



Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Física

Trabalho de Conclusão de Curso

**Aplicação da espectroscopia de impedância  
na investigação da interação do ácido  
2-hidroxi-oléico com lipossomas de  
fosfatidilcolina**

Acadêmico: Marcos William Crisóstomo Silva

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Garcia Fernandes  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Kellen Brunaldi - Departamento de

Fisiologia

Maringá, 15 de abril de 2023



Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Física

Trabalho de Conclusão de Curso

**Aplicação da espectroscopia de impedância  
na investigação da interação do ácido  
2-hidroxi-oléico com lipossomas de  
fosfatidilcolina**

TCC apresentado ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do professor Dr. Paulo Ricardo Garcia Fernandes, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Física.

Acadêmico: Marcos William Crisóstomo Silva

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Garcia Fernandes  
Coorientador: Prof<sup>ca</sup>. Dra. Kellen Brunaldi

Maringá, 15 de abril de 2023

*"A desvalorização do mundo humano aumenta em proporção direta com a valorização do mundo das coisas."*

---

Karl Marx.

*"So oft in theologic wars,  
The disputants, I ween,  
Rail on in utter ignorance  
Of what each other mean,  
And prate about an Elephant  
Not one of them has seen!"*

---

John Godfrey Saxe, *The Blind Men and The Elephant.*

# Dedicatória

---

Dedico este trabalho primeiramente à minha querida família. À minha mãe, Maria de Fátima Crisóstomo, meu pai, Luiz Carlos da Silva e meu padrao, Valdir Eduardo de Moraes, que me criaram para ser bondoso, empático, responsável e por todo o resto que me ensinaram e por todo amor e carinho dedicado a mim.

À Mayra Koma Gomes, minha namorada e parceira nos momentos difíceis, agradeço do fundo do meu ser, por todo o seu apoio, carinho e amor. Obrigado pelos ótimos momentos ao seu lado, pelos momentos de restauração de sanidade mental, e por ser essa maravilhosa pessoa em que posso sempre contar. Obrigado também por permitir eu contar a mesma piada centenas de vezes e você rir todas as vezes graças a sua memória fraca. Cada centímetro de meu ser agradece por cada momento ao seu lado, bom e ruim, nestes últimos quatro anos.

Aos meus irmãos Luiz Carlos da Silva Júnior e Danilo Guilherme Crisóstomo Silva, e a minha irmã, Meiriane Caroline da Silva, por todas as lições, discussões e por sempre estarem ao meu lado.

À Sophia, à Beatriz, ao Luiz Felipe e ao Lucas, meus adorados sobrinhos em que desde o nascimento de vocês, pude ensinar, brincar e cuidar, ensinando sempre a serem boas pessoas no futuro.

Aos grandes amigos que a vida me proporcionou: John Tsuyoshi, Ruan Gaspar Branco (Duck), Thierry Coutinho, Alexandre Alabora, Matheus Santos, Maurício Mazurek, Vítor Hugo Ribeiro, Jhonatan Berrar, Brenno Greatti, Mayra Saretti, Mateus Kiyugoro, Gabriel Marino, Laura Lovison e a todos os outros que não consegui mencionar. Que vocês tenham sucesso aonde forem!

Ao Mimi, gato do Bloco F67, por sempre se aninhar em mim, permitir que eu faça carinho e por todos os pães amassados em meu colo que ajudaram a nutrir minha sanidade de volta.

Uma menção especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kellen Brunaldi e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>, Maria Ida, que me acolheram, ensinaram, orientaram e permitiram que eu me desenvolvesse tanto na pesquisa científica, quanto na área de ensino.

Por fim, e não menos importante, dedico este trabalho à todas as pessoas que participaram de minha vida, que contribuíram para a minha formação pessoal, acadêmica e emocional.

# Agradecimentos

---

Meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Garcia Fernandes e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kellen Brunaldi. Obrigado Prof<sup>a</sup> Kellen por me aceitar como aluno de iniciação científica, auxiliar no meu aprendizado em uma disciplina tão distante e ao mesmo tempo tão perto da Física. Agradeço também por terem me orientado em todas as etapas deste trabalho. Dedico a vocês todo o meu respeito e admiração.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Carlos Messias Freire com toda a ajuda e considerações durante a etapa experimental deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hatusmi Mukai, por todo o auxílio prestado e apoio durante todo o processo.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. André Marino, que durante a graduação me prestou o apoio e sempre se preocupou com o bem-estar dos alunos. Obrigado por toda sua atenção e disposição em ensinar. Mais uma vez obrigado!

Agradeço também à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela oportunidade de estudar uma instituição de excelência, e um obrigado especial a todos os professores do departamento de Física que participaram e contribuíram de alguma forma na minha formação durante os árduos anos deste curso.

E não menos importante, à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia do Nascimento Brito, do departamento de ciências fisiológicas (DFS), que com suas aulas me cativou pelo aprendizado de Biofísica e me apresentou a Prof<sup>a</sup> Kellen, culminando finalmente neste trabalho.

Por fim, pelo apoio financeiro agradeço ao CNPq e à Capes.

# Resumo

---

O ácido 2-hidroxi-oléico é um ácido graxo já sendo testado em humanos como forma de tratamento para diversos tipos de cânceres e alguns dos processos químicos e biofísicos de interação do ácido com as células já são reportados na literatura. Neste contexto, estudou-se os fundamentos acerca das membranas fosfolipídicas e da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, o qual foi aplicada para a avaliação da interação entre o ácido incorporado em uma membrana fosfolipídica de um lipossoma. Avaliando a impedância, encontrou-se prováveis evidências de uma interação entre o ácido e a membrana, na forma ionizada.

**Palavras chave:** Fosfolipídios, Fluidez de membrana, Vesículas unilamelares grandes, Espectroscopia de Impedância.

# Abstract

---

The 2-Hydroxy-oleic acid is a fatty acid being tested in humans as a form of treatment for several types of cancer. Some of the chemical and biophysical processes of interaction between the acid with the cells membranes are reported in the literature. In this context, the basic principles of phospholipid membranes and the electrochemical impedance spectroscopy technique were studied and applied to evaluate the interaction between the acid incorporated into a phospholipid membrane of a liposome. The impedance has shown evidence of an interaction between the acid and the membrane, in it's ionized form.

**Keywords:** Phospholipids, Membrane fluidity, Large Unilamellar Vesicles, Eletrochemical Impedance Spectroscopy.

# Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

---

## Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

POPC	$C_{42}H_{82}NO_8P$	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
2OHOA	$C_{18}H_{34}O_3$	2-Hidroxi-oléico
$Q$	$[C]$	Carga elétrica
$C$	$[F]$	Capacitância
$I$	$[A]$	Corrente elétrica
AC		Corrente Alternada
DC		Corrente Contínua
DDS		Drug Delivery System
CPE		Elemento de Fase Constante
SMS		Esfingomielianase
EIE		Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
EDO		Equação Diferencial Ordinária
$\varepsilon$	$[V]$	Força eletromotriz
$\omega$	$[\text{rad/s}]$	Frequência angular
GBM		Glioblastoma multiforme
GUV		Giant Unilamellar Vesicle
$Z$	$[\Omega]$	Impedância elétrica
$L$	$[H]$	Indutância
LUV		Large Unilamellar Vesicle
$X_C$	$[\Omega]$	Reatância capacitiva
$X_L$	$[\Omega]$	Reatância Indutiva
$R$	$[\Omega]$	Resistência elétrica
RC		Resistor-Capacitor
RL		Resistor-Indutor
$V$	$[V]$	Tensão Elétrica

