

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabalho de Conclusão de Curso

Rafaela Ribeiro Paixão

Membranas Celulares Modelo: Uma revisão teórica

São Carlos

2024

Rafaela Ribeiro Paixão

Membranas Celulares Modelo: Uma revisão teórica

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Bacharel em Química

Orientador(a): Rose Maria Carlos

São Carlos

2024



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 25/2024/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAELA RIBEIRO PAIXÃO

MEMBRANAS CELULARES MODELO: UMA REVISÃO TEÓRICA

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 30 de agosto de 2024

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Profa. Dra. Rose Maria Carlos
Membro da Banca 1	Dr. Gabriel Henrique Ribeiro
Membro da Banca 2	Msc. Eliada Andrade da Silva



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 03/09/2024, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1568005** e o código CRC **7F2F7066**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 1568005

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por sua infinita bondade e por estar sempre me iluminando e me protegendo. Sou grata por todos os momentos que Ele me permitiu viver durante a graduação e por ter me dado tamanha oportunidade.

À família, em especial meu pai João Laércio, minha mãe Cleide e meu irmão Pedro Lucas, por nunca saírem do meu lado e estarem sempre como em tudo que precisei. Reconheço que foram muitos esforços e sacrifícios e serei eternamente grata por tem tonado esse sonho possível.

Ao meu namorado Lucas Henrique, pelo seu companheirismo e por todo o incentivo dado.

Aos meus amigos que fiz no período da graduação, em especial Ana e Gustavo, pelos momentos vividos, cooperação e amizade. Agradeço por estarem sempre comigo e passarem por todas as dificuldades ao meu lado.

A todos os amigos que fiz em São Carlos, que mesmo não estando comigo durante as aulas, sempre me acompanharam fora dela, me apoiando, incentivando e ajudando com a companhia nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas do LaFIB, Maria, Marco, Lorena, Bárbara, Rafaella, Pedro, Ana Carla e Anderson, por todos os momentos que passamos juntos, por todas as risadas e principalmente por todo o ensinamento que me proporcionaram durante esses anos.

À minha orientadora Dr^a Rose Maria Carlos, por sempre acreditar no meu potencial, por ter acreditado em mim durante toda minha experiência na Iniciação Científica e por ter me proporcionado tantos aprendizados.

À FAPESP pela bolsa concedida.

RESUMO

O conhecimento sobre membrana celular é de suma importância já que é ela que divide os limites da célula separando o meio extracelular do meio intracelular, e responsável pelo transporte de substâncias e é o alvo de estudo para desenvolvimento de técnicas e mecanismos em diversas áreas da ciência, incluindo sistemas de entrega de fármacos, sensores seletivos, etc. Devido a fatores como diversidade celular, estrutura dinâmica e metabolismo complexo, dificultam o estudo da membrana, tornando-se necessário buscar alternativas para melhor entender esse sistema. Nesse contexto surgem as Membranas Celulares Modelo, que são modelos de membrana criados para mimetizar a estrutura e composição presente nas membranas celulares. As membranas modelo podem ser mimetizadas em diferentes estruturas e com inúmeras composições, o que permite aplicações com diferentes intuitos e com diferentes técnicas para estudo e caracterização, incluindo novos materiais, tecnologia de encapsulamento em nanoescala para alimentos e medicamentos, sensores biológicos etc. Os estudos de interação biofísica e bioquímica com membranas modelos é uma abordagem simples e eficaz de conhecer e entender a dinâmica das membranas celulares naturais.

ABSTRACT

Knowledge about the cell membrane is extremely important as it is what divides the boundaries of the cell, separating the extracellular environment from the intracellular environment, and is responsible for the transport of substances and is the target of study for the development of techniques and mechanisms in various areas of Science, including drug delivery systems, selective sensors, etc. Due to factors such as cellular diversity, dynamic structure and complex metabolism, they make the study of the membrane difficult, making it necessary to seek alternatives to better understand this system. In this context, Model Cell Membranes emerge, which are membrane models created to mimic the structure and composition present in cell membranes. Model membranes can be mimicked in different structures and with numerous compositions, which allows applications with different purposes and with different techniques for study and characterization, including new materials, nanoscale encapsulation technology for foods and medicines, biological sensors, etc. Biophysical and biochemical interaction studies with model membranes are a simple and effective approach to knowing and understanding the dynamics of natural cell membranes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectros de emissão de um complexo de Rutênio na ausência (azul) e presença das seguintes composições lipídicas (A) POPC, (B) POPC:CHOL e (C) SM:CHOL, nas concentrações de $50 \mu M$ (verde), $200 \mu M$ (roxa) e $400 \mu M$ (laranja). 10
- Figura 2.** Imagens de GUVs de lipídio POPC e POPG na presença de complexo de rutênio 11
- Figura 3.** Imagens de GUVs de composição lipídica de POPC e DOPG na presença de complexo de rutênio 11
- Figura 4.** Isoterma de pressão superficial de monocamada de DPPC, com representação das fases. 17
- Figura 5.** Dependência do módulo de compressibilidade em função da pressão superficial para monocamada de DPPC 18
- Figura 6.** Isoterma de Potencial de Superfície para o lipídio DPPC 19

LISTA DE ESQUEMAS

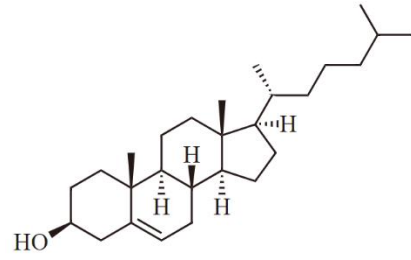
Esquema 1. Modelo de Membrana Celular proposto por Gorter e Grendel.....	1
Esquema 2. Modelos de Membrana propostos por Davson e Danielli.....	2
Esquema 3. Modelo Mosaico Fluído.....	2
Esquema 4. Membrana Lipídica com presença de Raft (Fonte: Adaptado de Viruses, 2010 , 1146-1180, 2(5)) ¹⁶	4
Esquema 5. Estrutura geral dos GPLs	5
Esquema 6. Estrutura das diferentes cabeças polares dos GPLs.	5
Esquema 7. Componentes de um esfingolípido baseado na estrutura da esfingomiéline (SM). 6	
Esquema 8. Estrutura da molécula de colesterol.	7
Esquema 9. Esquema ilustrando as SUVs, LUVs e GUVs	8
Esquema 10. Diagrama esquemático de Bicamada Lipídica Suportada	12
Esquema 11. Diagrama esquemático da formação Bicamada Lipídica Suportada pelo método de adsorção de vesículas.....	13
Esquema 12. Representação genérica de uma Isoterma de Langmuir e organização lipídica lateral.	16
Esquema 13. Modelo para explicar o potencial de superfície da monocamada, onde a monocamada é tratada como um capacitor de três camadas.	18

LISTA DE TABELAS

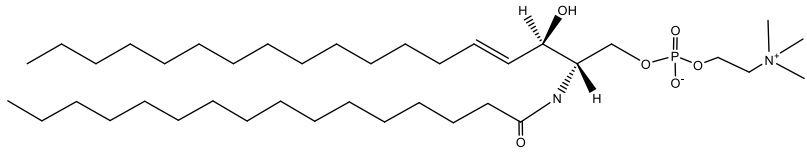
Tabela 1. Informações sumarizadas sobre os tipos de GPLs.	6
--	---

LISTA DE ESTRUTURAS

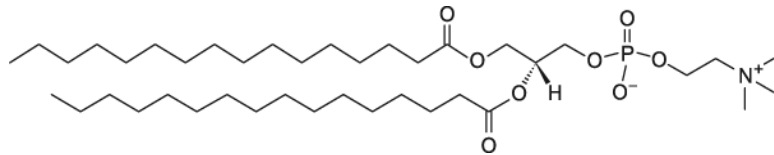
Colesterol



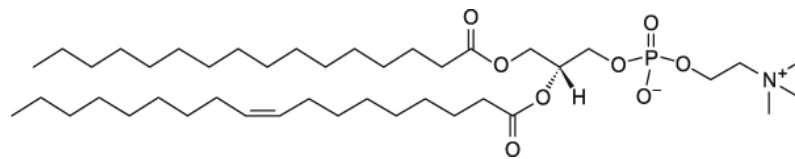
Esfingomielina



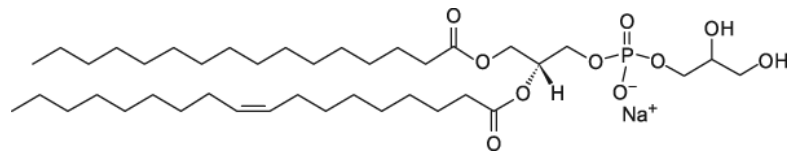
DPPC



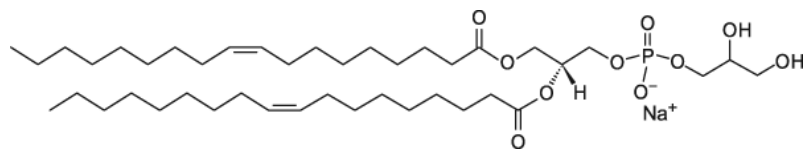
POPC



POPG



DOPG



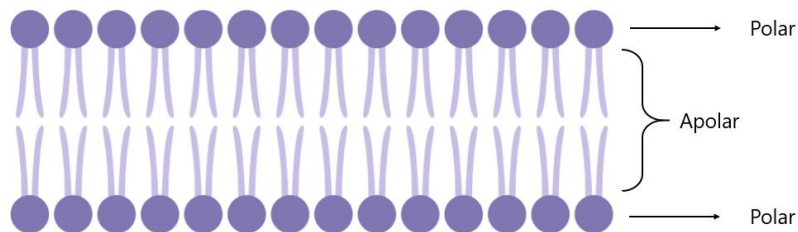
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Membranas Celulares	1
1.2 Composição das Membranas Celulares.....	4
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Membranas Celulares Modelo	8
3.1.1 Lipossomos.....	8
3.1.2 Bicamada Suportada.....	12
3.1.3 Monocamada	15
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

