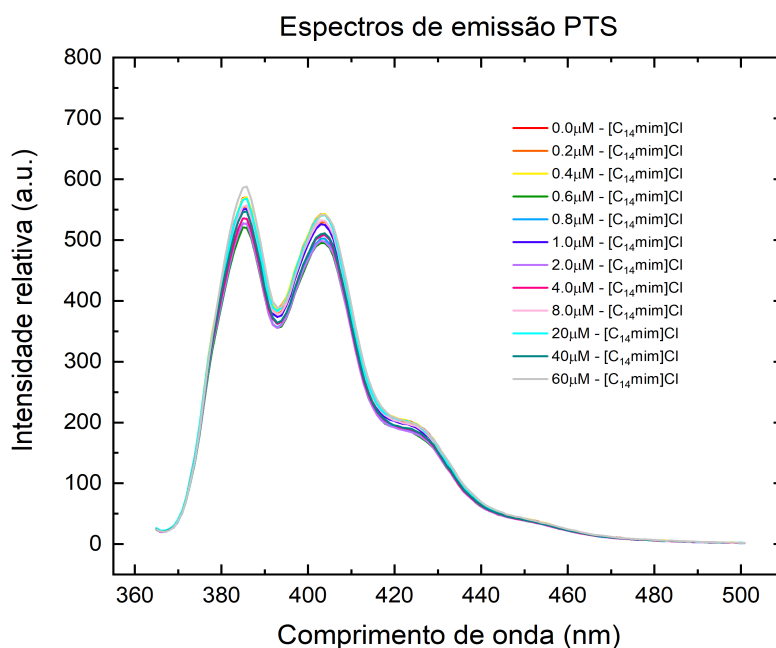
**Figura 21** – Gráfico com os valores de intensidade de fluorescência para o comprimento de onda  $\lambda = 385\text{nm}$  em função das diferentes concentrações de metil viologênio. A curva vermelha representa o ajuste de uma exponencial.



**Figura 22** – Gráfico da razão da intensidade de fluorescência na ausência ( $F_0$ ) e na presença de diferentes concentrações de MV ( $F$ ), em função da concentração do supressor MV, para o comprimento de onda  $\lambda = 385\text{nm}$ . A curva vermelha representa o ajuste da função quadrática. O eixo x está em escala logarítmica para facilitar a visualização do ajuste.

Ajustando a Equação (31), obteve-se os coeficiente  $K_D K_S = (1.15 \pm 0.19)mM^{-1}$  e  $(K_D + K_S) = (2.88 \pm 0.22)mM^{-1}$  e com isso foi possível calcular os valores  $2.40mM^{-1}$  e  $0.48mM^{-1}$ . De acordo com Santana *et al.* (2014) em altas concentrações de sal, para o par PTS/MV o mecanismo de supressão estática é predominante, logo é possível concluir que o maior valor encontrado de  $2.40mM^{-1}$  corresponde a  $K_S$  e o menor valor de  $0.48mM^{-1}$  a  $K_D$ .

Em seguida, foram realizadas as medidas de vazamento para as vesículas a  $0.2mM$  em tampão PBS  $10mM$  pH 7.4, com a composição lipídica de 40% POPC, 40% de colesterol e 20% de esfingomiélna, na ausência e presença de diferentes concentrações de líquido iônico ( $0.2\mu M$ ,  $0.4\mu M$ ,  $0.6\mu M$ ,  $0.8\mu M$ ,  $1.0\mu M$ ,  $2.0\mu M$ ,  $4.0\mu M$ ,  $8.0\mu M$ ,  $20\mu M$ ,  $40\mu M$ ,  $60\mu M$ ). A Figura 23 mostra os espectros obtidos.



**Figura 23** – Espectros de emissão das vesículas lipídicas a  $0.2mM$  de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 encapsuladas com PTS ( $[PTS]=1.10^{-2}mM$ ) em uma solução com  $2mM$  de metil viologênio. Foram adicionados diferentes concentrações de  $[C_{14}mim]Cl$  (de cima para baixo  $0.2\mu M$ ,  $0.4\mu M$ ,  $0.6\mu M$ ,  $0.8\mu M$ ,  $1.0\mu M$ ,  $2.0\mu M$ ,  $4.0\mu M$ ,  $8.0\mu M$ ,  $20\mu M$ ,  $40\mu M$ ,  $60\mu M$ ).

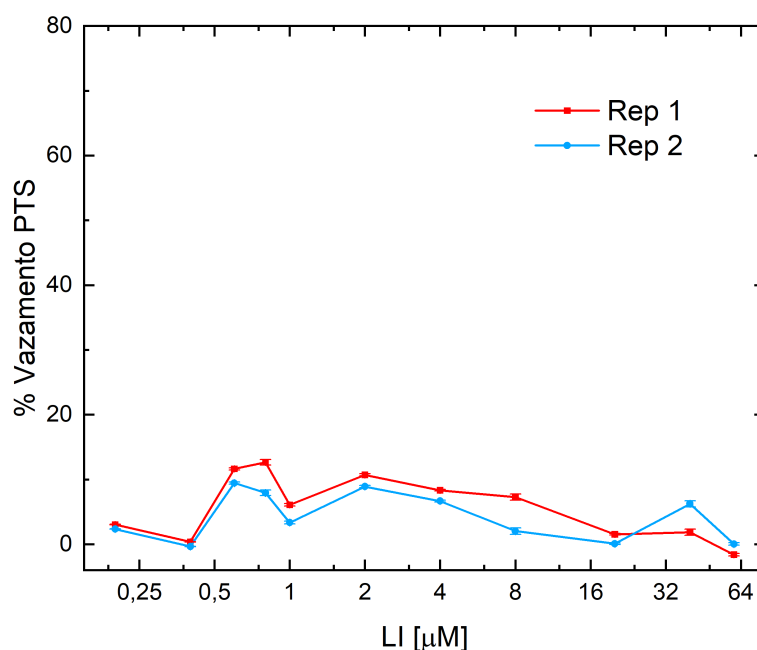
Depois, utilizando esses espectros de fluorescência, calculou-se a porcentagem de

vazamento pela expressão:

$$\text{Vazamento}(\%) = 100 \left( \frac{F_{max} - F}{F_{max} - F_{min}} \right) \quad (32)$$

onde  $F_{max}$  e  $F_{min}$  correspondem, respectivamente, aos valores de fluorescência medidos sem líquido iônico (0% de vazamento) e simulando um sistema onde o metil viologênio suprime toda a fluorescência de PTS (vazamento 100%), e  $F$  corresponde a intensidade das curvas com as respectivas concentrações de líquido iônico onde porcentagem de vazamento é determinada.

É possível ver pelo gráfico da Figura 23 que mesmo quando a concentração de LI aumenta, não temos uma diminuição significativa na intensidade de fluorescência. As curvas permanecem sempre próximas do mesmo valor de intensidade independentemente da concentração do líquido iônico, indicando que possivelmente o líquido iônico não ocasionou poros na bicamada.



**Figura 24** – Valores do percentual de vazamento para as vesículas lipídicas a 0.2mM de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 para as diferentes concentrações de líquido iônico. As duas repetições realizadas são apresentadas. O eixo x está em escala logarítmica para facilitar a visualização dos dados.

Esse fato é confirmado pelos valores obtidos para as porcentagem de vazamento

mostrados na Figura 24. Mesmo quando o  $[C_{14}mim]Cl$  aumenta não temos diferença na porcentagem, todos os valores se encontram menores que 20%, indicando que não ocorreu a permeabilização da membrana.