# Lista de Figuras

---

1.1	Estrutura geral de um fosfolipídio com sua cabeça polar (grupo fosfato e glicerol) e caudas apolares (cadeias de ácidos graxos). . . . .	4
1.2	<b>Estruturas de fosfolipídios</b> - Os fosfolipídios possuem glicerol ou esfingosina como esqueleto (em vermelho), ligados aos grupos alquila, as cadeias de ácido graxos (em amarelo) e uma cabeça polar (em azul). . . . .	5
1.3	a) Estrutura usual de um glicerofosfolipídio. b) estrutura de um esfingolipídio.	6
1.4	Uma molécula de fosfatidilcolina. . . . .	6
1.5	Bicamada lipídica. . . . .	7
1.6	Vesícula multilamelar e vesícula unilamelar respectivamente. . . . .	7
1.7	Formação natural de MLV durante o processo de hidratação do filme seco.	8
1.8	Estado gel ( $L_\beta$ ) e estado líquido-cristalino ( $L_\alpha$ ) de uma bicamada lipídica. . . . .	9
1.9	Estrutura molecular do ácido 2OHOA. . . . .	10
2.1	Plano de Argand-Gauss. . . . .	14
2.2	Símbolos dos elementos passivos utilizados no diagrama de circuitos. . . . .	15
2.3	Circuito puramente indutivo. . . . .	16
2.4	Representação complexa de $\hat{V}$ e $\hat{I}$ para um indutor. . . . .	17
2.5	Circuito puramente capacitivo. . . . .	18
2.6	Representação complexa de $\hat{V}$ e $\hat{I}$ para um capacitor. . . . .	19
2.7	Circuito RC e circuito RL respectivamente. . . . .	19
2.8	Impedância complexa do circuito RL. . . . .	20
2.9	Porta amostra padrão com os dois eletrodos gerando o campo elétrico. . . . .	21
2.10	Exemplo de diagrama de Nyquist. . . . .	21
2.11	Número de artigos publicados sobre espectroscopia de impedância. . . . .	22
2.12	Comparação da água Milli-Q em dois eletrodos de materiais diferentes. . . . .	22
2.13	Circuito equivalente de uma membrana neuronal. . . . .	23
3.1	Montagem esquemática do mini extrusor da Avanti Polar Lipids. . . . .	25
3.2	Solartron SI 1260 Impedance/Gain-phase analyze da empresa Ametek Scientific Instruments. . . . .	26
3.3	Montagem experimental para a medição da impedância. . . . .	26
4.1	Espectro de impedância elétrica da amostra de solução tampão fosfato. A curva preta corresponde ao ajuste obtido com um circuito elétrico (Figura 4.2) e os pontos azuis ao valor médio das 10 medidas. O erro percentual médio foi de 5%. . . . .	28
4.2	Circuito equivalente da solução tampão. Em que $R_s$ , $R_1$ e $R_2$ são resistores, $C_2$ e $C_1$ são capacitores e CPE1 é um elemento de fase constante, atuando como um capacitor imperfeito. . . . .	28

4.3	Espectro de impedância elétrica da amostra de solução tampão com LUV e do tampão com o ácido 2OHOA. Em a) e b) tem-se a parte real e a parte imaginária da da solução tampão com a LUV com concentração de 2,71mM e em c) e d) do tampão com a adição do ácido 2OHOA com concentração de 56mM. . . . .	29
4.4	Espectro de impedância elétrica da amostra da LUV com ácido 2OHOA incubado por 1h, em comparação com as medidas anteriores. Com um erro percentual associado a esta medida foi de 11%. . . . .	30

# Lista de Tabelas

---

3.1	Componentes utilizados, com os pesos e as concentrações molares, para a produção de uma solução tampão fosfato. . . . .	24
3.2	Reagentes utilizados para a formulação de uma solução estoque de ácido 2OHOA a 56mM. . . . .	25
4.1	Elementos utilizados e seus respectivos valores para o ajuste da solução tampão. . . . .	29

# Sumário

---

<b>Dedicatória</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Introdução</b>	<b>2</b>
<b>1 Biofísica de Membranas</b>	<b>4</b>
1.1 Lipídios da Membrana . . . . .	4
1.1.1 Fosfolipídeos . . . . .	5
1.1.2 Lipossomas . . . . .	6
1.2 Fluidez de membrana . . . . .	9
1.2.1 Ácido 2-hidroxi-oléico . . . . .	10
<b>2 Espectroscopia de Impedância</b>	<b>12</b>
2.1 Breve História da Espectroscopia de Impedância . . . . .	12
2.2 Números Complexos e Equações Diferenciais . . . . .	13
2.2.1 Números Complexos . . . . .	13
2.2.2 Equações diferenciais . . . . .	14
2.3 Circuitos . . . . .	15
2.3.1 Elementos passivos de um circuito . . . . .	15
2.3.2 Circuitos Elétricos de Corrente Alternada . . . . .	15
2.3.3 Reatância para um circuito puramente indutivo . . . . .	16
2.3.4 Reatância para um circuito puramente capacitivo . . . . .	18
2.4 Impedância em circuitos RC e RL . . . . .	19
2.5 Espectroscopia de Impedância . . . . .	21
2.5.1 Elétrodos e circuitos equivalente . . . . .	22
<b>3 Técnicas, Procedimentos Experimentais e Amostras Investigadas</b>	<b>24</b>
3.1 Preparação de tampão e soluções estoque . . . . .	24
3.2 Medidas de Espectroscopia de Impedância . . . . .	25
<b>4 Resultados e Discussões</b>	<b>28</b>

<b>5 Conclusões</b>	<b>32</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>33</b>
<b>A Operações com números complexos</b>	<b>37</b>
<b>B Cálculo da Impedância para um circuito RC e RL</b>	<b>39</b>
<b>C Soluções de Equações Diferenciais Ordinárias</b>	<b>40</b>
C.1 Separação de variáveis . . . . .	40
C.2 EDOs de Segunda ordem . . . . .	41

# Introdução

---

Encontrar novos fármacos e formas de administração é imprescindível para o bem estar e saúde humana. Entretanto, fármacos podem apresentar muitos efeitos tóxicos tais como a diminuição da atividade motora, perda de coordenação motora, morte neuronal e disrupção do ciclo hormonal e etc [1].

O ácido 2-hidroxi-oléico (2OHOA), é um ácido graxo de cadeia longa derivado sintético do ácido oléico com uma hidroxila no carbono  $\alpha$ . O 2OHOA é um candidato a fármaco para o tratamento do câncer cerebral glioblastoma multiforme (GBM) [2–5], de elevada taxa de mortalidade (tempo médio de vida de 2 anos). O GBM possui um alto poder infiltrativo e resistência à quimioterapia, além de uma proliferação celular descontrolada, com propensão à necrose e angiogênese intensa [6]. O ácido 2OHOA tem como alvo principal a membrana celular, mais especificamente a sua composição lipídica, o que pode levar a uma modulação na atividade de proteínas de membrana e conseqüentemente na sinalização celular. Postula-se que o ácido interage com as membranas celulares reduzindo a fluidez de membrana (efeito rigificador) atuando como co-adjuvante no tratamento quimioterápico [7].

O desenvolvimento em diversas áreas para sistemas de entrega de fármacos, ou *Drug Delivery System* (DDS), visam alterar características farmacocinéticas e de especificidade, visando uma diminuição de toxicidade, aumento de eficácia farmacológica ou administração em local específico, por meio de técnicas e de dispositivos físicos, químicos ou biológicos [8–10].

Os estudos farmacológicos com ensaios *in vivo*, possuem diversas dificuldades e empecilhos. Desta maneira, os lipossomas surgem como uma alternativa biomimética de membrana celular. Adicionalmente, são sistemas promissores de sistema entrega de fármacos (DDS), por conta de seu tamanho, suas características anfipáticas e biocompatibilidade [11].

O estudo da interação de fármacos com o lipossomas muitas vezes empregam métodos a alteração dos lipossomas por agentes químicos, tais como sondas de fluorescência. Entretanto tais modificações podem acarretar nos resultados obtidos [12].

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) fornece informações sobre a interação fármaco-lipossoma sem a necessidade de modificar quimicamente a bicamada lipídica. O EIE também permite que ocorra uma caracterização elétrica da amostra por um grande espectro de propriedades elétricas, fornecendo assim, uma visão abrangente das características da amostra, seja em função do tempo, da temperatura ou da frequência. É então necessário um estudo aprofundado da impedância de diversos componentes, como a solução tampão e os lipossomas, além de outros sistemas como os circuitos elétricos [13–15].

No Capítulo 1 faz-se uma introdução sobre os conceitos bioquímicos e biológicos das membranas celulares, como a apresentação da composição lipídica das mesmas e por fim a organização estrutural dos lipossomas. Adicionalmente é descrito as propriedades físico-químicas e farmacológicas do ácido 2OHOA, o mesmo utilizado nos ensaios de impedância

com lipossomas.

No Capítulo 2 será apresentado uma breve revisão acerca do desenvolvimento matemático necessária para tratar da impedância. Os números complexos e as equações diferenciais, que por sua vez, são essenciais para o entendimento da impedância e para o tratamento teórico e experimental [16]. Também será discutido sobre circuitos simples com elementos passivos, que poderá ser utilizado para uma modelagem experimental posteriormente. E por fim, será apresentado a técnica de espectroscopia de impedância, tanto os seus prós e contras a fim de compreendermos melhor o EIE e os fatores que influenciam os resultados experimentais, oferecendo assim uma análise mais concisa e crítica.

No Capítulo 3 descreve-se toda a metodologia utilizada, assim como os equipamentos e os reagentes.

Por sua vez, no Capítulo 4 são apresentados os resultados experimentais, as análises e a discussão acerca dos experimentos realizados, relacionando-se sempre que possível, com os modelos teóricos presentes na literatura.

E, por fim, no Capítulo 5, encontram-se as considerações finais deste trabalho e as perspectivas futuras serão apresentadas aqui.

Nos Apêndices, será possível encontrar material complementar sobre a parte do desenvolvimento matemático.

# Biofísica de Membranas

---

As membranas surgem como uma das necessidades mais básicas de todos os sistemas biológicos, dando a possibilidade de compartimentalizar meios com características físico-químicas distintas, como o meio intracelular e o meio extracelular. A membrana celular é barreira de proteção, entretanto é seletiva a determinados solutos e é capaz gerar e manter gradientes químicos e elétricos.