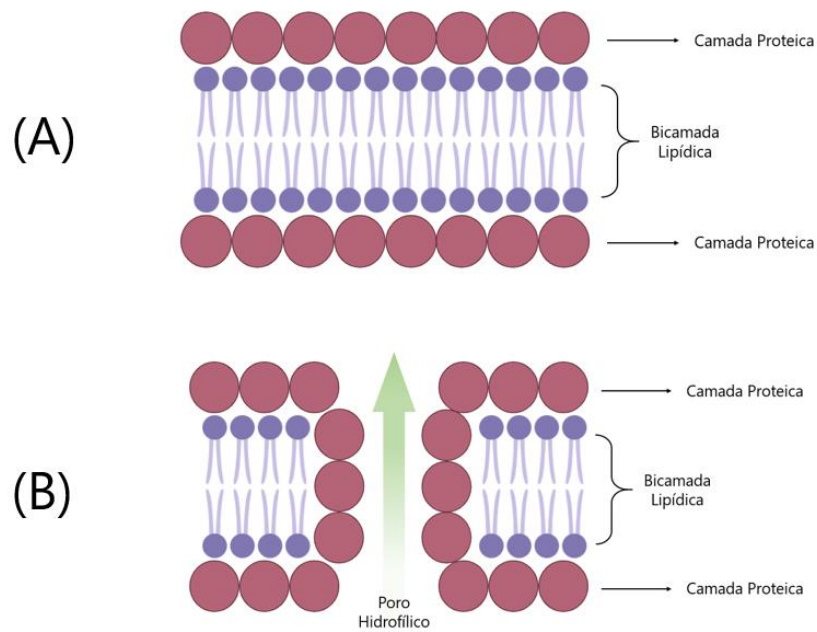
1.1 Membranas Celulares

A membrana celular é uma estrutura fundamental que divide os limites das células, separando o meio extracelular do meio intracelular.¹ O primeiro modelo descrito para a estrutura das membranas celulares foi proposto por Gorter e Grendel², em 1925. Estes autores propuseram que a membrana é constituída por uma bicamada lipídica, composta por milhares de moléculas lipídicas anfifílicas, ou seja, apresentam uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica, mantidas juntas por interações hidrofóbicas entre suas cadeias carbônicas^{2,3}, como mostra o Esquema 1.



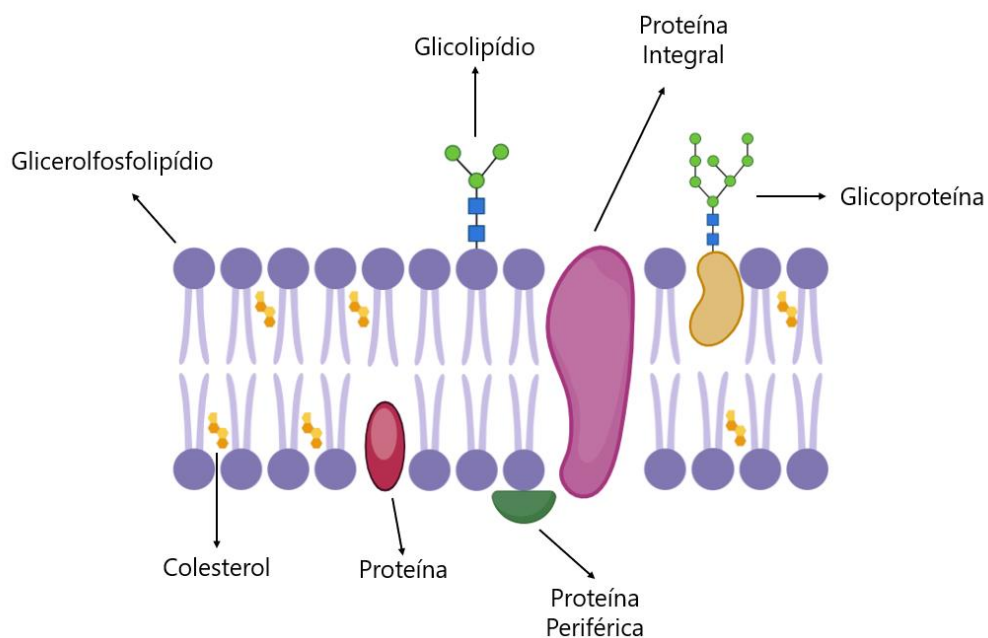
Esquema 1. Modelo de Membrana Celular proposto por Gorter e Grendel

Evidências sobre a permeabilidade e a tensão superficial das membranas sugeriram que elas eram mais complexas do que simples camadas lipídicas. Em 1935, Davson e Danielli propuseram um modelo em que a bicamada fosfolipídica era coberta por camadas de proteínas, tanto internamente quanto externamente, ligando-se às extremidades hidrofílicas dos fosfolipídios (Esquema 2A). No entanto, esse modelo não conseguia explicar como moléculas polares, como água, aminoácidos e monossacarídeos, atravessavam a membrana, já que uma camada contínua de fosfolipídios não permitiria sua passagem. Em 1954, Davson e Danielli revisaram seu modelo inicial, sugerindo que a membrana celular possuía poros revestidos por proteínas que formavam passagens hidrofílicas, permitindo a passagem de substâncias polares, enquanto as substâncias não polares atravessavam diretamente a bicamada fosfolipídica (Esquema 2B).^{4,5}



Esquema 2. Modelos de Membrana propostos por Davson e Danielli

Em 1972, Singer e Nicholson⁶ apresentaram uma nova hipótese para o modelo de membrana celular. Com um estudo mais detalhado, propuseram o modelo do mosaico fluído (Esquema 3), onde as proteínas e lipídios difundiam-se livremente no plano da membrana celular. Esse modelo trouxe uma estrutura simples para a membrana e a partir dele foi possível realizar muitas outras descobertas na área.^{3,7,8}



Esquema 3. Modelo Mosaico Fluído

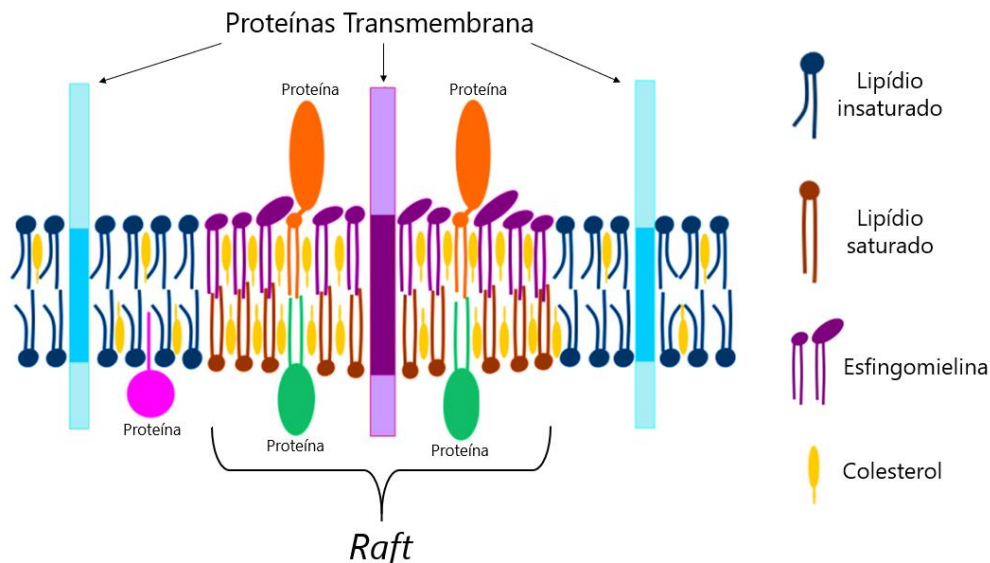
O conceito do modelo de membrana de mosaico fluído tem sido amplamente utilizado para explicar muitos dos fenômenos observados em membranas biológicas, embora não possa explicar todos eles. Este modelo sugere que os componentes moleculares da membrana têm liberdade lateral e rotacional, distribuindo-se aleatoriamente. Contudo, atualmente sabe-se que essa mobilidade não é completamente irrestrita e que os componentes da membrana não são distribuídos de forma aleatória. Um novo modelo, denominado “modelo de mosaico estruturado dinamicamente”, destaca-se por enfatizar o conceito de mosaicismo e não a fluidez⁸, ou seja, este modelo traz a ideia de que determinadas regiões da membrana são formadas propositalmente, dependendo da função celular de cada uma delas, sendo assim, seus componentes não são dispostos aleatoriamente.

Na composição da membrana plasmática, os fosfolipídios formam uma bicamada onde as partes não polares das moléculas lipídicas se orientam para o interior, enquanto os grupos polares se voltam para fora, interagindo com o ambiente aquoso de cada lado. Proteínas estão inseridas nessa bicamada, mantidas por interações hidrofóbicas com os lipídios da membrana e com domínios hidrofóbicos nas próprias proteínas. A disposição das proteínas na bicamada é assimétrica, conferindo à membrana uma "lateralização": os domínios proteicos expostos de um lado são distintos dos expostos do outro lado, criando uma assimetria funcional. O mosaico da membrana é fluido devido à predominância de interações não covalentes entre seus componentes, permitindo que as moléculas lipídicas e proteicas se movam livremente lateralmente no plano da membrana.

A hipótese dos “*rafts*” de membrana⁹ (ou jangadas lipídicas) surgiu como forma de explicar esta falta de homogeneidade da membrana lateral: propôs que as interações entre lipídios específicos (por exemplo, colesterol e lipídios saturados) no plano da membrana conduzem a formação de membrana funcionalmente importante e regiões relativamente ordenadas que recrutam outros lipídios e proteínas¹⁰, tudo isso dependendo da função que a célula irá desempenhar.