### 4.3 Espalhamento de Luz Dinâmico

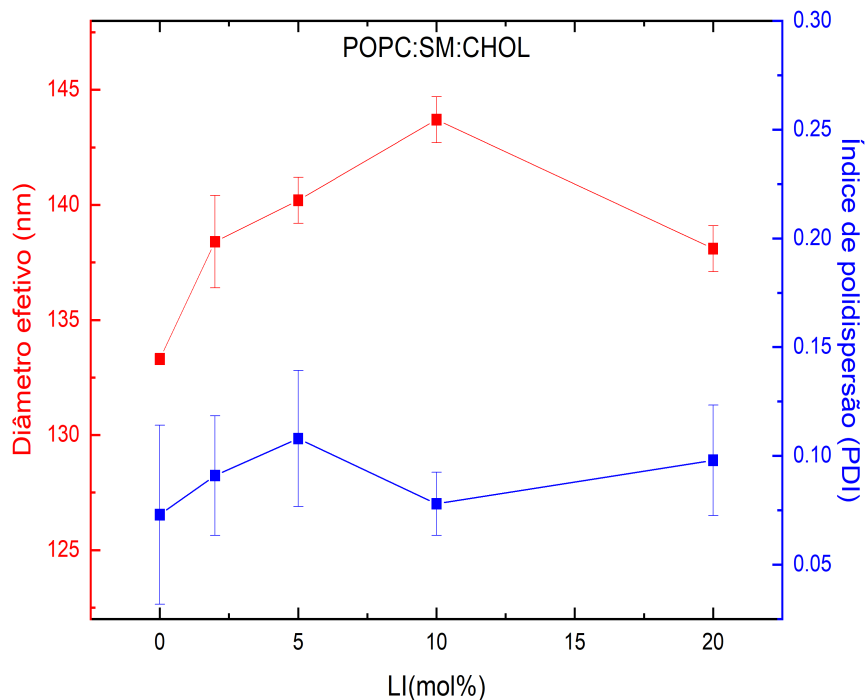
A análise dos dados de espalhamento dinâmico de luz forneceu informações importantes sobre a polidispersão e o tamanho médio das partículas dos sistemas estudados.

Diante dos resultados anteriores, evidentemente o líquido iônico é capaz de interagir com a bicamada lipídica. Então, para avaliar se o  $[C_{14}mim]Cl$  se concentra ou não na região externa ao redor da bicamada, mediu-se o diâmetro efetivo das lipossomas antes e após a sua adição na solução. Caso o LI estivesse localizado nessa região externa da membrana, um aumento do tamanho seria observado.

Os dados de DLS para amostras preparadas com as vesículas de POPC, esfingomielina e colesterol na razão 2:1:2 com diferentes concentrações de líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$  são mostrados na Figura 25. É importante ressaltar que o máximo de líquido iônico adicionado foi 20%*mol*, pois a partir dessa concentração é possível notar que as medidas do DLS são afetadas, provavelmente devido a efeitos das interações eletrostáticas em consequência da carga do líquido iônico.

O diâmetro obtido para as amostras sem líquido iônico foi  $(133.3 \pm 0.3)nm$ , próximo do esperado visto que as vesículas foram extrusadas com filtros de 100nm. Em relação ao índice de polidispersão obteve-se um valor menor que 0.2, indicando amostras monodispersas. Para as amostras com 2%*mol* de líquido iônico é possível observar que o diâmetro obtido aumenta para  $(138 \pm 2)nm$ , valor aproximadamente 4% maior que o sistema sem o LI, com um valor do PDI de  $(0.09 \pm 0.03)$ , indicando mais um vez um sistema monodisperso.

Os diâmetros para 5%*mol*, 10%*mol* e 20%*mol*, possuem valores próximos comparados com o sistema com 2%*mol*, com todos os PDI menores que 0.2 apontando sistemas monodispersos. Para os sistemas com 5%*mol* de líquido iônico, o valor obtido foi  $(140.2 \pm 1)nm$ , com um PDI de  $(0.11 \pm 0.03)$ . Para os sistemas com 10%*mol*, o valor foi



**Figura 25** – Resultados obtidos no experimento de DLS para as vesículas lipídicas de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 para as diferentes concentrações do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ . Em vermelho os valores dos diâmetros hidrodinâmicos e em azul os valores dos índices de polidispersão.

de  $(143.7 \pm 1)nm$  e o PDI de  $(0.08 \pm 0.01)$ . E por fim, para o sistema com 20%mol de LI, o diâmetro efetivo foi  $(138.1 \pm 1)nm$  com um PDI  $(0.09 \pm 0.02)$ .

Com esses resultados percebe-se que há um aumento de aproximadamente até 8% no tamanho das partículas conforme o  $[C_{14}mim]Cl$  foi adicionado, o que faz acreditar que as moléculas de LI se concentram na região externa da bicamada interagindo com a cabeça lipídica, corroborando com os dados da análises de SAXS e também com outros estudos que demonstram um comportamento semelhante para sistemas com membranas e surfactantes (RISKE *et al.*, 2017; LÓPEZ *et al.*, 1998).

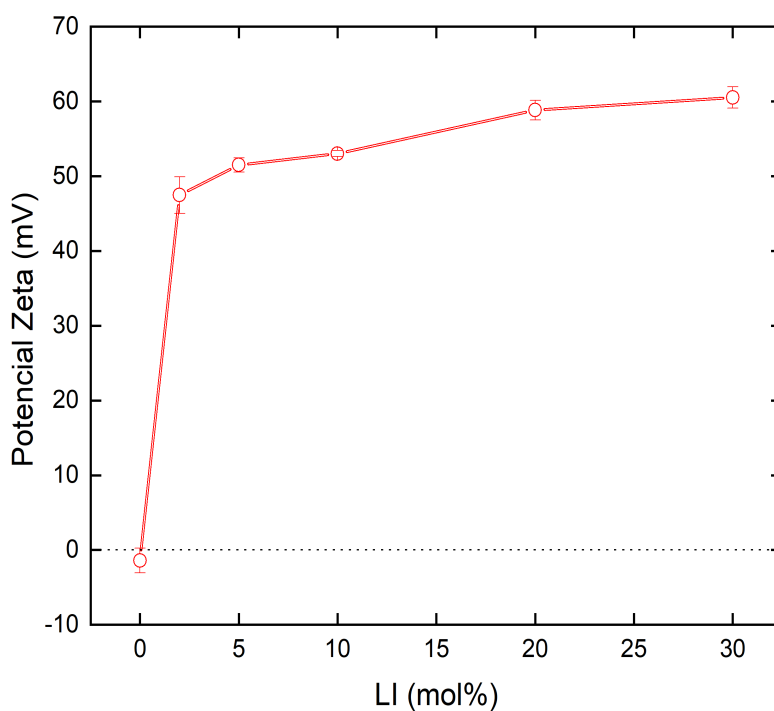
#### 4.4 Potencial Zeta

Os dados de DLS combinados com a análise SAXS indicam que para os sistemas investigados provavelmente as moléculas de líquido iônico se concentram na região externa da bicamada. Ainda é possível verificar a influência do LI na carga superficial de LUVs

através de medidas de potencial zeta.

Como o líquido iônico utilizado é de natureza catiônica espera-se que ocorra um aumento (para valores positivos) do potencial zeta para maiores concentrações do líquido iônico. Vale ressaltar que as concentrações de líquido iônico usadas foram até 30%mol, novamente na tentativa de reduzir os efeitos das interações eletrostáticas.

Os resultados para os sistemas com vesículas de POPC, esfingomiéline e colesterol sem líquido iônico e com diferentes concentrações de líquido iônico são apresentados na Figura 26.



**Figura 26** – Valores de potencial zeta para as vesículas lipídicas de PC:SM:CHOL na razão 2:1:2 para as diferentes concentrações do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ .

Dependendo da concentração de colesterol, o potencial zeta pode ser alterado devido a interação entre os grupos dos fosfolípidios e o grupo hidroxila do colesterol (SZCZEŚ, 2013). Comparando o valor do potencial zeta obtidos por Szcześ (2013) para vesículas compostas por lípidios zwitteriônicos e colesterol – da ordem de  $-5mV$  para vesículas com 50% de colesterol e  $+5mV$  para vesículas com 25%mol de colesterol – o valor de  $(-1.4 \pm 1.6)mV$  para as vesículas sem LI alcançado nesse trabalho encontra-se

nesse intervalo.

Com a adição do líquido iônico, verifica-se um grande aumento positivo no valor do potencial zeta. Para os sistemas com 2%mol de [C<sub>14</sub>mim]Cl é possível observar um salto: o valor do potencial zeta passa de  $(-1.4 \pm 1.6mV)$  para  $(47 \pm 2)mV$ . Depois, conforme a concentração de líquido iônico aumenta, nota-se uma tendência significativa de saturação. Os valores de potencial zeta tendem a alcançar um plato: para os sistemas com 5%mol de LI tem-se  $(51 \pm 1)mV$ , para 10%mol o valor  $(53.0 \pm 0.4)mV$  e para 20%mol e 30%mol os valores  $(59 \pm 1)mV$  e  $(61.5 \pm 1.4)mV$ , respectivamente.