As membranas celulares são compostas principalmente por lipídios e proteínas. Os lipídios mais abundantes são os fosfolipídios (glicerofosfolipídios e esfingolipídios) e o colesterol. Contudo 1-2% do total de lipídios da membrana estão presentes na forma de ácidos graxos livres (AGL). Em geral, todas as membranas possuem características em comum, tal como a flexibilidade e a insolubilidade em água, atribuída pela sua composição lipídica [17, 18].

## 1.1 Lipídios da Membrana

Os lipídios são compostos orgânicos heterogêneos pouco solúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio. Os lipídios de membrana apresentam uma grande variedade estrutural, sendo encontrado em membranas biológicas glicolipídios, esteroides (colesterol e seus derivados) e fosfolipídios. Em geral, apresentam características anfipáticas, com uma região hidrofóbica por conta de cadeias hidrocarbônicas (comumente de cauda apolar) e uma região hidrofílica (grupamentos fosfatos, hidroxila, carbonila, amina, comumente denominados de cabeça polar) [11].

Os lipídios de membrana podem ser separados em quatro tipos: Os fosfolipídios, os glicolipídios, os lipídios éter de arqueias e os esteroides [19].

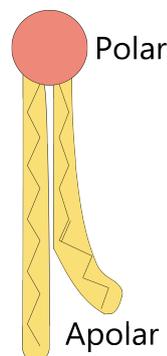


Figura 1.1: Estrutura geral de um fosfolipídio com sua cabeça polar (grupamento fosfato e glicerol) e caudas apolares (cadeias de ácidos graxos).

Os lipídios possuem uma característica anfifílica. Portanto em meio aquoso, formam agregados lipídicos na forma de micelas, bicamadas ou vesículas dependendo do seu formato (secção transversa da cabeça polar e da cauda apolar). Por exemplo, fosfolipídios

que tem um formato cônico, se organizam em micelas, enquanto fosfolipídios que tem o formato cilíndrico se organizam em bicamadas [20]. O efeito hidrofóbico explica a formação destes aglomerados lipídicos na forma de membranas.

Na água líquida, pontes de hidrogênio são constantemente formadas e quebradas. Devido as muitas possibilidades de arranjos, a rede de pontes de hidrogênio é estabilizada por entropia, e quando fosfolipídios são dispersos em meio aquoso, não formam as pontes de hidrogênio com a água mas desfazem o arranjo. Com isso as moléculas de água ao redor das cadeias apolares do fosfolipídios tornam-se altamente ordenadas e organizadas ocasionando, uma redução da entropia e da estabilidade do sistema. Para reduzir o contato com o meio aquoso e conseqüentemente o impacto sobre a organização da água, as moléculas de fosfolipídios se agregam. Desta maneira, a entropia do sistema volta a aumentar. Nos aglomerados de moléculas lipídicas, somente as porções lipídicas das extremidades do aglomerado forçam o ordenamento das moléculas de água. Menos moléculas de água são ordenadas o que levam ao aumento da entropia.

### 1.1.1 Fosfolipídeos

As três principais classes de lipídios encontrados em membranas são os glicerofosfolipídios, que correspondem a 40 a 60 mol% do conteúdo total de lipídios, esfingofosfolipídios com 10 a 20 mol% e colesterol, representando 30 a 40 mol%

Os glicerofosfolipídios (também chamados fosfoglicerídeos) possuem como esqueleto estrutural a molécula do glicerol ( $C_3H_8O_3$ ) ao qual dois ácidos graxos são esterificados. Já os esfingolipídios possui uma cadeia de ácido graxo ligado a uma molécula de esfingosina ( $C_{18}H_{37}NO_2$ ) como estrutura principal. A Figura 1.3 apresenta um diagrama simples das estruturas dos fosfolipídios. As cabeças polares dos fosfolipídios são ligados a um grupo fosfato  $PO_4$  [19].

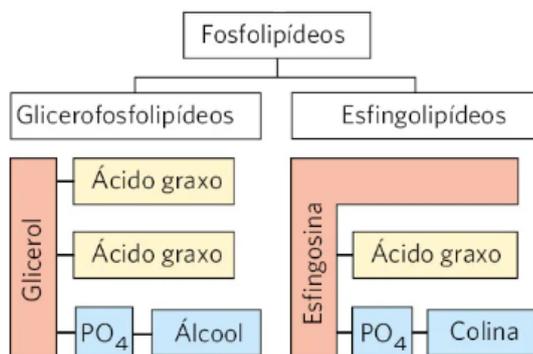


Figura 1.2: **Estruturas de fosfolipídios** - Os fosfolipídios possuem glicerol ou esfingosina como esqueleto (em vermelho), ligados aos grupos alquila, as cadeias de ácido graxos (em amarelo) e uma cabeça polar (em azul).

Fonte: Adaptado de D. L. Nelson (2022) [19].

Os glicofosfolipídeos tem as duas cadeias de ácidos graxos ligados por uma ligação éster ao primeiro e segundo carbono do glicerol e no terceiro carbono há uma ligação fosfodiéster a um agrupamento polar.

Quando ocorre uma ligação de fosfocolina ( $C_{42}H_{82}NO_8P$ ) no glicerofosfolipídio, forma-se a fosfatidilcolina, uma molécula que auxilia em diversos processos que são necessários

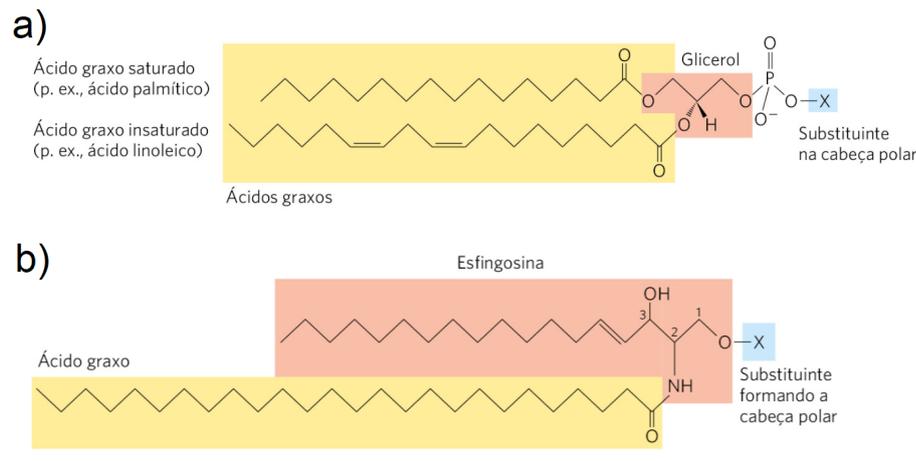


Figura 1.3: a) Estrutura usual de um glicerofosfolípido. b) estrutura de um esfingolípido.

Fonte: Adaptado de D. L. Nelson (2022) [19].

para manutenção do organismo e ajuda a manter a integridade das membranas.

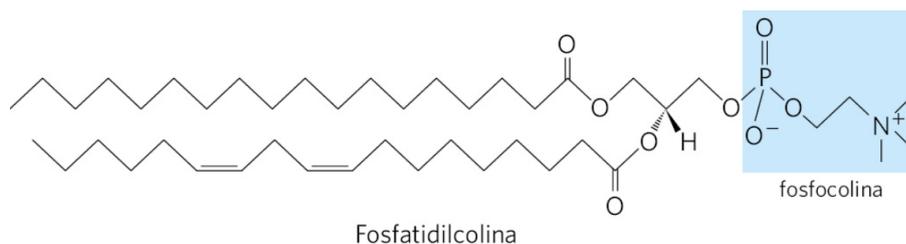


Figura 1.4: Uma molécula de fosfatidilcolina.

Fonte: Adaptado de D. L. Nelson (2022) [19].

Um exemplo de fosfatidilcolina bastante utilizado nas pesquisas como modelo biomimético de membrana, é o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC).

## 1.1.2 Lipossomas

Nos meados dos anos 1980, o biofísico Alec Bangham, de Instituto Brabham em Cambridge, conseguiu observar estruturas de membranas ao adicionar água em fosfolípidos secos, que possuíam uma semelhança com as membranas celulares. Tais estruturas foram nomeadas inicialmente de "Banghasomas", posteriormente outras denominações foram concebidas para estas estruturas: Vesículas fosfolipídicas, lipossomas e nanopartículas lipídicas. O termo mais utilizado atualmente é lipossomas, e é um modelo biomimético da membrana celular muito utilizado no estudo da interação de moléculas com a bicamada lipídica [21].