Os *rafts* são heterogêneos, dinâmicos, enriquecidos com colesterol e esfingolipídios (Esquema 4), que têm o potencial de formar domínios microscópicos, induzindo interações proteína-proteína e proteína-lipídio.¹¹ Esses domínios estão presentes nos folhetos internos e externos^{12,13} de uma membrana celular assimétrica, estão acoplados através dos folhetos e formam plataformas para regulação de processos celulares.¹⁴ Esse conceito foi apoiado por

observações de membranas modelo, que fornecem evidências claras de que certos lipídios interagem preferencialmente uns com os outros, gerando domínios laterais em grande escala.¹⁵



Esquema 4. Membrana Lipídica com presença de Raft (Fonte: Adaptado de *Viruses*, 2010, 1146-1180, 2(5))¹⁶

1.2 Composição das Membranas Celulares

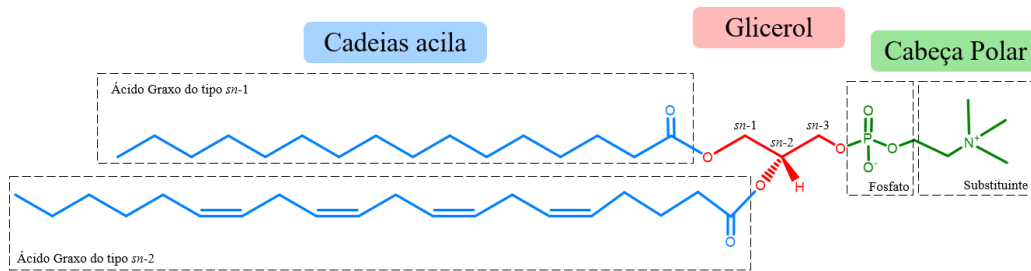
As membranas são consideradas complexos lipoproteicos, constituídos por proteínas, lipídios e glicídios, com quantidades que variam de acordo com cada célula. Independentemente de suas diferenças funcionais, todas as membranas biológicas têm uma estrutura fina de moléculas de lipídios e proteínas, mantidas juntas por interações não covalentes.

As proteínas da membrana possuem uma variedade de composições e desempenham diversas funções, podendo agir na estrutura, facilitar o transporte de substâncias através da membrana ou servir de receptores de sinais moleculares. Quanto aos lipídios, predominam os fosfolipídios, que são complexos lipídicos contendo um grupo fosfato, com uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica. Em menor quantidade encontram-se o colesterol e os esfingolipídios.¹⁰

Como os lipídios são os componentes encontrados em maior quantidade nas membranas celulares, e suas estruturas diferentes são responsáveis por alterar as propriedades e funções das membranas, é importante que estes sejam descritos de uma maneira mais detalhada. A bicamada lipídica fornece uma barreira funcional entre compartimentos

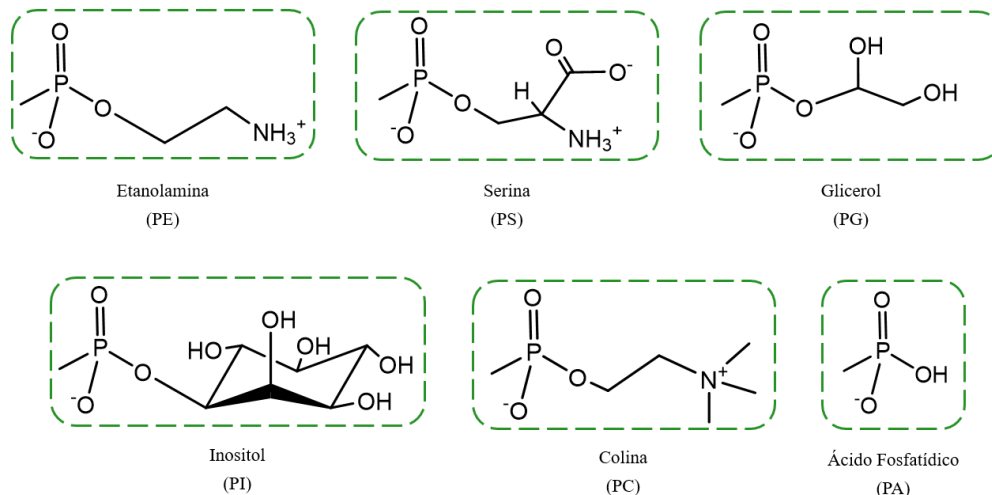
subcelulares e entre a célula e seu ambiente, porém essa função de barreira não é suficiente para explicar o enorme grau de diversidade estrutural dos lipídios.¹⁷

Tanto a composição quanto as diferenças estruturais dos lipídios afetam as propriedades físico-químicas da membrana lipídica. Existem três principais lipídios de membranas denominados como glicerofosfolipídios (GPLs), esfingolipídios e esteróis (principalmente colesterol). Os glicerofosfolipídios são os mais abundantes na membrana celular. Os ácidos graxos presentes nos GPLs e esfingolipídios variam em comprimento da cadeia e em número de ligações duplas, assim como a posição dessa ligação. A diversidade química dos GPLs surge das combinações de dois ácidos graxos, ligados na posição *sn*-1, e uma cabeça polar¹⁸, como ilustrado no Esquema 5.



Esquema 5. Estrutura geral dos GPLs

As posições *sn*-1 e *sn*-2 da estrutura do glicerol são esterificadas com ácidos graxos de comprimento e grau de saturação variados. A posição *sn*-3 restante é esterificada com ácido fosfórico, que por sua vez é esterificado com um álcool. Dependendo da estrutura desse álcool, diferentes tipos cabeças polares são formados, como mostra o Esquema 6 e, portanto, são obtidos diferentes tipos de GPLs.¹⁹



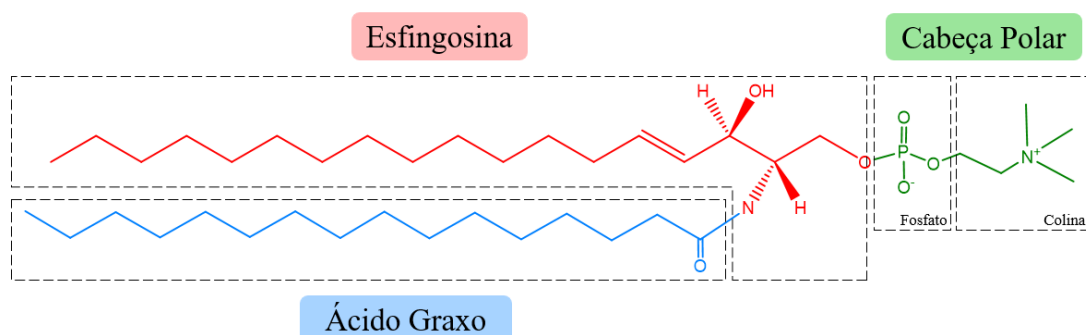
Esquema 6. Estrutura das diferentes cabeças polares dos GPLs.

Dependendo da estrutura do grupo polar e do pH do meio envolvente, Fosfatidiletanolamina (PE) e Fosfatidilcolina (PC) são zwitterionicos, ou seja, possuem carga neutra no pH fisiológico, enquanto Fosfatidilglicerol (PG), Fosfatidilinositol (PI), Fosfatidilserina (PS), e Ácido Fosfático (PA) terão carga negativa nesse mesmo pH.^{19,20} As informações dos nomes, abreviações e carga em pH 7 estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Informações sumarizadas sobre os tipos de GPLs.

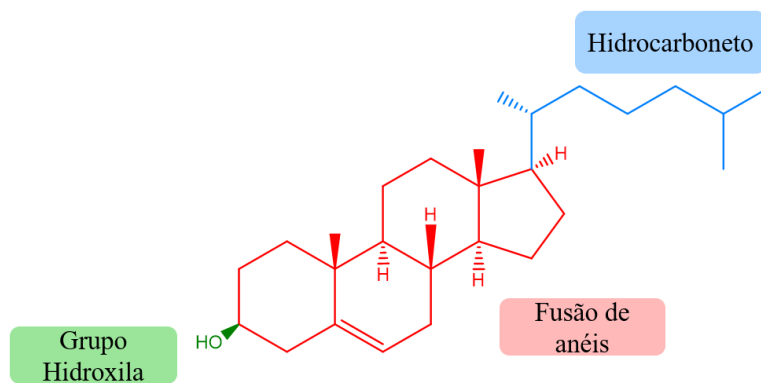
SIGLA	NOME	CARGA (pH 7)
PE	Fosfatil Etanolamina	Neutra
PS	Fosfatil Serina	Negativa
PC	Fosfatilcolina	Neutra
PG	Fosfatilglicerol	Negativa
PI	Fosfatil Inositol	Negativa
PA	Ácido Fosfático	Negativa

A segunda classe de lipídios presentes nas membranas celulares são os esfingolipídios, que possuem estrutura semelhante aos glicofosfolipídios, com exceção do glicerol que é substituído por esfingosina, como mostra o Esquema 7. O esfingolipídio mais comum é a esfingomielina (SM), que possui uma calda acila ligada ao grupo amino e um grupo fosfatilcolina (PC) ligado ao grupo hidroxila terminal.^{20,21} Esses componentes conferem maior hidrofobicidade ao núcleo da bicamada lipídica.³



Esquema 7. Componentes de um esfingolipídio baseado na estrutura da esfingomielina (SM).

Os esteróis são a terceira classe de lipídios presentes na membrana celular, com uma estrutura de anel esteroide rígido ligada a um único grupo hidroxila polar e uma cadeia de hidrocarbonetos não polar. O principal esteroide presente em animais é o colesterol, sua estrutura é mostrada no Esquema 8.



Esquema 8. Estrutura da molécula de colesterol.