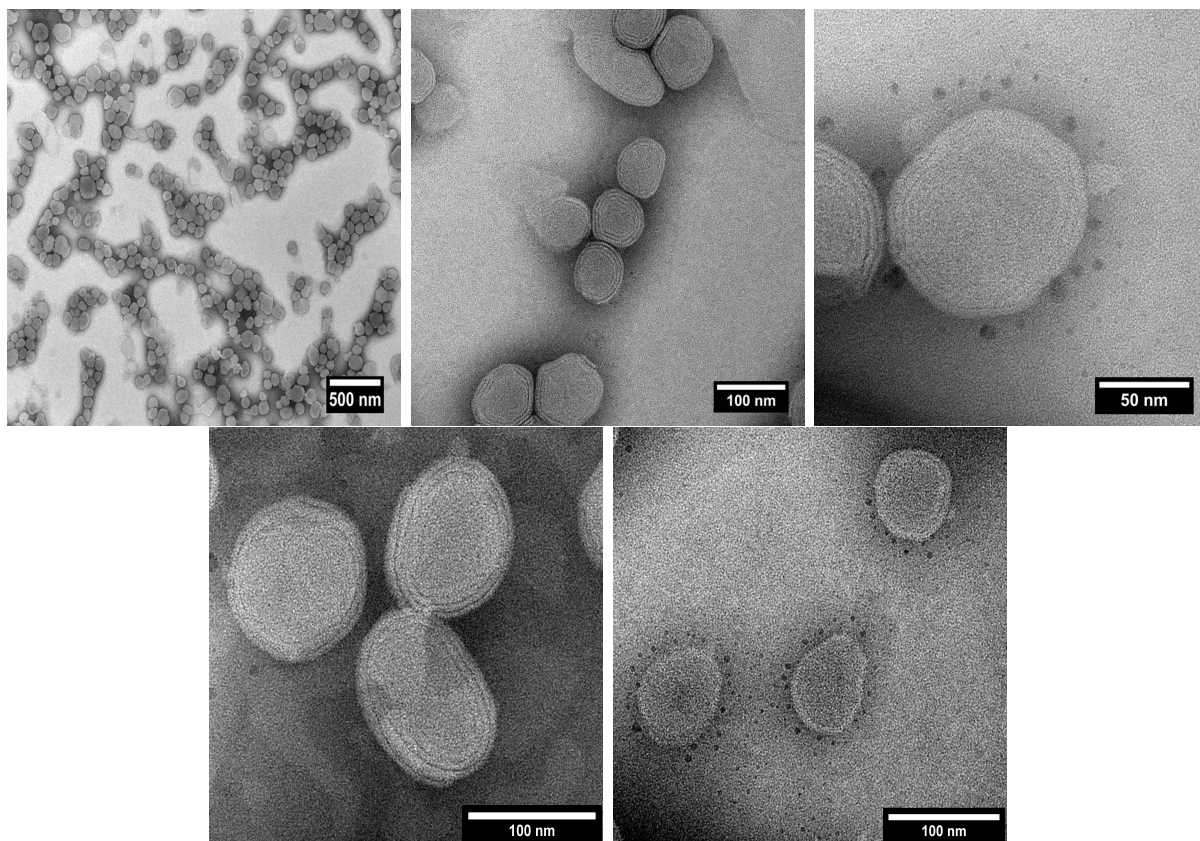
Com esses resultados, fica claro que o líquido iônico muda a carga superficial das vesículas, aumentando os valores do potencial zeta, e como consequência alterando a sua estabilidade.

#### 4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Crio-EM

Os experimentos de microscopia foram muito importantes para determinar a existência de partículas em dispersão. Primeiro foram realizadas medidas de microscopia eletrônica para os sistemas com vesículas de de POPC, esfingomiéline e colesterol na proporção 2:1:2 sem o líquido iônico [C<sub>14</sub>mim]Cl. Algumas concentrações foram testadas para desenvolver o protocolo ideal para preparação do grid para lipossomas e no final foi escolhido a concentração de 5mg/ml. Por fim, usando o software ImageJ®, estimou-se o tamanho de algumas partículas e construiu-se um histograma para comparar com as medidas de DLS.

As micrografias na Figura 27 confirmam a existências das lipossomas unilamelares com formatos esféricos, regulares e com tamanhos homogêneos, não havendo presença de agregados de tamanhos maiores, o que indica uma baixa polidispersão na amostra submetida a microscopia, concordando com o baixo PDI nas medidas DLS (NOGUEIRA *et al.*, 2015). A formação dessas estruturas circulares bem definidas já era previsto. De acordo com a literatura, um alto teor de colesterol aumenta a estabilidade da membrana e com isso há a formação de estruturas mais inflexíveis que aparentam um círculo quase perfeito (KADDAH *et al.*, 2018; ALMGREN; EDWARDS; KARLSSON, 2000). Também

pode-se observar uma tendência de agregação das vesículas, novamente devido à presença do colesterol segundo estudos anteriores (SUŁKOWSKI *et al.*, 2005).

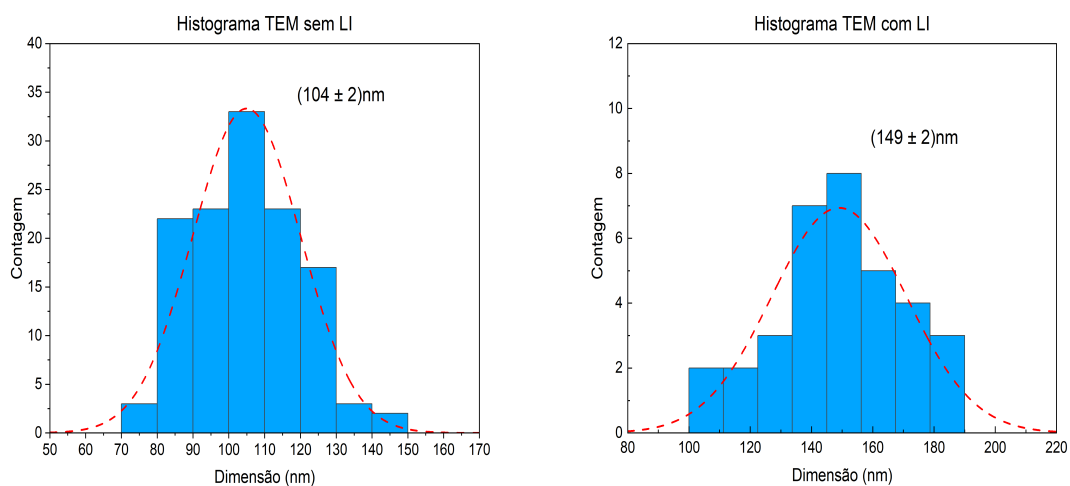


**Figura 27** – Micrografias dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomiéline e colesterol, na concentração de 5mg/ml.