Os lipossomas são vesículas compostas por uma ou mais bicamada lipídica concêntricas criadas a partir de fosfolípidos. Possuindo características anfipáticas (regiões hidrofóbicas e hidrofílicas), alta biocompatibilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade. Os lipossomas são utilizados como sistema de entrega de fármacos (DDS) [11]. Extensivamente utilizadas na indústria cosmética, farmacéutica e alimentícia, como carregadores

de moléculas com propriedades físico-químicas diversas (proteínas, RNA, DNA, moléculas lipossolúveis, etc) [11]. Durante a pandemia do COVID-19, houve uma necessidade urgente da criação de uma vacina anti-COVID-19, a vacina de mRNA da Pfizer, utiliza de mRNA encapsulado em lipossomas [22].

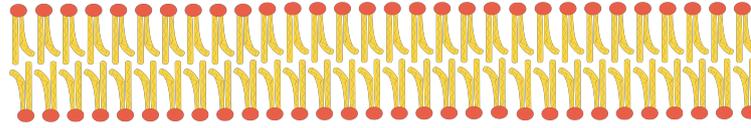


Figura 1.5: Bicamada lipídica.

Na pesquisa científica por outro lado, os lipossomas são empregados como sistemas biomiméticos no estudo de transporte de moléculas através da membrana.

Devido a característica anfipática dos lipossomos em meio aquoso, sofrem uma influencia entropica para que ocorra um confisco focado de suas seções hidrofóbicas em bicamadas esféricas, de tal forma que este estado seja energeticamente e termodinamicamente favorável, se distribuindo assimetricamente nas duas camadas e em constante movimento ao longo do próprio eixo (rotacional) e lateralmente ao longo da extensão da camada [11].

Os lipossomos podem ser classificados em duas categorias quanto ao número de bicamadas (lamelas): vesículas multilamelar (MLV - multilamelar vesicles) e vesículas unilamelar.

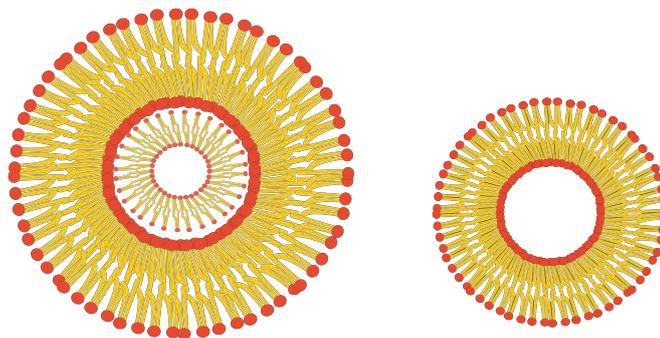


Figura 1.6: Vesícula multilamelar e vesícula unilamelar respectivamente.

As vesículas multilamelares são relativamente grandes ( $1-5 \mu\text{m}$ ), uma vez que possuem um maior número de lamelas. Por outro lado, dependendo do método de preparação, as vesículas unilamelares são classificadas em vesículas gigantes (GUV - giant unilamelar vesicles, maiores que  $1 \mu\text{m}$ ), grandes (LUV - large unilamelar vesicles, de  $100-250 \text{ nm}$ ) e pequenas (SUV - small unilamelar vesicles, de  $20-100 \text{ nm}$ ).

Em geral, todos os métodos de preparação de lipossomas possuem 3 fases:

- Secagem dos lipídios do solvente orgânico

- Dispersão dos lípidios em meio aquoso
- Purificação dos lipossomos

Dependendo do método de preparação pode se obter LUVs ou SUVs, e entre os vários métodos, destacam-se: a dispersão por solvente, o método de remoção de detergente e a dispersão mecânica. [11]

Nos métodos de dispersão por solvente, os fosfolípidos são inicialmente dissolvidos em solvente orgânico (metanol ou uma história de éter e metanol) e em seguida são lentamente adicionados a uma solução aquosa, levando então a uma organização dos fosfolípidos em vesículas. Nos métodos de remoção de detergente, ocorre a remoção das moléculas de detergente das micelas.

Quando ocorre a hidratação dos lípidios a seco, partes do filme lipídico se desprende, e, por conta do efeito hidrofóbico, naturalmente se formam lipossomos MLVs, mas por meio das diferentes técnicas, é possível obter-se LUVs ou SUVs.

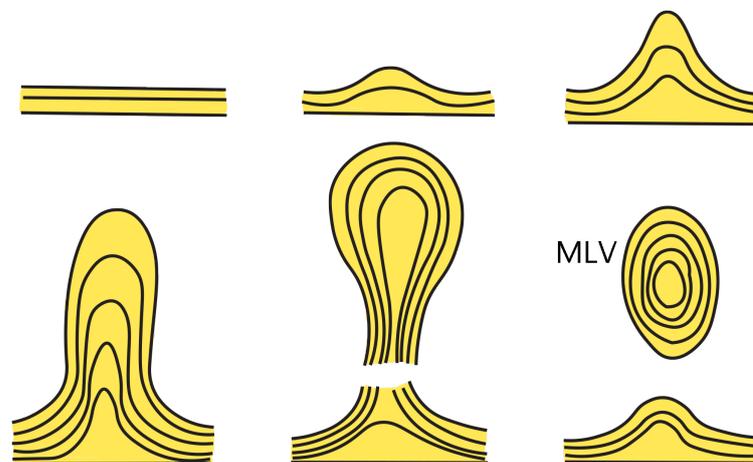


Figura 1.7: Formação natural de MLV durante o processo de hidratação do filme seco.

Fonte: Adaptado de Infarma (1999) [23].

Para os métodos de dispersão mecânico podem envolver processos de sonicação, pressão e extrusão. Na sonicação, utiliza-se de MLVs obtidos pela hidratação, demonstrada na Figura 1.7, em um processo de ultra-som, enquanto para o método de pressão e extrusão, a solução de MLVs são forçadas a atravessar uma membrana de policarbonato, que acaba retirando as diversas camadas formando LUVs ou SUVs com menores tamanhos.

## 1.2 Fluidez de membrana

A membrana pode ter propriedades diferentes quanto a sua fluidez, uma propriedade determinada pelo movimento (rotacional e lateral) relativo dos fosfolípeos. Em células, a fluidez de membrana é essencial para diversas funções celulares. De modo que há diversos processos patológicos associados a alterações na fluidez de membrana [24–28]. Como citado, alterações na fluidez está associada processos patológicos, pois é pela membrana em que ocorrem os processos de captação e excreção de massa, por meio de transportes passivos e ativos em membranas celulares.

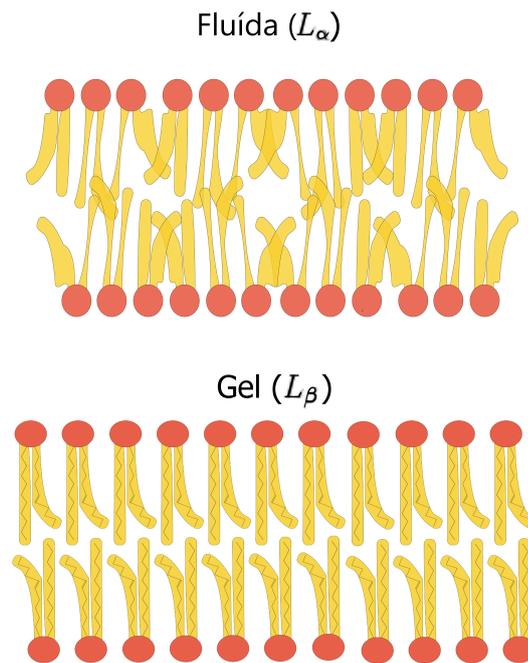


Figura 1.8: Estado gel ( $L_\beta$ ) e estado líquido-cristalino ( $L_\alpha$ ) de uma bicamada lipídica.

As membranas fosfolípídicas podem apresentar um estado gel ( $L_\beta$ ) com baixa fluidez, um estado líquido-cristalino ( $L_\alpha$ ) com uma alta fluidez, e um estado intermediário chamado de líquido-ordenado ( $L_o$ ) [29].

A fluidez de membrana é controlada por diversos fatores físicos e químicos. Alguns destes fatores são: a temperatura, a composição em ácidos graxos (cadeias apolares dos fosfolípídios), e concentração de colesterol.

Com um aumento da temperatura, o sistema acaba ganhando energia, aumentando a entropia, isto é, o nível de desorganização do sistema, e as cadeias de ácidos graxos acabam reduzindo a ordem (empacotamento) dos fosfolípídios e favorecendo o estado fluido desordenado, aumentando assim a fluidez da membrana. A composição lipídica, a fluidez irá depender do grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos (quanto maior a insaturação, maior a fluidez) e do comprimento das cadeias (menor comprimento entre as cadeias resulta em uma menor interação entre as cadeias de ácidos graxos, ocasionando um aumento na fluidez).