O colesterol é anfipático e hidrofóbico e, portanto, é frequentemente intercalado entre moléculas de fosfolipídios na membrana e fornece estabilidade à mesma.²² A presença de colesterol promove o empacotamento das cadeias lipídicas e a formação da bicamada²³, além de modular a fluidez e rigidez da membrana.²⁴

Embora a estrutura da bicamada lipídica seja estável, suas moléculas individuais de fosfolipídios têm muita liberdade de movimento, dependendo da temperatura e da composição lipídica. Abaixo de temperaturas fisiológicas normais, os lipídeos formam um estado líquido ordenado (L_o) onde os grupos polares das cabeças são arranjados uniformemente na superfície, e as cadeias acila quase não apresentam movimentos. Acima de temperaturas fisiológicas cadeias individuais de hidrocarbonetos de ácidos graxos estão em movimento constante produzido pela rotação em torno das ligações carbono-carbono das cadeias laterais acil e pela difusão lateral de moléculas lipídicas individuais no plano da bicamada, esse é o estado líquido desordenado (L_d). As células regulam sua composição lipídica para conseguir uma fluidez de membrana constante sob várias condições de crescimento. Isso é presumidamente essencial para a função de muitas proteínas – enzimas, transportadores, receptores – que atuam dentro da bicamada lipídica.²⁵

A complexidade da estrutura celular, juntamente com a natureza altamente dinâmica da membrana lipídica faz com que seu estudo seja dificultado. Portanto, sistemas de membrana artificial miméticos, que imitam a bicamada lipídica natural, foram desenvolvidos.

2. OBJETIVOS

Realizar uma revisão de literatura abordando os principais conceitos envolvendo as membranas celulares modelo e algumas técnicas em que podem ser aplicadas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

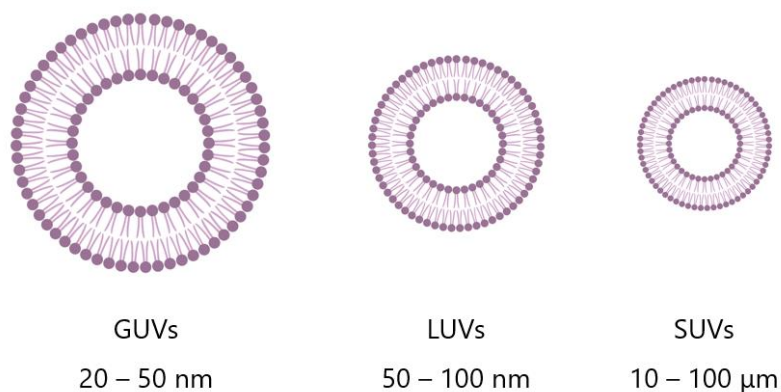
Esta revisão bibliográfica irá elucidar os principais conceitos envolvidos com as membranas celulares modelo e apresentar técnicas em que as membranas celulares modelo podem ser aplicadas.

3.1 Membranas Celulares Modelo

Membranas Celulares Modelo são sistemas nos quais a organização lipídica imita o arranjo de lipídios de membranas celulares naturais. Bicamadas Lipídicas Suportadas (SLBs), monocamadas lipídicas e lipossomos são amplamente utilizados como membranas lipídicas modelo.³

3.1.1 Lipossomos

Lipossomos são vesículas lipídicas esféricas com um compartimento aquoso interno.²⁶ Existem três tipos de lipossomos que são classificados de acordo com seu tamanho, como mostra o Esquema 9: SUVs são vesículas pequenas (do inglês, *small unilamellar vesicles*) com tamanhos de 20-50nm, LUVs são vesículas grandes (do inglês, *large unilamellar vesicles*) com tamanhos de 50-100nm e as GUVs são vesículas gigantes (do inglês, *giant unilamellar vesicles*) com tamanhos de 10-100 μ m. GUVs são próximos ao tamanho real da célula.³ Por outro lado, se muitas bicamadas aprisionam umas as outras em solução aquosa, elas são chamadas de vesículas multilamelares (MLVs, >0,5 μ m, >5 bicamadas). Portanto, é possível estudar os efeitos das barreiras de permeabilidade da membrana e da curvatura. Dispersões de vesículas dão acesso à medição de propriedades de conjunto (por exemplo, propriedades termodinâmicas e estruturais).²⁷



Esquema 9. Esquema ilustrando as SUVs, LUVs e GUVs

Os lipossomos são compostos principalmente de fosfolipídios, moléculas anfifílicas que têm uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas apolares. Quando os fosfolipídios são dispersos em soluções aquosas, devido à sua natureza anfipática, eles têm uma forte tendência a formar membranas.²⁶ Por um lado, suas cabeças polares preferem interagir com o ambiente aquoso; por outro, suas longas cadeias alifáticas apolares promovem a interação umas com as outras. Em solução aquosa, essas propriedades duais favorecem a formação de duas camadas lipídicas. As cadeias hidrofóbicas de cada camada ficam de frente uma para a outra e constituem um compartimento interno lipofílico que atua como uma barreira de permeabilidade, tanto para dentro quanto para fora. As interações hidrofóbicas estão por trás da formação dessas bicamadas lipídicas, e as forças de van der Waals mantêm as longas caudas de hidrocarbonetos juntas, fortalecendo assim essa arquitetura. Por fim, as ligações de hidrogênio e as interações polares entre as moléculas de água do ambiente aquoso e as cabeças polares dos lipídios estabilizam essa organização. A organização final dos lipídios depende de sua natureza, concentração, temperatura e forma geométrica.²⁸

Existem muitos métodos diferentes para a preparação de lipossomos. A escolha do método apropriado depende de vários fatores: 1) as características físico-químicas dos componentes do lipossomo; 2) a toxicidade e a concentração da substância carregada; 3) o tipo de meio no qual os lipossomos são dispersos; 4) os processos adicionais durante a aplicação/entrega dos lipossomos; 5) o tamanho e a meia-vida desejados para a aplicação bem-sucedida; e 6) os custos, a reprodutibilidade e a aplicabilidade em relação à produção em larga escala para fins clínicos e questões relevantes para boas práticas de fabricação.²⁸⁻³¹

Uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a preparação de fabricação de lipossomos é a hidratação de película fina ou método Bangham.^{28,32} Resumidamente, esse método envolve a dissolução do lipídio em um solvente orgânico, a evaporação do solvente e a dispersão do filme lipídico obtido em meio aquoso. Esse método produz MLVs grandes e não homogêneos que exigem processos de sonicação ou extrusão para serem produzidas LUVs.

As membranas modelo de lipossomos são altamente adequadas para a investigação da permeabilidade de drogas e sistemas de administração de drogas e permitem o uso de várias técnicas espectroscópicas, como fluorescência e espectroscopia Raman, para estudar interações biofísicas.³ A Figura 1 mostra exemplo de um experimento de fluorescência, onde foi estudada a interação de diferentes composições de membranas modelo do tipo LUV, com um complexo de rutênio. Os resultados mostram aumento da intensidade de emissão do complexo, com o aumento da concentração das LUVs, indicando que ocorre interação entre eles.

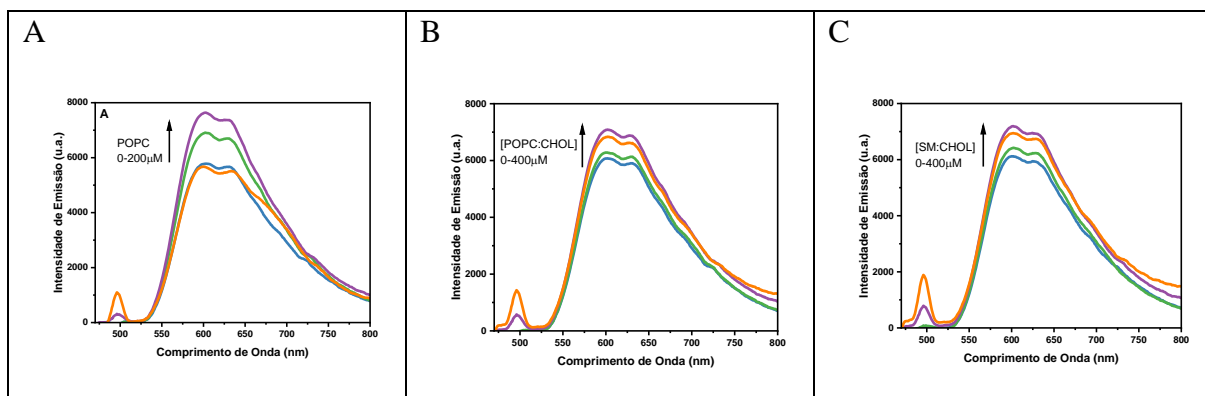


Figura 1. Espectros de emissão de um complexo de Rutênio na ausência (azul) e presença das seguintes composições lipídicas (A) POPC, (B) POPC:CHOL e (C) SM:CHOL, nas concentrações de $50 \mu M$ (verde), $200 \mu M$ (roxa) e $400 \mu M$ (laranja).

GUVs são modelos de membrana particularmente úteis porque são grandes o suficiente para serem estudados individualmente em um microscópio visual.^{27,33} Nos últimos anos, GUVs se estabeleceram como um modelo-chave e laboratório versátil para responder a uma infinidade de questões de membrana, principalmente em relação à formação de domínio. Vale ressaltar que análogos especiais de lipídios fluorescentes, como laurdan e prodan, podem ser usados como sondas espectroscópicas simultâneas que não apenas revelam a estrutura lateral, mas também aspectos da ordem da cadeia lipídica. Isso é de particular importância para questões sobre a ordem de domínios relacionados a balsas de membrana.^{34,35}

A Figura 2 mostra exemplos do tipo de informação que a microscopia de fluorescência pode revelar com a utilização de GUVs como objeto de estudo. Nesse caso, temos a interação de um complexo de rutênio que possui carga positiva, com membranas modelo do tipo GUVs que apresentam carga neutra (POPC - 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine) e negativa (POPG - 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)). Observa-se que a interação ocorre de maneira mais intensa com os lipossomos negativos, indicando um tipo de interação eletrostática.