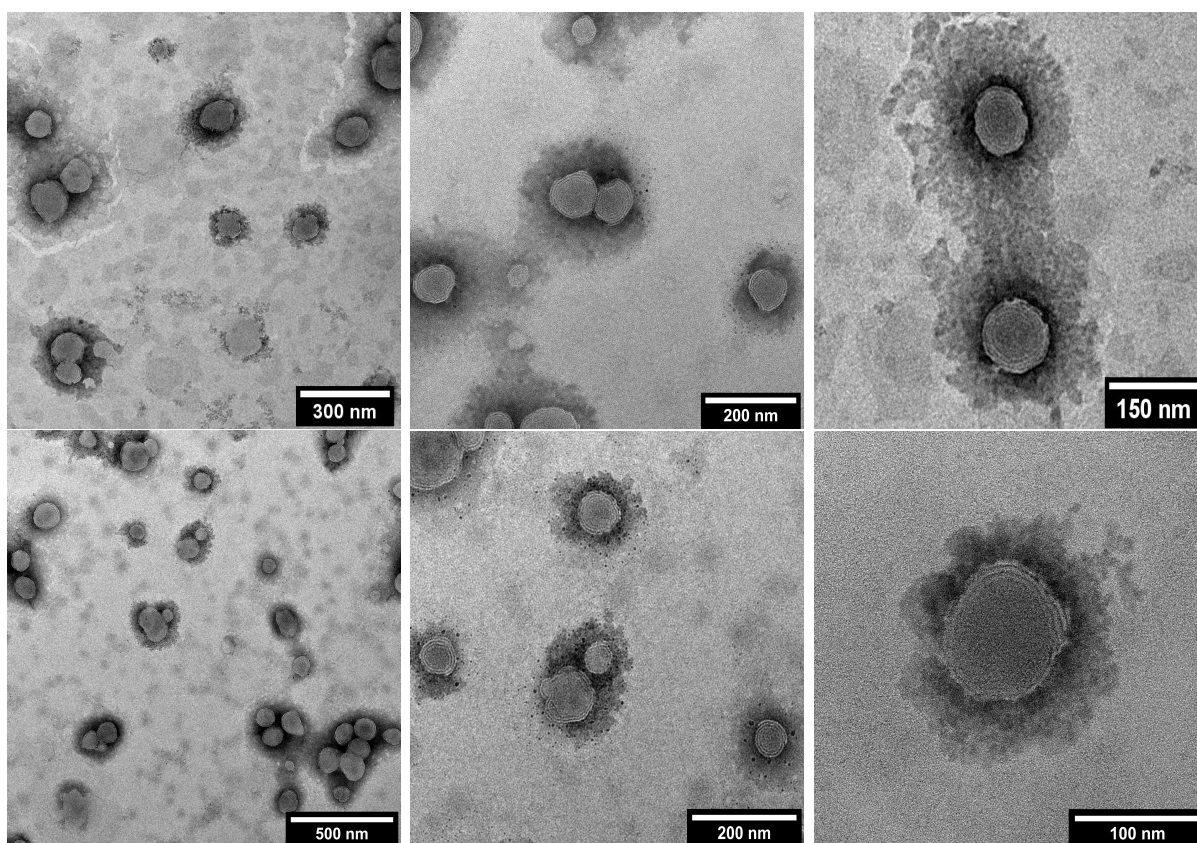
Na Figura 28 é possível ver a distribuição de tamanhos das partículas encontradas no grid, com um tamanho médio de  $(104 \pm 2)nm$ , valor 28% menor que o valor de  $(133.3 \pm 0.3)nm$  obtido com os resultados do DLS. Contudo, na microscopia eletrônica apenas algumas partículas são visíveis impossibilitando a obtenção de informações com relevância estatística mais consistente como no caso do DLS. Outro fator que pode ter ocasionado essa diferença é que para a preparação dos grids as amostras passam pelo processo de secagem que pode levar a uma alteração da estrutura das nanopartículas.

Depois, foram realizadas medidas de microscopia eletrônica para os sistemas com vesículas de POPC, esfingomiéline e colesterol na presença do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ . Para esse experimento, utilizou-se a mesma concentração das vesículas (5mg/ml) e adicionou-se 10%mol de LI. As imagens são apresentadas na Figura 29.





**Figura 28** – Histogramas com a distribuição de tamanho das vesículas obtidos nas medidas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Na esquerda, os sistemas sem líquido iônico e na direita com líquido iônico.

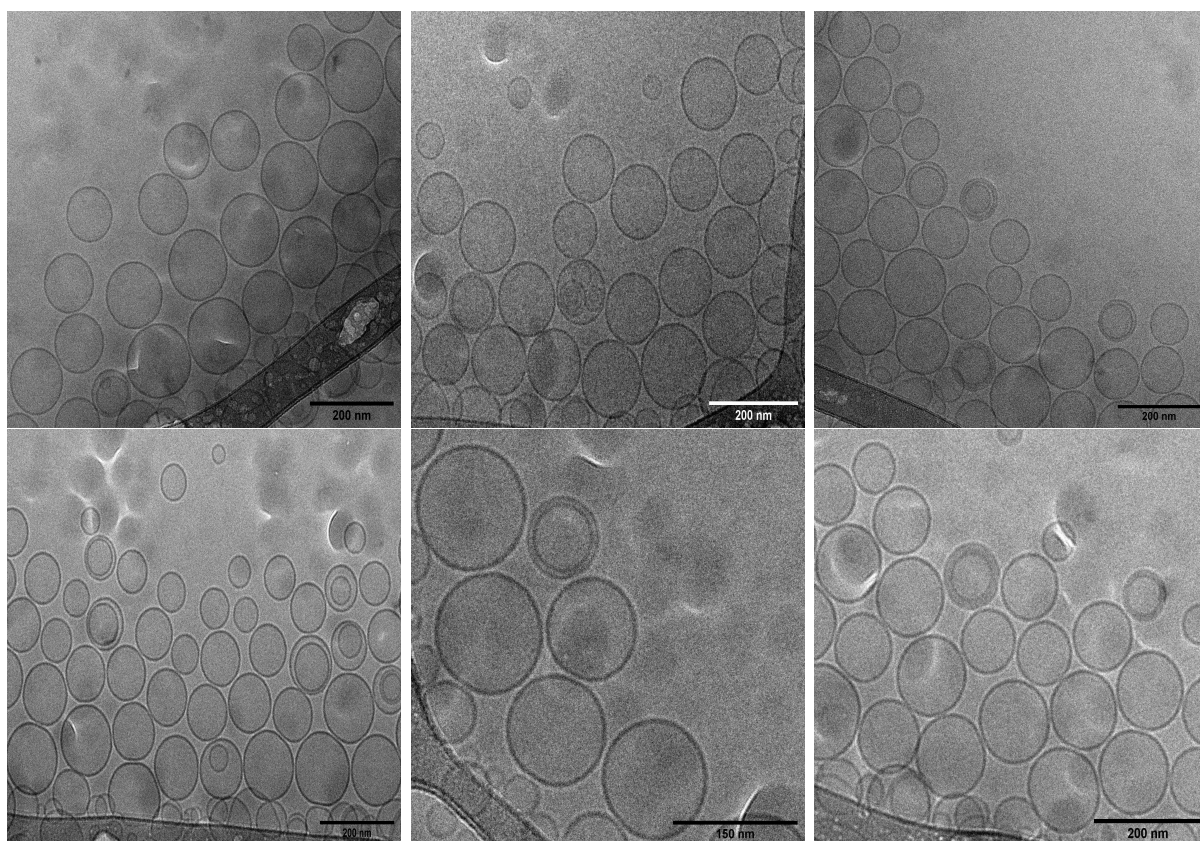


**Figura 29** – Micrografias obtidas com microscopia eletrônica dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomiéline e colesterol, na concentração de 5mg/ml, com a adição de 10%mol do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ .

Pode-se observar que conforme o LI foi adicionado no sistema uma região mais escura aparece em volta das bicamadas. Os tamanhos das vesículas levando em conta

essa região são variáveis, existem partículas menores ( $\sim 100nm$ ) e partículas maiores ( $\geq 180nm$ ), como pode ser visto no histograma da Figura 28. Porém, o tamanho médio é de  $(149 \pm 2nm)$ , aproximadamente 3.5% maior que o valor de  $(144 \pm 1)nm$  encontrado com as medidas de DLS para os sistemas de vesículas com 10%mol de líquido iônico. Esses fatores corroboram com a hipótese de que o LI se concentrando na região externa membrana, conforme indicado anteriormente com dados encontrados nas análises das curvas de SAXS e no aumento de tamanho observado nas medidas de DLS.

Também foram realizadas medidas de Crio-EM para os dois sistemas relatados acima e novamente construiu-se um histograma, para comparar com as medidas de DLS. A Figura 30 mostra as micrografias para o sistema com vesículas de POPC, esfingomielina e colesterol na ausência de líquido iônico. A concentração de preparação das amostras foi  $8mg/ml$ .

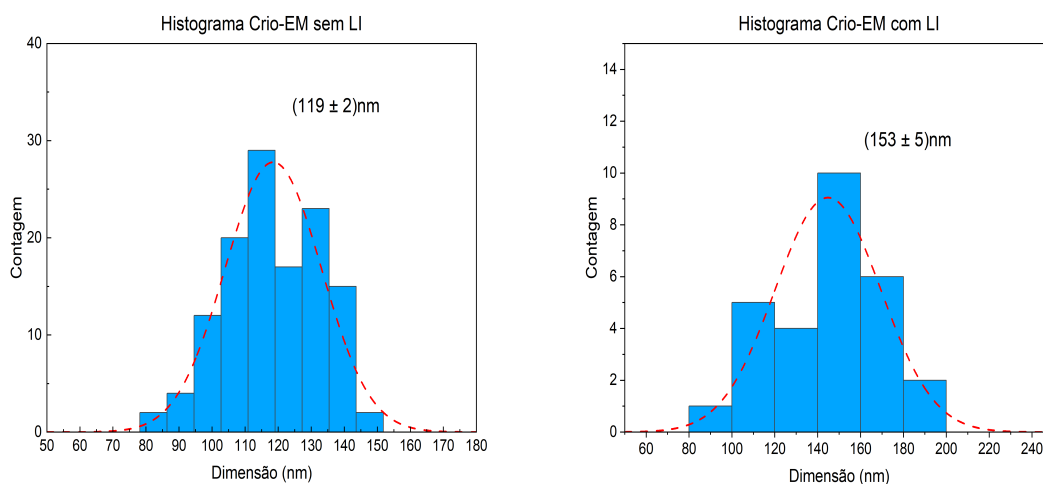


**Figura 30** – Micrografias obtidas com crio-microscopia eletrônica dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomielina e colesterol na concentração de  $8mg/ml$ .