Por fim, o colesterol quando adicionado a fase  $L_\alpha$  ou  $L_\beta$  gera a uma nova fase denominada líquida ordenada que possui características intermediárias entre  $L_\alpha$  e  $L_\beta$ . Em resumo, o colesterol é um tamponador de fluidez: Membranas muito fluídas, colesterol diminuem a fluidez. Em membranas com fluidez reduzida, o colesterol aumenta a fluidez

(efeito condensador). O efeito condensador do colesterol em membranas biológicas é importante pois, reduz a mobilidade e área de seção transversa dos fosfolípidios e aumenta a espessura da bicamada lipídica. Este último efeito torna a membrana mais rígida e resistente e reduz a permeabilidade da bicamada lipídica.

### 1.2.1 Ácido 2-hidroxi-oléico

O ácido 2-hidroxi-oléico (2OHOA - ácido 2-hidroxi-9-cis-octadecenoico), também conhecido como Minerval®, é uma derivação sintética do ácido oléico com um grupamento hidroxila no carbono  $\alpha$  [6]. Em comparação ao ácido oléico, apresenta um metabolismo mais lento, uma meia-vida mais longa e, portanto um efeito farmacológico mais duradouro.

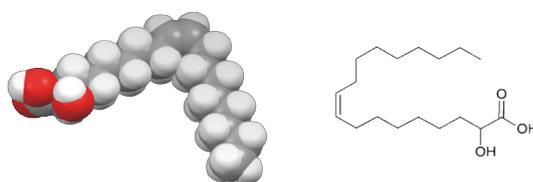


Figura 1.9: Estrutura molecular do ácido 2OHOA.

Fonte: Adaptado de Ibarguren (2017) [6].

Devido a sua natureza hidrofóbica o principal alvo do 2OHOA é a membrana celular, onde pode ser encontrado na forma livre ou esterificado aos fosfolípidios de membrana [4], alterando a organização e composição lipídica da membrana e possuindo alto potencial anti-carcinogênico, sendo ativo contra uma variedade de cânceres como o glioma, leucemia e câncer de mama [2–4, 30]. Influenciando indiretamente a translocação e a atividade de proteínas de membrana envolvidas e entre as várias ações do 2OHOA tem-se a interrupção do ciclo celular, a diferenciação celular, apoptose e autofagia das células cancerígenas.

Alguns dos efeitos descritos do 2OHOA, ocorrem devido a sua interação com *rafts* lipídicos de membrana, importantes plataformas de sinalização celular, ricas em esfingomielina e colesterol, que recrutam proteínas de membrana. As proteínas recrutadas ocasionam a proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular. A esfingomielina ao interagir com colesterol e glicerofosfolípidios leva a formação e manutenção de *rafts* lipídicos. Em geral, células cancerígenas possuem níveis baixos de esfingomielina e altos níveis de fosfatidiletanolamina quando comparados às células normais, sugerindo que a transformação maligna requer a ativação de certas oncoproteínas e a modificação da estrutura dos *rafts* lipídicos, com consequente recrutamento de proteínas de membrana envolvidas na transformação maligna, invasão e metástase [5]. Indiretamente, o 2OHOA afeta a organização dos *rafts* lipídico, através do aumento da atividade da esfingomielina sintase 1 (SMS1) e na restauração dos níveis de esfingomielina das células cancerígenas, sem que afete o perfil lipídico da membrana de células normais [4, 5].

Especificamente, o glioblastoma multiforme (GBM), é um tipo de câncer com alta taxa de mortalidade e alto poder infiltrativo sendo atualmente ainda considerado incurável. Uma de suas características, se dá pela rigidez da membrana da célula cancerígena, criando uma resistência à quimioterapia. O 2OHOA surge como uma alternativa promissora como coadjuvante com tratamentos quimioterápicos, pois possui efeito redutivo de

fluidez da membrana.

O 2OHOA está atualmente sendo testado em dois testes clínicos com pacientes diagnosticados com GBM: Um estudo em fase I, para determinar a segurança e a tolerância ao 2OHOA e um segundo em fase IIB, para demonstrar a eficácia do 2OHOA contra o GBM, avaliar a segurança, o mecanismo de ação, biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico do GBM [31].

# Espectroscopia de Impedância

---

O objetivo geral deste capítulo é fundamentar os conhecimentos acerca da impedância elétrica e da técnica EIE. De forma específica, discutindo a respeito de conceitos para o desenvolvimento matemático. Posteriormente, a espectroscopia será tratada em detalhes, apresentando um desenvolvimento histórico da técnica de espectroscopia de impedância, discutindo o uso dessa técnica experimental no estudo de propriedades iônicas e moleculares de materiais e suas possíveis correlações com circuitos elétricos.

## 2.1 Breve História da Espectroscopia de Impedância

Em 1872, o matemático e engenheiro elétrico Oliver Heaviside, criou a fundação para a espectroscopia de impedância, com a publicação de diversos artigos na revista *The Electrician* [32, 33]. Com o seu trabalho de aplicação das transformadas de Laplace a circuitos elétricos, Heaviside não só criou a fundação, como também de fato cunhou os termos indutância, capacitância e impedância. Seus trabalhos foram compilados em forma de um livro em 1894, onde, neste mesmo ano, o físico Walther Nernst publicou na Revista de Eletroquímica alemã, o artigo “Método para determinar constantes dielétricas”, sendo a primeira aplicação da impedância em sistemas físicos, ao utilizar a ponte de Wheatstone para medir e determinar constantes dielétricas de diferentes fluídos [34]. Esta aplicação feita por Nernst, permitiu que outros pesquisadores, utilizassem este modelo para analisar a resistência e as constantes dielétricas de células galvânicas e outros fluídos eletrolíticos.

Em 1899 e 1901, o físico alemão Emil Warburg, desenvolveu expressões para a resposta de impedância associada as leis de difusão e também introduziu os circuitos elétricos como análogos para sistemas eletrolíticos, no qual a resistência e a capacitância surgem como funções da frequência [34].

Na década de 20 do século XX, R. E. Remington aplicou a técnica para medidas citológicas de vegetais, e Hugo Fricke e Sterne Morse desenvolveram diversos experimentos medindo resistência e capacitância do sangue. Portanto, a partir do século XX, a técnica EIE começou a ser utilizada não só para sistemas puramente eletroquímicos, mas também para sistemas biológicos, de maneira que foi possível observar a capacitância em função da frequência em membranas celulares [34].

O desenvolvimento da técnica foi cada vez mais a fundo, uma vez que com o desenvolvimento tecnológico e teórico do século XX, permitiu que diversos novos experimentos e equipamentos fossem feitos.

## 2.2 Números Complexos e Equações Diferenciais

Os números complexos e as equações diferenciais possui grande aplicação nas teorias físicas da atualidade. Para o estudo de impedância, é de extrema importância entender estes conceitos, uma vez que a análise da impedância está ligada a estes.

### 2.2.1 Números Complexos

É de conhecimento comum os números reais, principalmente os números inteiros, uma vez que estes são menos complicados de se compreender e se observar. Tomando como um exemplo uma soma simples de  $2+2$ , é possível contar nos dedos. Entretanto, os números reais não nos fornecem soluções para todas as equações, em especial às de segundo grau, dando a necessidade de um novo conjunto numérico.

Dada a seguinte equação de segundo grau:

$$x^2 + 1 = 0. \quad (2.1)$$

Sabe-se que é possível subtrair um mesmo número, e tirar a raiz quadrado de ambos os lados da equação, sem perder a igualdade, assim:

$$x = \pm\sqrt{-1}. \quad (2.2)$$

A equação (1.2) não tem uma solução real, uma vez que não há nenhum número que elevado ao quadrado, resulta em  $-1$ . Assim, é definido a seguinte notação:

$$i = \sqrt{-1}$$

em que  $i$  é chamado de unidade imaginário. A equação (1.2) tem o seguinte conjunto como solução:

$$S = \{-i, i\},$$

Com isto, é possível resolver qualquer equação de segundo grau, em termos de números reais e complexos.

Os números complexos surgem como um conjunto formado em parte real e por uma parte imaginária, isto é:

$$z = a + ib, \quad (2.3)$$

com  $a$  e  $b$  sendo reais e  $i$  imaginário. O termo  $a$  é chamado de parte real da solução, enquanto  $ib$  parte imaginária.

### Equação de Euler e o Plano de Argand-Gauss

A equação de Euler estabelece uma relação fundamental entre as funções trigonométricas e as funções exponenciais complexas:

$$e^{i\theta} = \cos(\theta) + i \operatorname{sen}(\theta). \quad (2.4)$$

Esta equação é essencial para a análise complexa, pois a equação (2.4) pode ser observada geometricamente como uma maneira de unir duas representações da mesma unidade complexa, em um plano complexo.

Ainda, a equação de Moivre nos fornece uma nova forma de representar um número complexo, relacionando as coordenadas cartesianas e polares:

$$z^n = r^n(\cos(n\theta) + i \operatorname{sen}(n\theta)). \quad (2.5)$$

Desta forma, é possível utilizar o plano de Argand-Gauss (também chamado de plano complexo), representado pela equação (2.3).