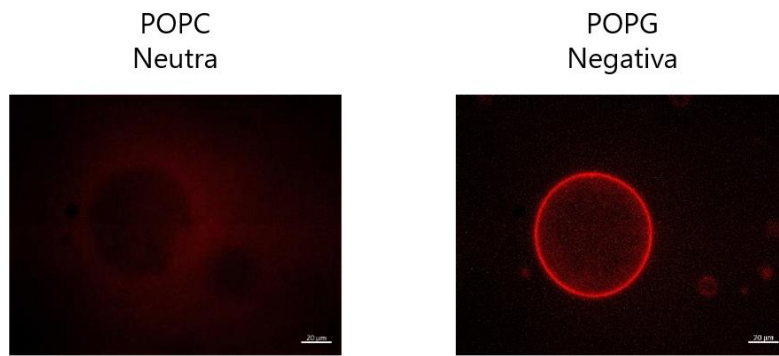


Figura 2. Imagens de GUVs de lipídio POPC e POPG na presença de complexo de rutênio

A Figura 3 mostra outro tipo de informação que pode ser obtida através de microscopia de fluorescência utilizando-se GUVs compostas pelos lipídios POPC e DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)). Nesse caso, chegou-se à observação de que o complexo de rutênio presente em solução, quando irradiado, levava à formação de oxigênio singleto, que em contato com os lipossomos, causa a formação de poros na membrana.

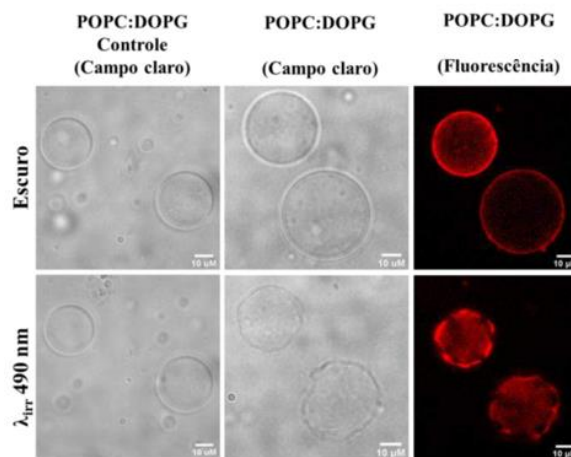


Figura 3. Imagens de GUVs de composição lipídica de POPC e DOPG na presença de complexo de rutênio

Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, os lipossomos foram o primeiro sistema de administração de fármacos aprovado para fins clínicos. Apesar de sua longa história no campo da pesquisa e desenvolvimento, ainda há problemas não resolvidos que limitam seu resultado terapêutico final.²⁸

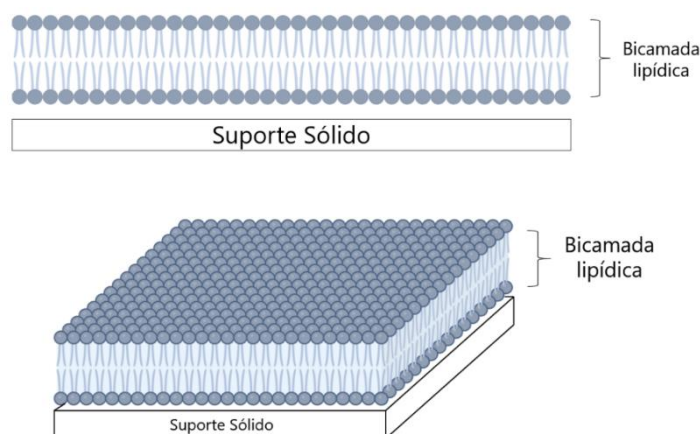
Os lipossomos constituem uma ferramenta valiosa com a qual estudar muitos problemas de estrutura e função de membrana, assim como utilizá-las para estudos de outros tipos de compostos. Com a possibilidade de se incorporar proteínas, enzimas ou ácidos

nucleicos nesses modelos, elas constituem um passo importante em direção a uma verdadeira réplica *in vitro* de membranas de sistemas vivos.²⁶

3.1.2 Bicamada Suportada

As SLBs são bicamadas lipídicas formadas em suportes sólidos, como mostra o Esquema 10. A vantagem das bicamadas é que elas podem ser manipuladas e visualizadas em microscópios de fluorescência e de força atômica, permitindo a visualização da sua estrutura lateral nas escalas de nanômetros a micrômetros.

Esses sistemas de membrana modelo normalmente permitem apenas a investigação de interações com grupos de cabeça lipídica. Mudanças na estrutura, morfologia e química de superfície de SLBs após interação com medicamentos ou sistemas de administração de medicamentos podem ser investigadas usando várias técnicas, como espalhamento de raios X, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão, ressonância infravermelha de transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de fotoelétrons de raios X.³



Esquema 10. Diagrama esquemático de Bicamada Lipídica Suportada

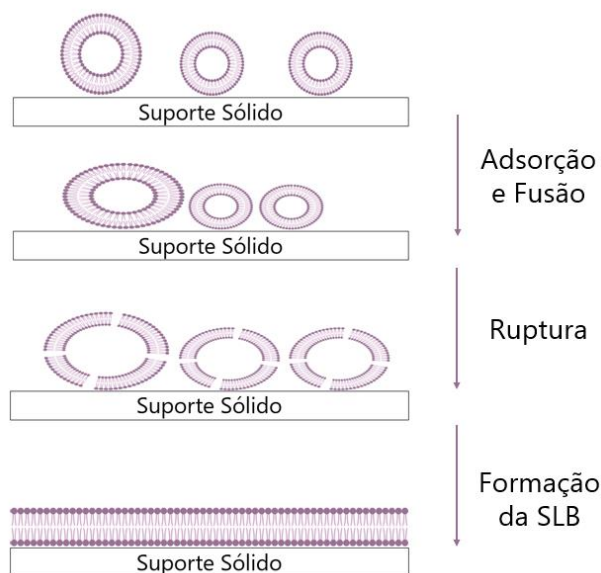
As variedades de substratos capazes de suportar bicamadas fosfolipídicas são um tanto limitadas. Para suportar uma membrana de alta qualidade (ou seja, poucos ou nenhum defeito e alta mobilidade lipídica), a superfície deve ser hidrofílica, lisa e limpa. Os melhores substratos são sílica fundida,^{36,37} vidro borossilicato,^{36,38} mica^{39,40} e silicone oxidado.³⁶

Existem três métodos gerais para a formação de bicamadas fosfolipídicas suportadas em suportes planares. O primeiro método envolve a transferência de um folheto inferior de lipídios da interface ar-água pela Técnica de Langmuir–Blodgett. Isso é seguido pela transferência de um folheto superior pelo procedimento de Langmuir–Schaefer, que envolve

mergulhar horizontalmente o substrato para criar a segunda camada³⁶. Um segundo método de formação de bicamada suportada é a adsorção e fusão de vesículas de uma suspensão aquosa para a superfície do substrato.^{41,42} Além disso, uma combinação dos dois métodos pode ser empregada primeiro transferindo uma monocamada por meio da técnica de Langmuir–Blodgett seguida pela fusão de vesículas para formar a camada superior.^{43,44}

Cada um dos três métodos de deposição tem suas vantagens e desvantagens particulares.⁴⁴ Este método é útil para a formação de bicamadas assimétricas, no entanto, é difícil, se não impossível, incorporar proteínas transmembrana na bicamada lipídica com esta técnica porque, antes da transferência, porções das proteínas dentro da monocamada são expostas ao ar e podem tornar-se irreversivelmente desnaturadas.^{43,44}

A adsorção e fusão de pequenas vesículas unilamelares (SUVs) é um dos meios mais fáceis e versáteis para formar bicamadas fosfolipídicas com suporte sólido (Esquema 7). A incorporação de proteínas transmembrana em SUVs requer um processo mais suave, como a remoção de detergente por meio de diálise.^{45,46} Os fatores que afetam a adsorção e fusão de SUVs a suportes sólidos incluem: a composição da vesícula, tamanho, carga da superfície, rugosidade da superfície, limpeza da superfície, pH da solução, força iônica e a pressão osmótica das vesículas.^{47,48} O processo começa com a adsorção de vesículas da solução em massa no substrato. Nos estágios iniciais, os SUVs podem se fundir uns com os outros.⁴⁸ As vesículas então se rompem e se fundem ao substrato formando bicamadas planas suportadas em um processo que depende da química dos lipídios individuais.^{38,44}



Esquema 11. Diagrama esquemático da formação Bicamada Lipídica Suportada pelo método de adsorção de vesículas

Uma combinação de transferência de monocamada de Langmuir–Blodgett e fusão de vesículas também pode ser usada para formar bicamadas de fosfolipídios suportadas.⁴³ Este método envolve a fusão de SUVs a uma monocamada pré-depositada de fosfolipídios. Este método é altamente eficiente para a formação de bicamadas assimétricas⁴⁹ e para a incorporação de proteínas transmembrana em bicamadas sólidas suportadas.^{44,50}

A principal vantagem em usar suportes sólidos é claramente um aumento na robustez e estabilidade da membrana da bicamada fosfolipídica. Quase igualmente importante é a capacidade de sondar interações que ocorrem na superfície da membrana com técnicas analíticas poderosas que são específicas da superfície (por exemplo, microscopia de força atômica, microbalança de cristal de quartzo, ressonância plasmônica de superfície, espectroscopia de frequência de soma vibracional, etc.). Enquanto as bicamadas fosfolipídicas suportadas por sólidos são um tanto limitadas em termos de compatibilidade com o substrato, sua principal desvantagem é que a membrana suportada não é verdadeiramente desacoplada do substrato subjacente. De fato, o sistema pode não impedir que proteínas transmembrana interajam desfavoravelmente com o substrato subjacente. Tais interações com a superfície podem fazer com que proteínas na membrana se tornem imóvel e prejudiquem sua função.⁴⁴

Bicamadas suportadas com e sem proteínas de membrana incorporadas oferecem novas oportunidades para estudar vários dos aspectos das membranas biológicas. Por causa de sua geometria plana e estabilidade fornecida pelo suporte sólido, a difusão lateral dos componentes da membrana pode ser medida de forma direta por recuperação de fluorescência após fotobranqueamento (FRAP) ou rastreamento de partículas únicas (SPT). Sabe-se desde o início das bicamadas suportadas que as transições de fase dos lipídios são preservadas nesses sistemas, conforme evidenciado por mudanças abruptas nos coeficientes de difusão lateral e mudanças morfológicas.⁵¹ Separações de fase laterais entre as fases L_o e L_d e assimetria lipídica podem também ser convenientemente estudadas em bicamadas suportadas.^{49,51,52}