As imagens estão de acordo com exemplos presentes na literatura (BAXA, 2018; BIBI *et al.*, 2011). Novamente, é possível observar lipossomas com formatos esféricos e

bem definidos, devido a presença do colesterol.

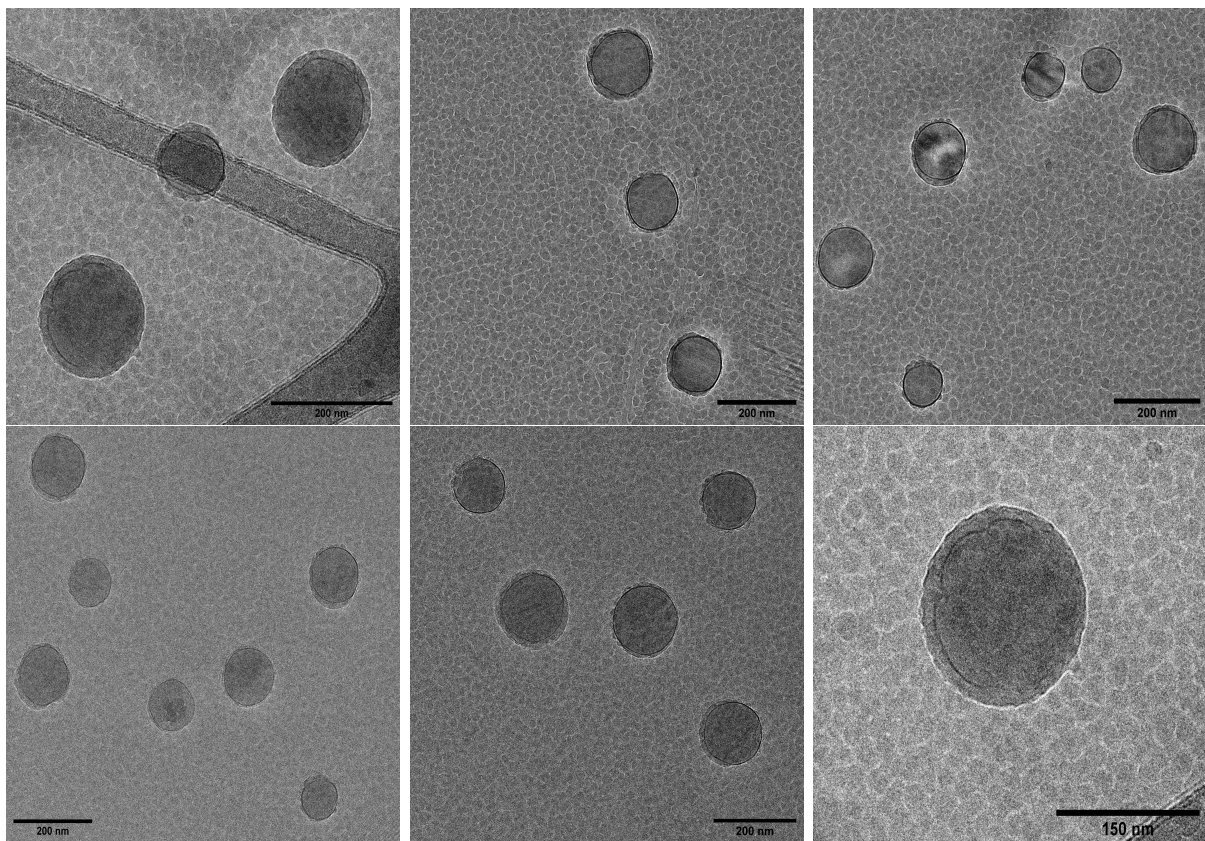
Com o histograma da Figura 31 tem-se que, apesar da presença de algumas vesículas bem menores, a grande maioria possui tamanhos próximos e não há presença de agregados de maior tamanho, concordando com o baixo PDI nas medidas DLS. Os tamanho médio obtido foi de  $(119 \pm 2)nm$ , mais próximo do valor obtido no DLS de  $(133.3 \pm 0.3)nm$  se comparado com as medidas de TEM.



**Figura 31** – Histogramas com a distribuição de tamanho das vesículas obtidos nas medidas de crio-microscopia (Crio-EM). Na esquerda, os sistemas com líquido iônico e na direita sem líquido iônico.

Na Figura 32, temos o sistema das vesículas com a adição novamente de  $10\%mol$  de  $[C_{14}mim]Cl$ .

Similarmente aos dados obtidos com as medidas de TEM para os sistema com líquido iônico os tamanhos das vesículas são variáveis, existem partículas menores ( $\sim 90nm$ ) e partículas maiores ( $\geq 180nm$ ), como pode ser visto no histograma da Figura 31. Entretanto, o tamanho médio é de  $(153 \pm 5)nm$ , aproximadamente 6% maior que o valor de  $(144 \pm 1)nm$  encontrado com as medidas de DLS para os sistemas com  $10\%mol$  de  $[C_{14}mim]Cl$ . Novamente, é possível ver uma região em volta das bicamadas não observada nos sistema sem LI, indicando mais uma vez que o LI se concentra na região externa da membrana.



**Figura 32** – Micrografias obtidas com crio-microscopia eletrônica dos sistema contendo vesículas mistas de POPC, esfingomiéline e colesterol na concentração de 8mg/ml e com a adição de 10%mol do líquido iônico  $[C_{14}mim]Cl$ .



## 5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, a influência do líquido iônico sobre a estrutura e estabilidade de sistemas biomiméticos de membranas compostas pelos lipídios POPC, esfingomiéline e colesterol na proporção (2:1:2) foram sistematicamente estudados a fim de compreender a toxicidade dos líquidos iônicos em biosistemas. Para isso, utilizou-se diversas técnicas biofísicas, como espalhamento de raios-X a baixo ângulos (SAXS), supressão de fluorescência, espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica (TEM) e crio-microscopia (Crio-EM).

Primeiro, utilizou-se medidas de SAXS para obter os parâmetros estruturais das lipossomas e a localização dos líquidos iônicos na bicamada. Os resultados indicam que as cabeças polares do líquido iônico estão localizados na parte externa da membrana ao redor da bicamada, não sendo capaz de penetrar na mesma. Porém, conforme a concentração de LI aumenta, alguns parâmetros estruturais da bicamada são alterados. Observa-se um aumento gradual da área por lipídio e uma diminuição do tamanho da cabeça polar, apontando que o LI pode estar comprimindo a membrana. Outro parâmetro modificado é a posição do colesterol na bicamada, sua molécula aproxima cada vez mais da região polar do POPC e da esfingomiéline.

Para confirmar o fato dos LI não ser capaz de romper as vesículas lipídicas, realizou-se medidas de supressão de fluorescência. Nos resultados de supressão, notou-se que mesmo quando a concentração de LI aumentava, não se observava uma diminuição significativa na intensidade de fluorescência. A intensidade nos espectros de emissão permanecem sempre próximos do mesmo valor independentemente da concentração do líquido iônico, indicando que não ocorreu a permeabilização da membrana, fato confirmado pelos valores baixos obtidos para as porcentagem de vazamento.

Como um complemento aos dados de SAXS, que indicaram que as moléculas de LI estão localizados na parte externa da membrana, efetuou-se medidas de DLS, potencial zeta e microscopia eletrônica. No DLS, mediu-se o diâmetro efetivo das lipossomas antes e após a adição do LI na solução, e houve um aumento significativo no tamanho das partículas conforme o  $[C_{14}mim]Cl$  foi adicionado.

Tanto nas imagens de TEM e Crio-EM, na presença de LI é possível ver uma região mais escura em volta da bicamada externa e como consequência um aumento considerável no tamanho médio das partículas. Com o potencial zeta, fica claro que o líquido iônico muda a carga superficial das vesículas aumentando os valores do potencial zeta e com isso alterando a sua estabilidade.

Finalmente, os experimentos realizados nesse trabalho para observar a interação das moléculas do líquido iônico com vesículas leva a acreditar que os líquidos iônicos catiônicos podem interagir com a membrana, alterando sua organização e dessa forma a sua estabilidade. Porém, dependendo da composição da membrana os LI não são capazes de permeabilizar a bicamada.