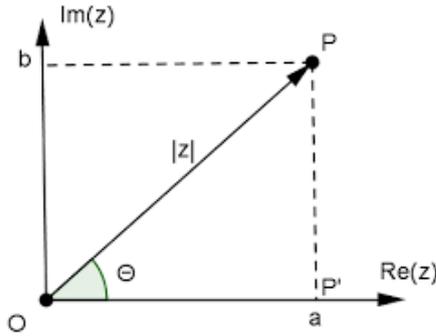


Figura 2.1: Plano de Argand-Gauss.

Fonte: Retirado de J. C. A. dos Santos (2014) [35].

O plano de Argand-Gauss, utiliza das coordenadas cartesianas para representar um número complexo, de tal forma que o eixo das ordenadas representa a parte imaginária e o eixo das abscissas a parte real.

## 2.2.2 Equações diferenciais

A matemática possui diversas ferramentas para modelar matematicamente fenômenos naturais, sendo as equações diferenciais um dos mais importantes exemplos. Além da Física, as equações diferenciais são utilizadas em outras áreas tais como a Biologia e a Sociologia. Na Física, as equações diferenciais se apresentam como uma ferramenta indispensável para o tratamento teórico e experimental dos fenômenos [36]. Assim, se faz necessário um breve entendimento a respeito destas.

As equações diferenciais, são equações na qual a incógnita é uma função que aparece sob a forma de derivada. Isto é:

$$\frac{dy}{dx} = f(x, y).$$

Um dos exemplos mais notáveis, é a segunda lei de Newton  $F = ma$ , que pode ser representada em sua forma diferencial como:

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = f(t, x, \dot{x}),$$

com  $\dot{x}$  representando a derivada primeira da posição  $x$  em relação ao tempo  $t$ .

As equações diferenciais podem ser classificadas como sendo equações ordinárias ou parciais, linear ou não-linear, homogênea e não-homogêneas.

## 2.3 Circuitos

### 2.3.1 Elementos passivos de um circuito

Elementos passivos de um circuito são elementos que não geram corrente ou um potencial elétrico, interagindo somente de maneira passiva com a corrente [37]. Assim, três elementos passivos que serão mostrados aqui são: resistor, capacitor e indutor.

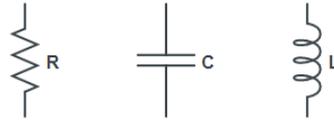


Figura 2.2: Símbolos dos elementos passivos utilizados no diagrama de circuitos.

Os resistores são elementos que dificultam a passagem da corrente elétrica pelo circuito. Também podem ser utilizados para transformação da energia elétrica em energia térmica por meio do efeito Joule. Usando da lei de Ohm, é possível fazer uma relação entre a corrente ( $I$ ), a voltagem ( $V$ ) e a resistência elétrica ( $R$ ) de um resistor que é medido em Ohm ( $\Omega$ ). Segue-se que:

$$V = RI. \quad (2.6)$$

Os capacitores, geralmente feitos de materiais dielétricos, podem ser formados por duas placas separadas, apesar de existirem capacitores cilíndricos. Tem como função armazenar cargas elétricas, e a eficiência de armazenamento de cargas é chamado de capacitância, medido em Farad ( $F$ ), temos que a relação das cargas com a capacitância é:

$$C = \frac{Q}{V}. \quad (2.7)$$

Por fim, os indutores armazenam a energia na forma de campo magnético formada por uma corrente alternada e é bastante utilizado para impedir variações de corrente elétrica. A indutância de um indutor é medido em Henry ( $H$ ).

Estes elementos passivos são muito utilizados em diferentes tipos de circuitos elétricos, e são essenciais para o estudo de impedância elétrica.

### 2.3.2 Circuitos Elétricos de Corrente Alternada

A corrente alternada possui seu sentido variando em relação ao tempo, e sua voltagem pode ser facilmente amplificada ou reduzida por meio de transformadores. [37] Em geral, as grandezas oscilam com uma mesma frequência, isso faz com que seja vantajoso aplicar notações complexas, em que a dependência temporal pode ser expressada por meio de  $e^{i\omega t}$ , em que  $\omega$  é a frequência angular definida por  $\omega = 2\pi f$ , sendo  $f$  a frequência expressa em Hz. Assim, para obter qualquer grandeza complexa em relação ao tempo, basta somente multiplicar por  $i\omega$ . Iremos utilizar as seguintes notações complexas [37]:

$$V(t) = \text{Re}[\hat{V}(t)], \quad (2.8)$$

$$\hat{V}(t) = \bar{V}e^{i\omega t}, \quad (2.9)$$

$$\bar{V} = V_m e^{i\phi}, \quad (2.10)$$

com  $\bar{V}$  sendo a amplitude complexa de  $\hat{V}$  e  $\phi$  a fase de  $\bar{V}$ . Assim, aplicando as equações (2.9) e (2.10) em (2.8), pode-se escrever que:

$$\begin{aligned} V(t) &= \text{Re}[\hat{V}] = \text{Re}[\bar{V}e^{i\omega t}] = \text{Re}[V_m e^{i(\omega t + \phi)}], \\ V(t) &= V_m \cos(\omega t + \phi). \end{aligned} \quad (2.11)$$

Com  $V_m = |\bar{V}|$  sendo o valor máximo de  $V(t)$ . Pode-se replicar isto para a corrente  $I(t)$  e para a força eletromotriz (FEM)  $\varepsilon(t)$ . Isto é:

$$I(t) = \text{Re}[\hat{I}(t)] = \text{Re}[\bar{I}e^{i\phi t}], \quad (2.12)$$

$$\varepsilon(t) = \text{Re}[\hat{\varepsilon}(t)] = \text{Re}[\bar{\varepsilon}e^{i\phi t}]. \quad (2.13)$$

É necessário ainda compreender a reatância, para compreendermos a impedância. A reatância é a oposição de indutores e capacitores à variação da corrente e tensão elétrica em circuitos alternados. Os dois tipos de reatâncias: a reatância indutiva e a reatância capacitiva, que, somando-se ao fator de resistência elétrica, resulta na impedância: a capacidade de um circuito, ou uma amostra, se opor a passagem de uma corrente elétrica. Assim, o cálculo da impedância elétrica está diretamente ligado ao cálculo das reatâncias.

### 2.3.3 Reatância para um circuito puramente indutivo

Pode-se considerar o circuito na Figura 2.3, como um tipo de circuito puramente indutivo.

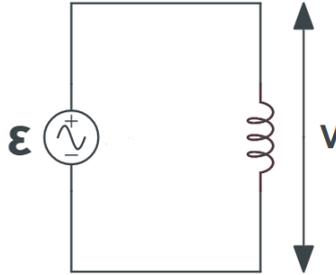


Figura 2.3: Circuito puramente indutivo.

Começando pela aplicação de uma das leis de Kirchoff no circuito, isto é, a soma de todas as quedas de tensão na malha é igual a zero, obtêm-se que:

$$\begin{aligned} -\varepsilon + L \frac{dI}{dt} &= 0, \\ L \frac{dI}{dt} &= \varepsilon, \end{aligned} \quad (2.14)$$

É possível aplicar a notação complexa de (1.10) na equação (1.12):

$$L \frac{d\hat{I}}{dt} = \hat{\varepsilon} = L \frac{d}{dt} [\bar{I}e^{i\omega t}] = [\bar{\varepsilon}e^{i\omega t}] = i\omega L \bar{I}e^{i\omega t}. \quad (2.15)$$

Considerando para um caso estacionário, é possível obter uma solução estacionária do tipo:

$$\bar{\varepsilon} = i\omega L\bar{I} = \omega L e^{i\frac{\pi}{2}}\bar{I}. \quad (2.16)$$

Tomando somente a parte real de  $\bar{\varepsilon} = \varepsilon_m$ , então:

$$\varepsilon = \text{Re}[\varepsilon_m e^{i\omega t}] = \varepsilon_m \cos(\omega t). \quad (2.17)$$

Então, a corrente ficará:

$$I(t) = \text{Re}[\bar{I}e^{i\omega t}] = \text{Re}\left[\frac{\varepsilon_m}{\omega L} e^{i(\omega t - \frac{\pi}{2})}\right]. \quad (2.18)$$

Como  $L\frac{dI}{dt}$  também é a queda de tensão  $V$  através do indutor, com  $V = \text{Re}[\bar{V}e^{i\omega t}]$ , tem-se assim então que:

$$V(t) = \text{Re}[\bar{V}e^{i\omega t}] = \omega L e^{i\frac{\pi}{2}}\bar{I}. \quad (2.19)$$

Por meio da lei de Ohm:  $V = RI$  ou  $\bar{V} = R\bar{I}$ , podemos fazer a razão  $\frac{\bar{V}}{\bar{I}}$ :

$$\frac{\bar{V}}{\bar{I}} = \omega L e^{i\frac{\pi}{2}}, \quad (2.20)$$

isso demonstra que a corrente em um indutor está com a fase atrasada por um fator de  $\frac{\pi}{2}$  em relação a voltagem. Em um plano complexo, é possível observar que os fasores  $\hat{V}$  e  $\hat{I}$  giram no sentido anti-horário, com uma frequência angular  $\omega$ , mantendo-se sempre perpendiculares entre si por conta do fator  $\frac{\pi}{2}$ , diz-se que estão em quadratura.