As bicamadas suportadas continuam a contribuir para a compreensão atual do efeito do colesterol em misturas lipídicas complexas. Estruturas secundárias e orientações de elementos de estrutura secundária de proteínas de membrana e peptídeos ligados à membrana são convenientemente medidas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier polarizada (FTIR) em bicamadas suportadas.⁵³ Mais recentemente, interações hélice-hélice de proteínas de sinalização foram medidas em membranas suportadas.⁵⁴ Outra área em que bicamadas suportadas oferecem vantagens distintas são os estudos da cinética da ligação do ligante aos receptores ligados à membrana.⁵⁵ Membranas suportadas também foram usadas

com sucesso para medir a fusão de vesículas mediada por proteína, por exemplo na entrada do vírus.^{51,56}

3.1.3 Monocamada

As monocamadas lipídicas são modelos simples de membranas lipídicas. Monocamadas lipídicas podem ser formadas na superfície de água/tampão usando um equilíbrio de filme de Langmuir. No sistema de modelo de Langmuir, vários parâmetros como composição lipídica, subfase e temperatura podem ser escolhidos para imitar condições biológicas.^{57,58} Além disso, monocamadas lipídicas são sistemas bidimensionais muito bem definidos, estáveis e homogêneos com geometria planar.³

A vantagem de tais modelos é que eles podem ser facilmente estudados e manipulados. Pode ser facilmente investigada por várias espectroscopias, como microscopia de fluorescência. Vale ressaltar que as monocamadas lipídicas em interfaces de ar-água são bons modelos para investigar, em um ambiente bem definido, as interações entre os lipídios das membranas celulares e vários agentes que são ativos nas membranas, como solutos, drogas ou enzimas.²⁷

Monocamadas de Langmuir são camadas monomoleculares de uma dada molécula ativa formadas na interface líquido/ar. Os estudos de monocamadas de Langmuir são direcionados para a determinação de estruturas de monocamada bem como para a análise das interações entre monocamadas anfifílicas na interface ar/líquido e compostos selecionados dissolvidos na subfase. A metodologia consiste no espalhamento de um material anfifílico em uma interface ar/água. Para a formação das monocamadas de Langmuir um volume definido do lipídio selecionado diluído em um solvente orgânico volátil (geralmente clorofórmio) é espalhado na superfície da água. Após a evaporação do solvente orgânico em escalas de tempo de minutos, a cabeça polar do lipídio fica em contato com a subfase líquida, e as cadeias de hidrocarbonetos apolares se direcionam para o ar. Na sequência a monocamada de Langmuir é comprimida para determinados valores de área por molécula.⁵⁹⁻⁶¹

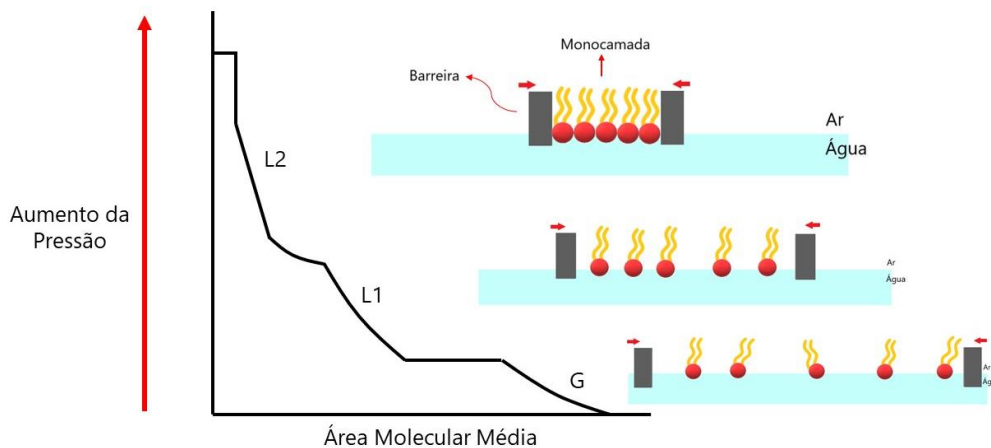
A maneira mais comum de caracterizar as monocamadas de Langmuir é obter a isoterma pressão-área superficial (π -A). As mudanças na tensão superficial da interface ar/líquido são monitoradas por uma microbalança de placa de Wilhelmy que mede a pressão do sistema pelo método de Wilhelmy.^{59,60} O sensor de pressão mede a pressão de superfície (π). A pressão superficial da medida (π) é definida como a diferença entre a

tensão superficial de uma subfase na ausência do composto selecionado (γ_0) e na presença da monocamada (γ), conforme a Equação 1.

A pressão mínima é zero e a máxima é em torno de 73 mNm^{-1} (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), que corresponde à tensão superficial da água pura se a monocamada for estável.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{Eq. 1})$$

Uma representação genérica de uma isoterma de Langmuir e da ordenação das moléculas lipídicas durante a formação da monocamada pode ser vista no Esquema 12. Com o fechamento das barreiras móveis e compressão da monocamada, os lipídios vão se organizando, sempre mantendo a cabeça polar na água e a parte apolar para fora. Com o aumento da pressão a monocamada passa por uma transição da fase gasosa (G) para uma fase mais condensada, chamada de fase líquida ou fase gel (L1 e L2). Em baixa densidade de moléculas na superfície, a monocamada lipídica se comporta como um gás bidimensional e a interação entre os lipídios é quase inexistente devido à grande distância molecular média entre as moléculas e com o aumento da densidade de moléculas os lipídios começam a interagir, resultando em uma fase mais condensada em com maior organização.⁶²



Esquema 12. Representação genérica de uma Isoterma de Langmuir e organização lipídica lateral.

Quando uma molécula interage com a monocamada lipídica, ela poderá se inserir em diferentes locais dependendo de suas propriedades. A molécula pode interagir na superfície do líquido, com as cabeças polares, ou na superfície da camada polar. Além disso, uma molécula anfipática pode também assumir um sítio no meio da monocamada lipídica.⁶²

O estado físico e as transições de fase de uma monocamada de Langmuir são classificadas de acordo com a pressão responsável pela redução de área, esse parâmetro é conhecido com Módulo de Compressibilidade da Superfície (C_s^{-1}) e pode ser calculado pela Equação 2.^{61,63,64}

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

O módulo de compressibilidade reflete o empacotamento da monocamada, quanto maior seu valor, menos compressível é a monocamada. A Figura 4 mostra uma isoterma de pressão superficial para o lipídio DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), indicando as fases possíveis para esse lipídio.⁶³

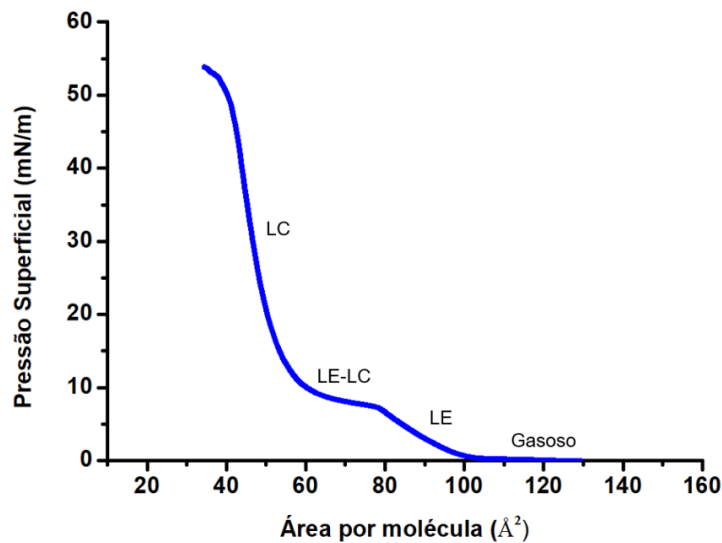


Figura 4. Isoterma de pressão superficial de monocamada de DPPC, com representação das fases.

Na fase gasosa as temos a monocamada muito expandida, caracterizada por valores de C_s^{-1} próximos de 0 mN/m. Durante o processo de compressão, as moléculas da monocamada se aproximam e as interações entre elas ficam mais fortes. Na fase líquido expandido (LE), o valor de C_s^{-1} estão entre 0 e 50 mN/m e para a fase líquido condensado (LC) os valores estão entre 100 e 250 mN/m. Como observado na Figura 4, a isoterma do lipídio DPPC possui uma região de transição de fase (LE-LC) que se apresenta de forma característica no decorrer da isoterma. Essa mesma transição pode ser observada no gráfico do módulo de compressibilidade em função da pressão superficial (Figura 5), com o surgimento de um mínimo no curso da função, dividindo o gráfico em dois máximos que correspondem às fazes LE e LC.⁶³⁻⁶⁵

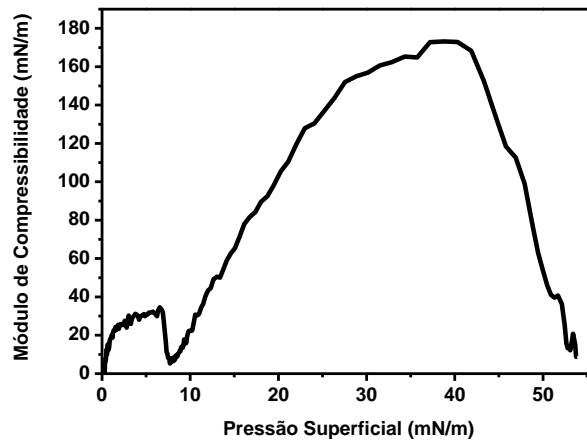
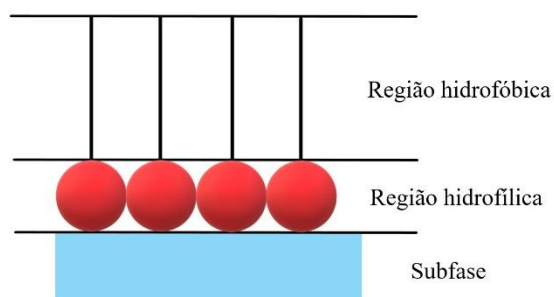