## REFERÊNCIAS

- ADAWIYAH, Noorul *et al.* Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems. **MedChemComm**, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 10, p. 1881–1897, 2016. Citado na p. 26.
- ALBANI, Jihad René. **Fluorescence quenching**. [S.l.]: Elsevier, 2011. P. 141–191. Citado nas pp. 51–54.
- ALMGREN, Mats; EDWARDS, Katarina; KARLSSON, Göran. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Elsevier, v. 174, n. 1-2, p. 3–21, 2000. Citado na p. 81.
- AMIRIL, SAS; RAHIM, Erween Abd; SYAHRULLAIL, S. A review on ionic liquids as sustainable lubricants in manufacturing and engineering: Recent research, performance, and applications. **Journal of Cleaner Production**, Elsevier, v. 168, p. 1571–1589, 2017. Citado na p. 24.
- ARMENTA, Sergio *et al.* Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, 2019. Citado na p. 23.
- BARBA-BON, Andrea; NILAM, Mohamed; HENNIG, Andreas. Supramolecular Chemistry in the Biomembrane. **ChemBioChem**, Wiley Online Library, 2020. Citado nas pp. 29, 31, 66.
- BARBOSA, Leandro Ramos Souza *et al.* Small-angle X-ray scattering applied to proteins in solution. **Proteins in Solution and at Interfaces**. John Wiley & Sons, Inc, p. 49–72, 2013. Citado nas pp. 41, 42.
- BAXA, Ulrich. Imaging of liposomes by transmission electron microscopy. *In*: CHARACTERIZATION of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. [S.l.]: Springer, 2018. P. 73–88. Citado nas pp. 61, 62, 84.
- BENEDETTO, Antonio. Room-temperature ionic liquids meet bio-membranes: the state-of-the-art. **Biophysical reviews**, Springer, v. 9, n. 4, p. 309–320, 2017. Citado nas pp. 26, 27, 30.
- BENEDETTO, Antonio; BINGHAM, Richard J; BALLONE, Pietro. Structure and dynamics of POPC bilayers in water solutions of room temperature ionic liquids. **The Journal of chemical physics**, AIP Publishing, v. 142, n. 12, 03b622\_1, 2015. Citado na p. 34.
- BERG, Jeremy M; TYMOCZKO, John L; STRYER, Lubert. **Biochemistry**, ; W. H. [S.l.]: Freeman: New York, 2002. Citado na p. 33.

- BERNSTEIN, Joel. **Polymorphism in Molecular Crystals 2e**. [S.l.]: International Union of Crystal, 2020. v. 30. Citado na p. 26.
- BERTHOD, Alain; RUIZ-ANGEL, MJ; CARDA-BROCH, Samuel. Ionic liquids in separation techniques. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1184, n. 1-2, p. 6–18, 2008. Citado na p. 24.
- BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Elsevier, v. 235, p. 337–351, 2016. Citado nas pp. 55, 58, 59.
- BIBI, Sagida *et al.* Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. **International journal of pharmaceutics**, Elsevier, v. 417, n. 1-2, p. 138–150, 2011. Citado na p. 84.
- BLUME, Alfred. Dynamic properties. **Marcel Dekker, New York**, p. 455–509, 1993. Citado na p. 29.
- BORODIN, Oleg. Polarizable force field development and molecular dynamics simulations of ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 113, n. 33, p. 11463–11478, 2009. Citado na p. 23.
- BOWERS, Ashley N *et al.* Extraction of DNA with magnetic ionic liquids using in situ dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 411, n. 28, p. 7375–7385, 2019. Citado na p. 26.
- BUNGE, Andreas *et al.* Characterization of the ternary mixture of sphingomyelin, POPC, and cholesterol: support for an inhomogeneous lipid distribution at high temperatures. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 94, n. 7, p. 2680–2690, 2008. Citado nas pp. 32, 71.
- CEVC, Gregor. **Phospholipids handbook**. [S.l.]: CRC Press, 1993. Citado na p. 30.
- CEVC, Gregor; MARSH, Derek. **Phospholipid bilayers: physical principles and models**. [S.l.]: Wiley, 1987. Citado na p. 30.
- CLARK, Kevin D *et al.* Preservation of DNA in nuclease-rich samples using magnetic ionic liquids. **RSC Advances**, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 46, p. 39846–39851, 2016. Citado na p. 26.
- CLOGSTON, Jeffrey D; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. *In*: CHARACTERIZATION of nanoparticles intended for drug delivery. [S.l.]: Springer, 2011. P. 63–70. Citado na p. 58.
- COULING, David J *et al.* Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 1, p. 82–90, 2006. Citado na p. 34.

- CZARNOCKI-CIECIURA, Mariusz; NOWOTNY, Marcin. Introduction to high-resolution cryo-electron microscopy. **Postępy Biochemii**, v. 62, n. 3, p. 383–394, 2016. Citado nas pp. 60, 61.
- DE ROSA, Raffaella; SPINOZZI, Francesco; ITRI, Rosangela. Hydroperoxide and carboxyl groups preferential location in oxidized biomembranes experimentally determined by small angle X-ray scattering: Implications in membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1860, n. 11, p. 2299–2307, 2018. Citado nas pp. 47, 48, 65.
- DEGIORGIO, Vittorio; CORTI, Mario. **Physics of amphiphiles–micelles, vesicles, and microemulsions, 1983: Varenna on Lake Como, Villa Monastero, 19-29 July 1983**. [S.l.]: North Holland, 1985. v. 90. Citado na p. 28.
- DOCHERTY, Kathryn M; KULPA JR, Charles F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 4, p. 185–189, 2005. Citado na p. 34.
- DONG, Kun *et al.* Multiscale studies on ionic liquids. **Chemical reviews**, ACS Publications, v. 117, n. 10, p. 6636–6695, 2017. Citado na p. 25.
- EGOROVA, Ksenia S; ANANIKOV, Valentine P. Fundamental importance of ionic interactions in the liquid phase: A review of recent studies of ionic liquids in biomedical and pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Liquids**, Elsevier, v. 272, p. 271–300, 2018. Citado nas pp. 25, 26.
- EGOROVA, Ksenia S; GORDEEV, Evgeniy G; ANANIKOV, Valentine P. Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 117, n. 10, p. 7132–7189, 2017. Citado nas pp. 24–26.
- EL KHOURY, Elsy D; PATRA, Digambara. Ionic liquid expedites partition of curcumin into solid gel phase but discourages partition into liquid crystalline phase of 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 117, n. 33, p. 9699–9708, 2013. Citado na p. 34.
- EVANS, Kervin O. Room-temperature ionic liquid cations act as short-chain surfactants and disintegrate a phospholipid bilayer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Elsevier, v. 274, n. 1-3, p. 11–17, 2006. Citado na p. 34.
- FEIGENSON, Gerald W; BUBOLTZ, Jeffrey T. Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 80, n. 6, p. 2775–2788, 2001. Citado na p. 32.

FEIGIN, LA; SVERGUN, DI; TAYLOR, George W. **Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering**. [S.l.]: New York: Plenum Press, 1987. Citado nas pp. 41–43.

FERNANDEZ, Roberto M *et al.* Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1778, n. 4, p. 907–916, 2008. Citado na p. 65.

FRANKEN, Linda E; BOEKEMA, Egbert J; STUART, Marc CA. Transmission electron microscopy as a tool for the characterization of soft materials: application and interpretation. **Advanced Science**, Wiley Online Library, v. 4, n. 5, p. 1600476, 2017. Citado na p. 61.

FRAZIER, Monica L *et al.* Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 92, n. 7, p. 2422–2433, 2007. Citado nas pp. 32, 71.

GAL, Noga *et al.* Membrane interactions of ionic liquids: Possible determinants for biological activity and toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1818, n. 12, p. 2967–2974, 2012. Citado na p. 33.

GANSKE, Franka; BORNSCHEUER, Uwe T. Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF<sub>4</sub>] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] and organic solvents. **Biotechnology letters**, Springer, v. 28, n. 7, p. 465–469, 2006. Citado na p. 34.

GLATTER, O. Evaluation of small-angle scattering data from lamellar and cylindrical particles by the indirect transformation method. **Journal of Applied Crystallography**, International Union of Crystallography, v. 13, n. 6, p. 577–584, 1980. Citado nas pp. 41, 42.

GOÑI, Félix M. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1838, n. 6, p. 1467–1476, 2014. Citado na p. 30.