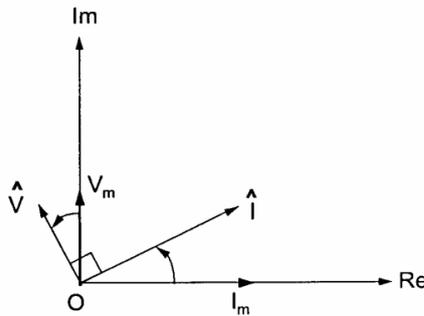


Figura 2.4: Representação complexa de  $\hat{V}$  e  $\hat{I}$  para um indutor.

Fonte: Adaptado de H. N. Moysés (1997) [37].

Como visto pela lei de Ohm, a razão entre a tensão e a corrente se obtém a resistência. Desta forma, determinamos a oposição da passagem da corrente. Se fizermos a razão pelos valores máximos, resulta no que se é chamado de reatância indutiva ( $X_L$ ) de um indutor:

$$\frac{V_m}{I_m} = \omega L = X_L, \quad (2.21)$$

se  $\omega$  for a zero, a reatância também vai a zero, portanto tem-se uma corrente contínua em que o indutor estaria se comportando como um curto-circuito. Se for ao infinito, as reações rápidas seriam bloqueadas.

### 2.3.4 Reatância para um circuito puramente capacitivo

Analogamente ao circuito puramente indutivo, um circuito puramente capacitivo pode ser descrito como um circuito com um fonte alternada e um capacitor, como mostrado na Figura 2.5.

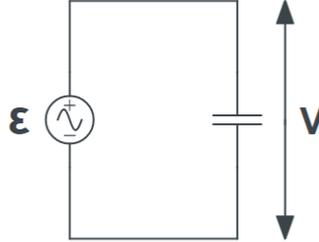


Figura 2.5: Circuito puramente capacitivo.

É possível novamente aplicar a lei das malhas de Kirchoff neste modelo de circuito, assim como as notações complexas vistas anteriormente. Então:

$$-\varepsilon + \frac{Q}{C} = 0 \rightarrow Q = CV, \quad (2.22)$$

$$I = \frac{dQ}{dt} = C \frac{dV}{dt}, \quad (2.23)$$

$$\hat{I} = \bar{I} e^{i\omega t} = i\omega C \bar{V} e^{i\omega t}, \quad (2.24)$$

isso resulta em:

$$\bar{I} = i\omega C \bar{V}, \quad (2.25)$$

$$\bar{V} = -\frac{i}{\omega C} \bar{I} = \frac{1}{\omega C} e^{-i\frac{\pi}{2}} \bar{I}. \quad (2.26)$$

Novamente, por meio de um plano complexo na Figura 2.6, é observável que a corrente está fora de fase, com a corrente em um capacitor adiantado por um fator de  $\frac{\pi}{2}$  em relação a voltagem. Ainda, o fasor  $\hat{V}$  está atrasado por  $\frac{\pi}{2}$  em relação ao fasor  $\hat{I}$ , portanto, também estão em quadratura e girando com frequência angular  $\omega$ .

Fazendo a razão entre a voltagem máxima e a corrente máxima, é possível obter a reatância capacitiva ( $X_C$ ) de um capacitor:

$$\frac{V_m}{I_m} = \frac{1}{\omega C} = X_C, \quad (2.27)$$

se  $\omega$  for a zero,  $X_C$  vai a infinito, assim, o capacitor vai se comportar como um circuito aberto, com as placas estando isoladas uma da outra. Por outro lado, quando  $\omega$  for a infinito,  $X_C$  vai a zero significando que as variações rápidas são transmitidas.

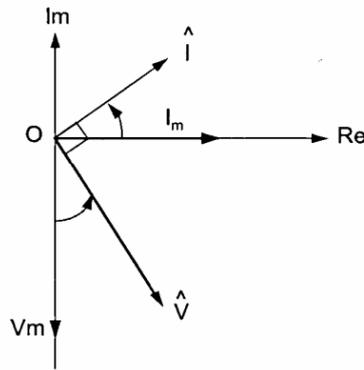


Figura 2.6: Representação complexa de  $\hat{V}$  e  $\hat{I}$  para um capacitor.

Fonte: Adaptado de H. N. Moysés (1997) [37].

## 2.4 Impedância em circuitos RC e RL

É possível agora definir a impedância elétrica em circuitos simples, do tipo RC (Resistor e capacitor ligados em série) e RL (resistor e indutor ligados em série). É necessário abordarmos, inicialmente, esse tipo de circuito simples, para facilitar a análise posterior de circuitos complexos. Nos circuitos RC e RL, surgem agora um termo resistivo  $R$ . Mas o desenvolvimento matemático ainda é análogo a seção anterior. Basta utilizar da lei das malhas de Kirchoff e das notações complexas.

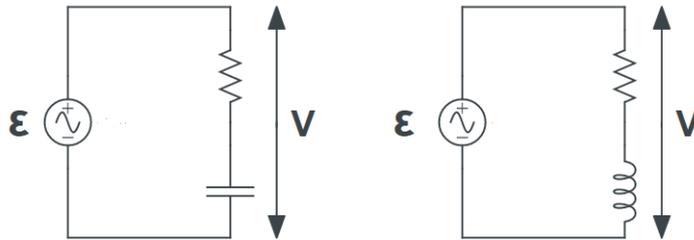


Figura 2.7: Circuito RC e circuito RL respectivamente.

É possível definir ainda, que todos os elementos resistivos surgem dentro de um mesmo termo  $Z$  ou  $\bar{Z}$ , que é a impedância elétrica. Dentro deste termo, é possível destringir a resistência elétrica e as reatâncias capacitiva e indutiva, e então, fazer uma generalização complexa da lei de Ohm:

$$\hat{V} = \bar{Z}\hat{I},$$

$$\bar{V} = \bar{Z}\bar{I}.$$

Para o circuito RL, obtêm-se que  $\bar{Z}$  e  $Z$  serão respectivamente:

$$\bar{Z} = |\bar{Z}|e^{i\omega L} = Ze^{i\varphi_L}, \quad (2.28)$$

$$Z = |\bar{Z}| = \sqrt{R^2 + X_L^2} = \sqrt{R^2 + (\omega L)^2}. \quad (2.29)$$

Em  $\bar{Z}$  sua parte real é a resistência  $R$  e a parte imaginária é a reatância indutiva  $X_L = \omega L$ .

Em um plano complexo temos:

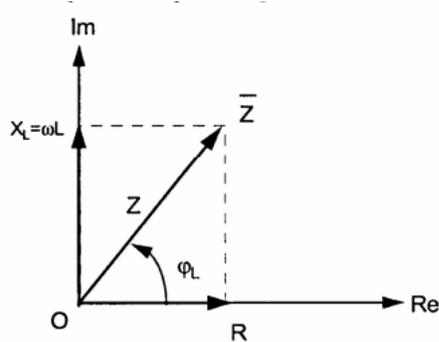


Figura 2.8: Impedância complexa do circuito RL.

Fonte: Adaptado de H. N. Moysés (1997) [37].

com  $Z$  sendo a impedância do par RL.

A amplitude máxima da corrente  $I_m$  fica atrasada em relação à da voltagem por um fator de:

$$\varphi_L = \tan^{-1} \left( \frac{\omega L}{R} \right),$$

note que se  $R \rightarrow 0$ , o atraso da corrente se dá por um fator  $\frac{\pi}{2}$  como visto anteriormente na equação (1.18).

Para um circuito RC:

$$Z = \sqrt{R^2 + X_C^2} = \sqrt{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}}. \quad (2.30)$$

Como é possível observar, a fase da corrente está adiantada em relação a voltagem por um fator

$$\varphi_C = \tan^{-1} \left( \frac{1}{\omega R C} \right),$$

em que, se  $R \rightarrow 0$ , então a diferença de fase da corrente, também se dará por um fator de  $\frac{\pi}{2}$ , e como anteriormente, se resumindo a um circuito puramente capacitivo.

Decorrente da lei de Kirchoff, tem-se que as impedâncias se somarão em série ou em paralelo.

Os circuitos elétricos podem ser utilizados como equivalentes matemáticos de uma resposta eletroquímica medido por meio de uma espectroscopia de impedância como será mostrado posteriormente [34].

## 2.5 Espectroscopia de Impedância

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), é uma técnica de caracterização elétrica, que permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um grande número de processos intercorrelacionados ocorrem em taxas diferentes, e que tem como objetivo fornecer uma visão ampla, se não completa, de um sistema eletrodosolução [38].