Figura 5. Dependência do módulo de compressibilidade em função da pressão superficial para monocamada de DPPC

Outro parâmetro muito utilizado em medidas envolvendo monocamadas de Langmuir é o Potencial de Superfície. O potencial de superfície (ΔV) pode ser definido como a diferença de potencial entre uma superfície aquosa recoberta com o filme de Langmuir e uma superfície sem a monocamada. Esse potencial irá depender da distribuição de cargas ao longo da superfície e será proporcional ao momento de dipolo na interface. Devido às polaridades distintas no meio onde os dipolos estão inseridos, a monocamada foi tratada como um capacitor de três camadas, como ilustrado no Esquema 13, onde cada camada de dipolos está localizada em um meio com determinada constante dielétrica, sendo assim o sistema é dividido em três partes, a região hidrofóbica, a região hidrofílica e a subfase^{60,63} e uma alteração em alguma dessas camadas poderá mudar o potencial da superfície. A Figura 6, apresenta a curva de potencial de superfície para o lipídio DPPC, observa-se um significativo aumento do potencial de superfície no momento em que a monocamada começa a se comprimir, pois as moléculas de lipídio começar a interagir e se organizar.



Esquema 13. Modelo para explicar o potencial de superfície da monocamada, onde a monocamada é tratada como um capacitor de três camadas.

O potencial de superfície tende a aumentar conforme a monocamada é comprimida, devido à uma maior organização da orientação nos dipolos.^{60,63} Para fosfolipídios, acredita-se que os momentos de dipolo dos grupos ésteres da glicerina são os que mais contribuem para o potencial resultante do sistema.^{63,66}

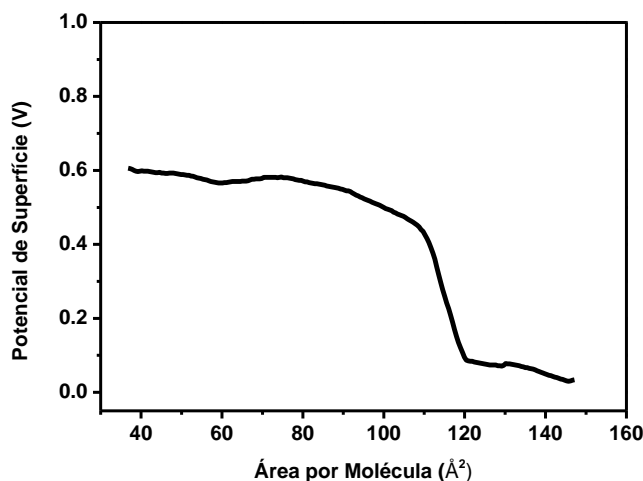


Figura 6. Isoterma de Potencial de Superfície para o lipídio DPPC

Além das mudanças envolvendo a pressão superficial, mudanças na morfologia lipídica na interface ar-água podem ser estudadas pela microscopia de ângulo de Brewster.^{67,68} Este método permite o estudo *in situ* das monocamadas bidimensionais de Langmuir na interface ar-água. A técnica não usa compostos de sonda ou quaisquer outras modificações para amostrar para investigação; portanto, garante que a monocamada sob investigação esteja em seu estado original.³

Investigar as interações em nível molecular em monocamadas de Langmuir é uma das tarefas mais desafiadoras de se realizar; ainda assim, somente com esse tipo de informação é possível determinar os mecanismos responsáveis pela ação de adsorção de moléculas biologicamente relevantes. As espectroscopias vibracionais se tornaram possíveis desde que métodos e instrumentação foram melhorados para medir os sinais intrinsecamente fracos de uma única camada de moléculas. Uma das técnicas utilizadas é a espectroscopia de absorção e reflexão infravermelha modulada por polarização (PM-IRRAS).⁶³

As bandas no sinal PM-IRRAS dependem da orientação do momento dipolar de transição de um dado grupo funcional. Ácidos graxos e fosfolipídios com grupos metileno orientados paralelamente à interface geralmente dão bandas proeminentes no PM-IRRAS.⁶⁹ Duas dessas bandas são mais exploradas, aquelas relacionadas ao alongamento assimétrico e

simétrico de CH₂, cujos picos estão localizados em 2920 e 2950 cm⁻¹, respectivamente. A ordenação das cadeias pode ser inferida da razão das intensidades das bandas.⁷⁰ A posição da banda varia com temperatura e empacotamento molecular, e um aumento no número de onda é observado para uma desordem aumentada.^{71,72} Além de informações sobre a orientação do momento dipolar de transição, é possível obter dos espectros PM-IRRAS evidências sobre interações moleculares, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e desidratação de grupos polares. De particular relevância são as bandas de alongamento de carbonila (1700-1750 cm⁻¹) e fosfato (1000-1300 cm⁻¹), que geralmente são afetadas por moléculas vindas da subfase aquosa e hidratação dos grupos polares, incluindo ligações de hidrogênio.^{63,73}

Os modelos de membrana têm servido em muitos casos como propulsores na percepção da biofísica e bioquímica da membrana lipídica em aplicações tecnológicas, seja no design de novos materiais funcionais, tecnologias de encapsulamento em nanoescala para alimentos e medicamentos, sensores e tecnologia viva.²⁷

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de interação biofísica com membranas modelo fornecem uma abordagem simples, porém eficaz, para entender o papel dos lipídios de membrana em diversas funções em que atuam. Com melhor entendimento dos mecanismos de interações, estudos de interação biofísica com membranas modelo podem fornecer uma abordagem eficiente para descoberta e desenvolvimento de novos mecanismos que envolvam membranas celulares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach*.
- (2) Gorter, E.; Grendel, F. ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *Journal of Experimental Medicine* **1925**, *41* (4), 439–443. <https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>.
- (3) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol Pharm* **2009**, *6* (5), 1264–1276. <https://doi.org/10.1021/mp9000662>.
- (4) LUFTIG, R. B. Membrane Structure: The Unit Membrane Model, Unit Membrane Structure, Cell Surfaces of Eukaryotes and Prokaryotes, Cell Junctions, New Techniques. In *Cytology and Cell Physiology*; Elsevier, 1987; pp 275–299. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091882-2.50012-9>.
- (5) Hatafi, Y. *The Structural Basis of Membrane Function*; Academic Press, Inc: Nova Iorque, 2012; Vol. 72.
- (6) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* (1979) **1972**, *175* (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- (7) Vereb, G.; Szöllösi, J.; Matkó, J.; Nagy, P.; Farkas, T.; Vigh, L.; Mátyus, L.; Waldmann, T. A.; Damjanovich, S. Dynamic, yet Structured: The Cell Membrane Three Decades after the Singer–Nicolson Model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (14), 8053–8058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332550100>.
- (8) Escribá, P. V. Membrane-Lipid Therapy: A New Approach in Molecular Medicine. *Trends Mol Med* **2006**, *12* (1), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.11.004>.
- (9) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- (10) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- (11) Pike, L. J. Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **2006**, *47* (7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>.

- (12) Kiessling, V.; Wan, C.; Tamm, L. K. Domain Coupling in Asymmetric Lipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788* (1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.003>.
- (13) Raghupathy, R.; Anilkumar, A. A.; Polley, A.; Singh, P. P.; Yadav, M.; Johnson, C.; Suryawanshi, S.; Saikam, V.; Sawant, S. D.; Panda, A.; Guo, Z.; Vishwakarma, R. A.; Rao, M.; Mayor, S. Transbilayer Lipid Interactions Mediate Nanoclustering of Lipid-Anchored Proteins. *Cell* **2015**, *161* (3), 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.048>.
- (14) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (1979)* **2010**, *327* (5961), 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
- (15) Simons, K.; Vaz, W. L. C. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2004**, *33* (1), 269–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>.
- (16) Waheed, A. A.; Freed, E. O. The Role of Lipids in Retrovirus Replication. *Viruses* **2010**, *2* (5), 1146–1180. <https://doi.org/10.3390/v2051146>.
- (17) Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- (18) Yamashita, A.; Hayashi, Y.; Nemoto-Sasaki, Y.; Ito, M.; Oka, S.; Tanikawa, T.; Waku, K.; Sugiura, T. Acyltransferases and Transacylases That Determine the Fatty Acid Composition of Glycerolipids and the Metabolism of Bioactive Lipid Mediators in Mammalian Cells and Model Organisms. *Prog Lipid Res* **2014**, *53*, 18–81. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.10.001>.
- (19) Drescher, S.; van Hoogevest, P. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (12), 1235. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121235>.
- (20) Liu, P.; Chen, G.; Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **2022**, *27* (4), 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.

- (21) Pajewski, R.; Djedovič, N.; Harder, E.; Ferdani, R.; Schlesinger, P. H.; Gokel, G. W. Pore Formation in and Enlargement of Phospholipid Liposomes by Synthetic Models of Ceramides and Sphingomyelin. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13* (1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.001>.
- (22) Israelachvili, J. N. Refinement of the Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1977**, *469* (2), 221–225. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90185-7).
- (23) Kaddah, S.; Khreich, N.; Kaddah, F.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Cholesterol Modulates the Liposome Membrane Fluidity and Permeability for a Hydrophilic Molecule. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *113*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017>.
- (24) Bhattarai, A.; Likos, E. M.; Weyman, C. M.; Shukla, G. C. Regulation of Cholesterol Biosynthesis and Lipid Metabolism: A MicroRNA Management Perspective. *Steroids* **2021**, *173*, 108878. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108878>.
- (25) Nelson, D. L. ; C. M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6th ed.; 2014.
- (26) Sessa, G.; Weissmann, G. Phospholipid Spherules (Liposomes) as a Model for Biological Membranes. *J Lipid Res* **1968**, *9* (3), 310–318. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)43097-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)43097-4).
- (27) Mouritsen, O. G. Model Answers to Lipid Membrane Questions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3* (9), a004622–a004622. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004622>.
- (28) Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as Nanomedical Devices. *Int J Nanomedicine* **2015**, *9*, 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- (29) Reza Mozafari, M.; Johnson, C.; Hatziantoniou, S.; Demetzos, C. Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. *J Liposome Res* **2008**, *18* (4), 309–327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>.
- (30) GOMEZHENS, A.; FERNANDEZROMERO, J. Analytical Methods for the Control of Liposomal Delivery Systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25* (2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.006>.