GREENWOOD, Alexander I; TRISTRAM-NAGLE, Stephanie; NAGLE, John F. Partial molecular volumes of lipids and cholesterol. **Chemistry and physics of lipids**, Elsevier, v. 143, n. 1-2, p. 1–10, 2006. Citado na p. 71.

GUERIN, Claudia BE; SZLEIFER, Igal. Self-assembly of model nonionic amphiphilic molecules. **Langmuir**, ACS Publications, v. 15, n. 23, p. 7901–7911, 1999. Citado na p. 28.

HASSAN, Puthusserickal A; RANA, Suman; VERMA, Gunjan. Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. **Langmuir**, ACS Publications, v. 31, n. 1, p. 3–12, 2015. Citado nas pp. 55, 57.

HEBERLE, Frederick A *et al.* The Molecular Structure of Sphingomyelin in Fluid Phase Bilayers Determined by the Joint Analysis of Neutron and X-Ray Scattering Data. **Biophysical Journal**, Elsevier, v. 112, n. 3, 223a, 2017. Citado na p. 71.

HEFTBERGER, Peter *et al.* Global small-angle X-ray scattering data analysis for multilamellar vesicles: the evolution of the scattering density profile model. **Journal of applied crystallography**, International Union of Crystallography, v. 47, n. 1, p. 173–180, 2014. Citado nas pp. 70, 71.

HEINE, Johanna; MÜLLER-BUSCHBAUM, Klaus. Engineering metal-based luminescence in coordination polymers and metal–organic frameworks. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 42, n. 24, p. 9232–9242, 2013. Citado na p. 50.

HUANG, Weizi *et al.* Ionic liquids: Green and tailor-made solvents in drug delivery. **Drug discovery today**, Elsevier, 2019. Citado na p. 25.

HVOSLEF, Jan. A neutron diffraction study of pentaerythritol. **Acta Crystallographica**, International Union of Crystallography, v. 11, n. 6, p. 383–388, 1958. Citado na p. 44.

IANCU, Cristina V *et al.* Electron cryotomography sample preparation using the Vitrobot. **Nature protocols**, Nature Publishing Group, v. 1, n. 6, p. 2813, 2006. Citado na p. 62.

ISRAELACHVILI, Jacob N. **Intermolecular and surface forces**. [S.l.]: Academic press, 2015. Citado na p. 27.

ISRAELACHVILI, JN. Physics of amphiphiles: micelles, vesicles and microemulsions. **Proceedings of the International School of Physics Enrico Fermi (Societa Italiana di Fisica)**, North-Holland, Amsterdam, p. 24, 1985. Citado na p. 27.

JEONG, Seunghwan *et al.* Elucidation of molecular interactions between lipid membranes and ionic liquids using model cell membranes. **Soft Matter**, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 20, p. 5501–5506, 2012. Citado na p. 34.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9ª edição; Ed. Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro, 2012. Citado na p. 29.

- KADDAH, Samar *et al.* Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier, v. 113, p. 40–48, 2018. Citado na p. 81.
- KAR, Mega *et al.* Ionic liquids—further progress on the fundamental issues. **Australian Journal of Chemistry**, CSIRO, v. 72, n. 2, p. 3–10, 2019. Citado na p. 23.
- KHATUN, Zamila *et al.* Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods. **Nanomedicine**, Future Medicine, v. 11, n. 17, p. 2359–2377, 2016. Citado nas pp. 57, 60.
- KLAUDA, Jeffery B *et al.* Simulation-based methods for interpreting x-ray data from lipid bilayers. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 90, n. 8, p. 2796–2807, 2006. Citado nas pp. 45, 47.
- KRATKY, Otto; POROD, Gunther. Diffuse small-angle scattering of X-rays in colloid systems. **Journal of colloid science**, Elsevier, v. 4, n. 1, p. 35–70, 1949. Citado na p. 43.
- KUCERKA, Norbert; HOLLAND, Bryan W *et al.* Scattering density profile model of POPG bilayers as determined by molecular dynamics simulations and small-angle neutron and X-ray scattering experiments. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 116, n. 1, p. 232–239, 2011. Citado na p. 43.
- KUCERKA, Norbert; NAGLE, John F *et al.* Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data. **Biophysical journal**, The Biophysical Society, v. 95, n. 5, p. 2356–2367, 2008. Citado nas pp. 43–46, 49, 65.
- KUČERKA, Norbert; NIEH, Mu-Ping; KATSARAS, John. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1808, n. 11, p. 2761–2771, 2011. Citado nas pp. 44, 45.
- LAFUENTE, Leticia *et al.* Efficient and selective N-, S-and O-Acetylation in TEAA ionic liquid as green solvent. Applications in synthetic carbohydrate chemistry. **Letters in Organic Chemistry**, Bentham Science Publishers, v. 13, n. 3, p. 195–200, 2016. Citado na p. 24.
- LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to fluorescence. *In*: PRINCIPLES of fluorescence spectroscopy. [S.l.]: Springer, 1999. P. 1–23. Citado nas pp. 49, 50.
- \_\_\_\_\_. Quenching of fluorescence. *In*: PRINCIPLES of fluorescence spectroscopy. [S.l.]: Springer, 1983. P. 257–301. Citado nas pp. 51–54, 74.

- LE, HH *et al.* Effect of different ionic liquids on the dispersion and phase selective wetting of carbon nanotubes in rubber blends. **Polymer**, Elsevier, v. 105, p. 284–297, 2016. Citado na p. 24.
- LEHNINGER, AL; NELSON, DL; COX, MM. Principles of Biochemistry (Worth, New York, 1993). **Google Scholar**, 1993. Citado na p. 30.
- LEI, Zhigang *et al.* **Introduction: ionic liquids**. [S.l.]: ACS Publications, 2017. Citado na p. 24.
- LEONG, Sim Siong *et al.* Dynamic Light Scattering: Effective Sizing Technique for Characterization of Magnetic Nanoparticles. *In*: HANDBOOK of Materials Characterization. [S.l.]: Springer, 2018. P. 77–111. Citado na p. 56.
- LOMBARDO, Domenico *et al.* Soft interaction in liposome nanocarriers for therapeutic drug delivery. **Nanomaterials**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 6, n. 7, p. 125, 2016. Citado nas pp. 27, 28, 33, 58.
- LÓPEZ, Olga *et al.* Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100. **FEBS letters**, Elsevier, v. 426, n. 3, p. 314–318, 1998. Citado na p. 79.
- MANAIA, Eloisa Berbel *et al.* Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International journal of nanomedicine**, Dove Press, v. 12, p. 4991, 2017. Citado nas pp. 56, 60.
- MARCO, Bianca Aparecida de *et al.* Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi pharmaceutical journal**, Elsevier, v. 27, n. 1, p. 1–8, 2019. Citado na p. 23.
- MARRUCHO, IM; BRANCO, LC; REBELO, LPN. Ionic liquids in pharmaceutical applications. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, Annual Reviews, v. 5, p. 527–546, 2014. Citado na p. 25.
- MARSH, Derek. Structural and thermodynamic determinants of chain-melting transition temperatures for phospholipid and glycolipids membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1798, n. 1, p. 40–51, 2010. Citado na p. 31.
- MATTEI, Bruno *et al.* Membrane permeabilization induced by Triton X-100: the role of membrane phase state and edge tension. **Chemistry and physics of lipids**, Elsevier, v. 202, p. 28–37, 2017. Citado na p. 54.
- MCKENZIE, Beulah E; HOLDER, Simon J; SOMMERDIJK, Nico AJM. Assessing internal structure of polymer assemblies from 2D to 3D CryoTEM: Bicontinuous micelles. **Current opinion in colloid & interface science**, Elsevier, v. 17, n. 6, p. 343–349, 2012. Citado na p. 62.

MCQUEEN, Lisa; LAI, David. Ionic liquid aqueous two-phase systems from a pharmaceutical perspective. **Frontiers in Chemistry**, Frontiers Media SA, v. 7, 2019. Citado na p. 25.

MIELANCZYK, Lukasz *et al.* Closer to the native state. Critical evaluation of cryo-techniques for transmission electron microscopy: preparation of biological samples. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 52, n. 1, p. 1–17, 2014. Citado na p. 62.

NICOLSON, Garth L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1838, n. 6, p. 1451–1466, 2014. Citado nas pp. 32, 71.

NOGUEIRA, Eugenia *et al.* Design of liposomal formulations for cell targeting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier, v. 136, p. 514–526, 2015. Citado na p. 81.

PABST, G *et al.* Applications of neutron and X-ray scattering to the study of biologically relevant model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Elsevier, v. 163, n. 6, p. 460–479, 2010. Citado na p. 44.

PACHECO-FERNÁNDEZ, Idaira; PINO, Verónica. Green solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, Elsevier, v. 18, p. 42–50, 2019. Citado na p. 23.

PAN, Jianjun *et al.* Interactions between ether phospholipids and cholesterol as determined by scattering and molecular dynamics simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 116, n. 51, p. 14829–14838, 2012. Citado na p. 71.

PÂRVULESCU, Vasile I; HARDACRE, Christopher. Catalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 107, n. 6, p. 2615–2665, 2007. Citado na p. 24.

PATRA, Digambara *et al.* Effect of Curcumin on Liposome: Curcumin as a Molecular Probe for Monitoring Interaction of Ionic Liquids with 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine Liposome. **Photochemistry and photobiology**, Wiley Online Library, v. 88, n. 2, p. 317–327, 2012. Citado na p. 30.

PAUL, Bidyut K; MOULIK, Satya P. **Ionic liquid-based surfactant science: formulation, characterization, and applications**. [*S.l.*]: John Wiley & Sons, 2015. Citado na p. 23.

PETKOVIC, Marija *et al.* Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 40, n. 3, p. 1383–1403, 2011. Citado na p. 26.



- PILZ, Ingrid; GLATTER, Otto; KRATKY, Otto. [11] Small-angle x-ray scattering. *In: METHODS in enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1979. v. 61. P. 148–249. Citado na p. 41.
- QUINN, Peter J; WOLF, Claude. The liquid-ordered phase in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 1788, n. 1, p. 33–46, 2009. Citado na p. 31.
- RADAIC, A *et al.* How Lipid Cores Affect Lipid Nanoparticles as Drug and Gene Delivery Systems. *In: ADVANCES in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*. [S.l.]: Elsevier, 2016. v. 24. P. 1–42. Citado na p. 55.
- RANKE, J *et al.* Design of sustainable chemical products the example of ionic liquids. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 107, n. 6, p. 2183–2206, 2007. Citado na p. 26.
- RANTWIJK, Fred van; SHELDON, Roger A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical reviews**, ACS Publications, v. 107, n. 6, p. 2757–2785, 2007. Citado na p. 24.
- RISKE, Karin A *et al.* Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. **Biophysical Reviews**, Springer, v. 9, n. 5, p. 649–667, 2017. Citado na p. 79.
- SAMAD, Abdus; SULTANA, Y; AQIL, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. **Current drug delivery**, Bentham Science Publishers, v. 4, n. 4, p. 297–305, 2007. Citado na p. 39.
- SANTANA, Jeferson *et al.* A high sensitive ion pairing probe (the interaction of pyrenetetrasulphonate and methyl viologen): Salt and temperature dependences and applications. **Journal of Luminescence**, Elsevier, v. 151, p. 130–137, 2014. Citado nas pp. 54, 76.
- SEJWAL, Kushal *et al.* Proteoliposomes—a system to study membrane proteins under buffer gradients by cryo-EM. **Nanotechnology Reviews**, De Gruyter, v. 6, n. 1, p. 57–74, 2017. Citado na p. 40.
- SHAMSHINA, Julia L *et al.* Ionic liquids in pharmaceutical industry. **Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry**, Wiley Online Library, p. 539–577, 2018. Citado nas pp. 25, 26.
- SHELDON, Roger A. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 5, p. 267–278, 2005. Citado na p. 24.
- SINGER, S Jonathan; NICOLSON, Garth L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972. Citado na p. 30.

SMITH, Mackensie C *et al.* Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, 2017. Citado na p. 58.

SOMERHARJU, Pentti; VIRTANEN, Jorma A; CHENG, Kwan Hon. Lateral organisation of membrane lipids: the superlattice view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Elsevier, v. 1440, n. 1, p. 32–48, 1999. Citado na p. 30.

SPINOZZI, Francesco *et al.* GENFIT: software for the analysis of small-angle X-ray and neutron scattering data of macromolecules in solution. **Journal of applied crystallography**, International Union of Crystallography, v. 47, n. 3, p. 1132–1139, 2014. Citado nas pp. 48, 49, 65.

STOLTE, Stefan *et al.* Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 11, p. 1170–1179, 2007. Citado na p. 33.

SUŁKOWSKI, WW *et al.* The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. **Journal of Molecular Structure**, Elsevier, v. 744, p. 737–747, 2005. Citado na p. 82.

SVERGUN, Dmitri I; KOCH, Michel HJ. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, IOP Publishing, v. 66, n. 10, p. 1735, 2003. Citado na p. 43.

SZCZEŚ, A. Effects of DPPC/Cholesterol liposomes on the properties of freshly precipitated calcium carbonate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier, v. 101, p. 44–48, 2013. Citado na p. 80.

TAKEKIYO, Takahiro; YOSHIMURA, Yukihiro. Suppression and dissolution of amyloid aggregates using ionic liquids. **Biophysical reviews**, Springer, v. 10, n. 3, p. 853–860, 2018. Citado na p. 26.

TANFORD, Charles. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes 2d ed.** [*S.l.*]: J. Wiley., 1980. Citado na p. 27.

TURK, Harmony F; CHAPKIN, Robert S. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Elsevier, v. 88, n. 1, p. 43–47, 2013. Citado na p. 32.

VALEUR, Bernard. Characteristics of fluorescence emission. *In*: MOLECULAR fluorescence. [*S.l.*]: Wiley-VCH, 2001. P. 34–70. Citado nas pp. 49, 50.

\_\_\_\_\_. Effects of intermolecular photophysical processes on fluorescence emission. *In*: MOLECULAR fluorescence. [*S.l.*]: Wiley-VCH, 2001. P. 72–123. Citado nas pp. 23, 52.

VAN MEER, Gerrit; VOELKER, Dennis R; FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature reviews Molecular cell biology**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008. Citado nas pp. 30, 32, 71.

VEKARIYA, Rohit L. A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. **Journal of Molecular Liquids**, Elsevier, v. 227, p. 44–60, 2017. Citado na p. 24.

WANG, Zonghua *et al.* An ionic liquid-modified graphene based molecular imprinting electrochemical sensor for sensitive detection of bovine hemoglobin. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 61, p. 391–396, 2014. Citado na p. 24.

WASSALL, Stephen R *et al.* Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids: The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. **Chemistry and physics of lipids**, Elsevier, v. 132, n. 1, p. 79–88, 2004. Citado na p. 32.

WASSERSCHIED, Peter; WELTON, Thomas. **Ionic liquids in synthesis**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008. Citado na p. 23.

WEI, Di; IVASKA, Ari. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Analytica chimica acta**, Elsevier, v. 607, n. 2, p. 126–135, 2008. Citado na p. 24.

WHITE, Stephen H; KING, Glen I. Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 82, n. 19, p. 6532–6536, 1985. Citado na p. 28.

WIENER, Michael C; WHITE, Stephen H. Fluid bilayer structure determination by the combined use of x-ray and neutron diffraction. I. Fluid bilayer models and the limits of resolution. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 59, n. 1, p. 162–173, 1991. Citado nas pp. 43, 44.

YAMAZAKI, Masahito. The single GUV method to reveal elementary processes of leakage of internal contents from liposomes induced by antimicrobial substances. **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, Elsevier, v. 7, p. 121–142, 2008. Citado na p. 54.

YOO, Brian *et al.* Amphiphilic interactions of ionic liquids with lipid biomembranes: a molecular simulation study. **Soft Matter**, Royal Society of Chemistry, v. 10, n. 43, p. 8641–8651, 2014. Citado nas pp. 26, 33, 34.

ZALBA, Sara; HAGEN, Timo LM ten. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. **Cancer treatment reviews**, Elsevier, v. 52, p. 48–57, 2017. Citado na p. 31.

ZHANG, Jinming *et al.* Application of ionic liquids for dissolving cellulose and fabricating cellulose-based materials: state of the art and future trends. **Materials Chemistry Frontiers**, Royal Society of Chemistry, v. 1, n. 7, p. 1273–1290, 2017. Citado na p. 24.

ZHOU, Wu; SU, Mingxu; CAI, Xiaoshu. Advances in nanoparticle sizing in suspensions: dynamic light scattering and ultrasonic attenuation spectroscopy. **KONA Powder and Particle Journal**, Hosokawa Powder Technology Foundation, v. 34, p. 168–182, 2017. Citado na p. 55.