- (31) Wagner, A.; Vorauer-Uhl, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *J Drug Deliv* **2011**, *2011*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/591325>.
- (32) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J Mol Biol* **1965**, *13* (1), 238–IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- (33) Bagatolli, L. A. To See or Not to See: Lateral Organization of Biological Membranes and Fluorescence Microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758* (10), 1541–1556. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.019>.
- (34) Fidorra, M.; Garcia, A.; Ipsen, J. H.; Härtel, S.; Bagatolli, L. A. Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles and Their Correspondence with Equilibrium Thermodynamic Phases: A Quantitative Fluorescence Microscopy Imaging Approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788* (10), 2142–2149. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.006>.
- (35) Dietrich, C.; Bagatolli, L. A.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys J* **2001**, *80* (3), 1417–1428. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76114-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76114-0).
- (36) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. Supported Phospholipid Bilayers. *Biophys J* **1985**, *47* (1), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83882-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83882-0).
- (37) Lagerholm, B. C.; Starr, T. E.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L. Rebinding of IgE Fabs at Haptenated Planar Membranes: Measurement by Total Internal Reflection with Fluorescence Photobleaching Recovery. *Biochemistry* **2000**, *39* (8), 2042–2051. <https://doi.org/10.1021/bi9917434>.
- (38) Cremer, P. S.; Boxer, S. G. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J Phys Chem B* **1999**, *103* (13), 2554–2559. <https://doi.org/10.1021/jp983996x>.
- (39) Egawa, H.; Furusawa, K. Liposome Adhesion on Mica Surface Studied by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **1999**, *15* (5), 1660–1666. <https://doi.org/10.1021/la980923w>.
- (40) Zasadzinski, J. A.; Helm, C. A.; Longo, M. L.; Weisenhorn, A. L.; Gould, S. A.; Hansma, P. K. Atomic Force Microscopy of Hydrated Phosphatidylethanolamine Bilayers. *Biophys J* **1991**, *59* (3), 755–760. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82288-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82288-3).

- (41) McConnell, H. M.; Watts, T. H.; Weis, R. M.; Brian, A. A. Supported Planar Membranes in Studies of Cell-Cell Recognition in the Immune System. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1986**, *864* (1), 95–106. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(86\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(86)90016-X).
- (42) Brian, A. A.; McConnell, H. M. Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T Cells by Supported Planar Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81* (19), 6159–6163. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.6159>.
- (43) Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K. Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1103* (2), 307–316. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90101-Q](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90101-Q).
- (44) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. *Surf Sci Rep* **2006**, *61* (10), 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>.
- (45) Roessner, C. A.; Struck, D. K.; Ihler, G. M. Injection of DNA into Liposomes by Bacteriophage Lambda. *J Biol Chem* **1983**, *258* (1), 643–648.
- (46) Mimms, L. T.; Zampighi, G.; Nozaki, Y.; Tanford, C.; Reynolds, J. A. Phospholipid Vesicle Formation and Transmembrane Protein Incorporation Using Octyl Glucoside. *Biochemistry* **1981**, *20* (4), 833–840. <https://doi.org/10.1021/bi00507a028>.
- (47) Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure. *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1681–1691. <https://doi.org/10.1021/la0263920>.
- (48) Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays. *Biophys J* **2002**, *83* (6), 3371–3379. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75337-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75337-X).
- (49) Crane, J. M.; Kiessling, V.; Tamm, L. K. Measuring Lipid Asymmetry in Planar Supported Bilayers by Fluorescence Interference Contrast Microscopy. *Langmuir* **2005**, *21* (4), 1377–1388. <https://doi.org/10.1021/la047654w>.

- (50) Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K. Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1103* (2), 307–316. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90101-Q](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90101-Q).
- (51) Kiessling, V.; Domanska, M. K.; Murray, D.; Wan, C.; Tamm, L. K. Supported Lipid Bilayers. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*; Wiley, 2008; pp 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470048672.wecb663>.
- (52) Crane, J. M.; Tamm, L. K. Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys J* **2004**, *86* (5), 2965–2979. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74347-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74347-7).
- (53) TAMM, L. K.; TATULIAN, S. A. Infrared Spectroscopy of Proteins and Peptides in Lipid Bilayers. *Q Rev Biophys* **1997**, *30* (4), 365–429. <https://doi.org/10.1017/S0033583597003375>.
- (54) Merzlyakov, M.; Li, E.; Casas, R.; Hristova, K. Spectral Förster Resonance Energy Transfer Detection of Protein Interactions in Surface-Supported Bilayers. *Langmuir* **2006**, *22* (16), 6986–6992. <https://doi.org/10.1021/la061038d>.
- (55) Thompson, N. L.; Steele, B. L. Total Internal Reflection with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Nat Protoc* **2007**, *2* (4), 878–890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.110>.
- (56) Hinterdorfer, P.; Baber, G.; Tamm, L. K. Reconstitution of Membrane Fusion Sites. A Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy Study of Influenza Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion. *J Biol Chem* **1994**, *269* (32), 20360–20368.
- (57) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* **2003**, *100–102*, 563–584. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4).
- (58) Marsh, D. Intrinsic Curvature in Normal and Inverted Lipid Structures and in Membranes. *Biophys J* **1996**, *70* (5), 2248–2255. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79790-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79790-4).
- (59) Giner-Casares, J. J.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers as Unique Physical Models. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2014**, *19* (3), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.006>.

- (60) Ferreira, M.; Caetano, W.; Itri, R.; Tabak, M.; Oliveira Jr., O. N. Técnicas de Caracterização Para Investigar Interações No Nível Molecular Em Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Quim Nova* **2005**, *28* (3), 502–510. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300024>.
- (61) Pereira, A. R.; de Oliveira Junior, O. N. Recent Advances in the Use of Langmuir Monolayers as Cell Membrane Models. *Eclética Química Journal* **2021**, *46* (1SI), 18–29. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v46.1SI.2021.p18-29>.
- (62) Shen, C. Molecular Effectors at the Headgroup-Chain Interfaces of Lipids. Thesis, University of Southern Denmark, 2012.
- (63) Oliveira, O. N.; Caseli, L.; Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chem Rev* **2022**, *122* (6), 6459–6513. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>.
- (64) Nowotarska, S.; Nowotarski, K.; Friedman, M.; Situ, C. Effect of Structure on the Interactions between Five Natural Antimicrobial Compounds and Phospholipids of Bacterial Cell Membrane on Model Monolayers. *Molecules* **2014**, *19* (6), 7497–7515. <https://doi.org/10.3390/molecules19067497>.
- (65) Ładniak, A.; Jurak, M.; Wiącek, A. E. Langmuir Monolayer Study of Phospholipid DPPC on the Titanium Dioxide–Chitosan–Hyaluronic Acid Subphases. *Adsorption* **2019**, *25* (3), 469–476. <https://doi.org/10.1007/s10450-019-00037-1>.
- (66) Miller, A.; Helm, C. A.; Möhwald, H. The Colloidal Nature of Phospholipid Monolayers. *Journal de Physique* **1987**, *48* (4), 693–701. <https://doi.org/10.1051/jphys:01987004804069300>.
- (67) Corvis, Y.; Barzyk, W.; Brezesinski, G.; Mrabet, N.; Badis, M.; Hecht, S.; Rogalska, E. Interactions of a Fungistatic Antibiotic, Griseofulvin, with Phospholipid Monolayers Used as Models of Biological Membranes. *Langmuir* **2006**, *22* (18), 7701–7711. <https://doi.org/10.1021/la060998x>.
- (68) Amado, E.; Kerth, A.; Blume, A.; Kressler, J. Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Coupled with Brewster Angle Microscopy for Studying Interactions of Amphiphilic Triblock Copolymers with Phospholipid Monolayers. *Langmuir* **2008**, *24* (18), 10041–10053. <https://doi.org/10.1021/la801768m>.

- (69) Mendelsohn, R.; Mao, G.; Flach, C. R. Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy: Principles and Applications to Lipid–Protein Interaction in Langmuir Films. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798* (4), 788–800. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.024>.
- (70) Taylor, D. M.; Bayes, G. F. The Surface Potential of Langmuir Monolayers. *Materials Science and Engineering: C* **1999**, *8–9*, 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(99\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(99)00064-8).
- (71) Dluhy, R. A.; Reilly, K. E.; Hunt, R. D.; Mitchell, M. L.; Mautone, A. J.; Mendelsohn, R. Infrared Spectroscopic Investigations of Pulmonary Surfactant. Surface Film Transitions at the Air-Water Interface and Bulk Phase Thermotropism. *Biophys J* **1989**, *56* (6), 1173–1181. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82764-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82764-X).
- (72) Kodati, V. R.; Lafleur, M. Comparison between Orientational and Conformational Orders in Fluid Lipid Bilayers. *Biophys J* **1993**, *64* (1), 163–170. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81351-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81351-1).
- (73) Du, X.; Miao, W.; Liang, Y. IRRAS Studies on Chain Orientation in the Monolayers of Amino Acid Amphiphiles at the Air–Water Interface Depending on Metal Complex and Hydrogen Bond Formation with the Headgroups. *J Phys Chem B* **2005**, *109* (15), 7428–7434. <https://doi.org/10.1021/jp0441700>.