Em geral, a técnica consiste em utilizar de uma corrente alternada (AC) em eletrodos para que se gere um campo elétrico na amostra, mas correntes contínuas (DC) também podem ser utilizadas [39]. Um típico eletrodo, que serve como porta amostra para líquidos é o da Figura 2.9, onde geralmente se tem um anel de guarda para evitar efeito de borda do campo elétrico.

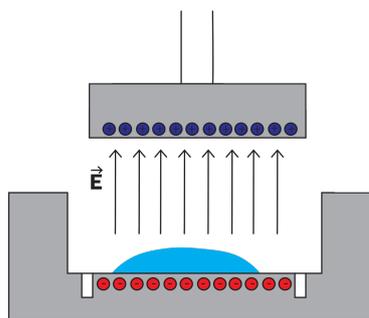


Figura 2.9: Porta amostra padrão com os dois eletrodos gerando o campo elétrico.

É possível fazer medidas de impedância em função da frequência, do tempo e da corrente, permitindo obter um espectro geral das propriedades elétricas do material de estudo.

Possuindo alta sensibilidade, a técnica é muito utilizada para o estudo de reações eletroquímicas e biológicas. Estudos prévios nos quais a técnica já foi empregada em células endoteliais bovina para avaliar a citotoxicidade da água, mostrou-se uma técnica poderosa para a avaliação de diversas propriedades celulares e toxicidade de diversas fontes de água de maneira rápida e efetiva [40].

A técnica permite ainda uma análise gráfica com separação específica da parte real e da parte imaginária da impedância separadas. Outro tipo de gráfico muito utilizado é o diagrama de Nyquist, onde é feito o gráfico da parte real e a parte imaginária juntas. Um exemplo de diagrama de Nyquist é o mostrado na Figura 2.10.

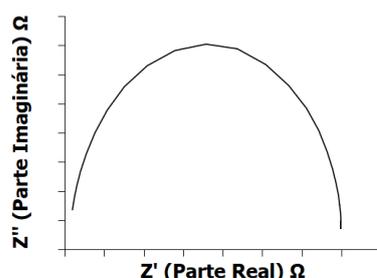


Figura 2.10: Exemplo de diagrama de Nyquist.

Há algumas críticas e desvantagens em relação a técnica. Por ser uma técnica de alta sensibilidade, o ambiente ao redor pode acabar influenciando nas medidas, portanto é

necessário manter o ambiente controlado. Ainda, em relação a análise, é necessário de simulações teóricas na análise de dados para complementar o modelo experimental [41]. Sabendo das propriedades caracterizadas por meio da espectroscopia, é possível simular modelos de circuitos com o auxílio de softwares, variando os valores dos elementos passivos.

De ampla aplicação, a técnica vem sendo cada vez mais utilizada nas pesquisas. De 1960 até 2006, o número de artigos publicados utilizando a técnica dobrou a cada 5 anos, como é possível observar na Figura 2.11.

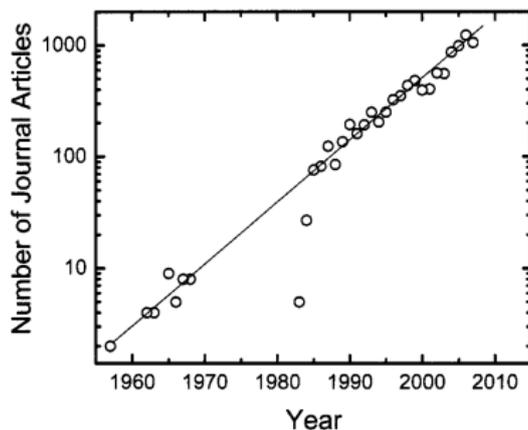


Figura 2.11: Número de artigos publicados sobre espectroscopia de impedância.

Fonte: Retirado de Orazem E., Mark (2008) [34].

### 2.5.1 Eléttodos e circuitos equivalente

Apesar de não haver uma interação química que afete a amostra ao realizar a EIE, é importante ressaltar que ainda há fatores que podem influenciar diretamente nos dados obtidos pela técnica.

O eléttodo, aonde a amostra será depositada, precisa possuir características elétricas compatíveis com a técnica, devido a isso, o material do qual o eléttodo é feito, pode ocasionar flutuações nos dados. Uma mesma amostra, ao ser utilizada em dois eléttodos diferentes pode oferecer diferentes dados nas mesmas condições.

Nos gráficos apresentados na Figura 2.12 é observável essa diferença em dois eléttodos de composição diferentes: um de latão, e outro de aço inox.

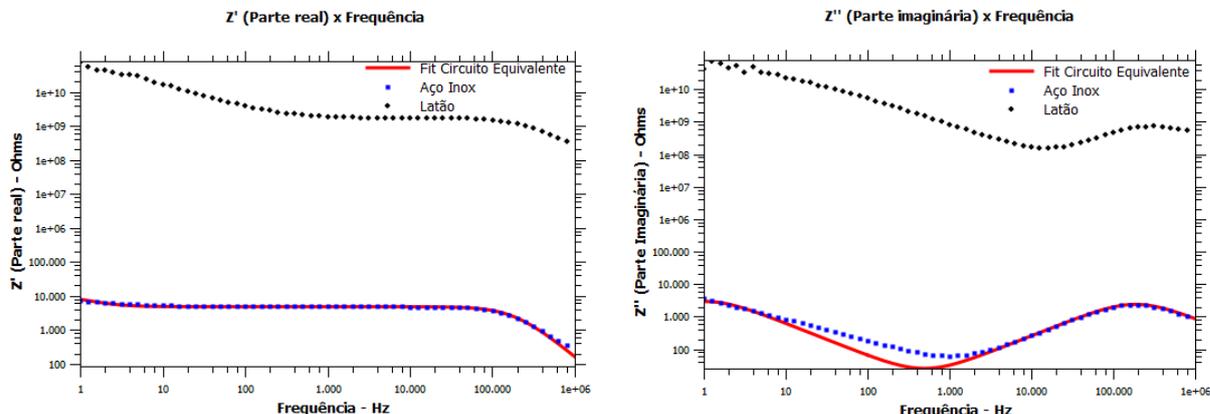


Figura 2.12: Comparação da água Milli-Q em dois eléttodos de materiais diferentes.

Outra característica importante do EIE, são os circuitos equivalentes, por meio de *softwares*, é possível criar e simular o espectro de impedância de um circuito que simula o comportamento da amostra. Os circuitos equivalentes podem fornecer perspectivas importantes sobre a amostra além de valores simulados para os elementos dos circuito e também para as reações que ocorrem no mesmo.

Tomando como exemplo as membranas neuronais, são diversas as reações químicas que ocorrem na membrana, seja para o fluxo de massa entre os meios, para a geração de potenciais elétricos ou as reações que ocorrem entre a interface membrana e o meio extracelular.

Estas membranas já possuem circuitos equivalentes reportados na literatura. Onde os elementos de circuitos são capazes de simular esses diversos processos e é possível fazer uma analogia dos processos e os componentes da membrana, com os de um circuito. Fazendo uma simulação da força eletromotriz gerada por um canal de íon, potássio, cloro ou sódio, além da própria membrana ser representada como resistores [42].

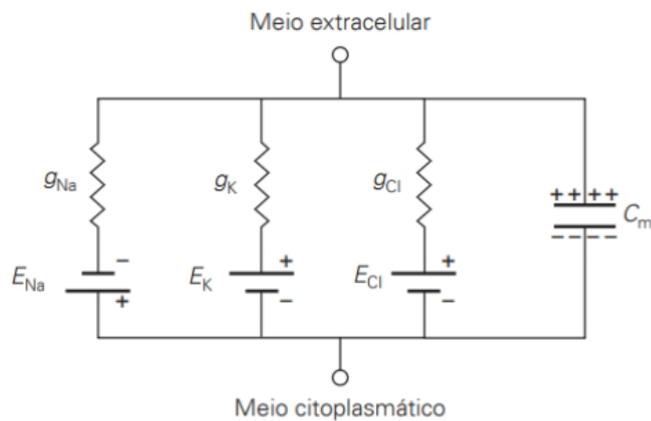


Figura 2.13: Circuito equivalente de uma membrana neuronal.

Fonte: Retirado de E. Kandel (2014) [42].

# Técnicas, Procedimentos Experimentais e Amostras Investigadas

---

## 3.1 Preparação de tampão e soluções estoque

### Solução tampão

As soluções tampões foram preparadas com diferentes sais como indicadas pela Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Componentes utilizados, com os pesos e as concentrações molares, para a produção de uma solução tampão fosfato.

Componente	Peso	Concentração
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	0,0204 g	2,956 mM
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	0,0944 g	7,044 mM

Aferiu-se a massa dos sais, para se obter o tampão fosfato com uma concentração final de 10M em pH aproximado de 7,4, em 50mL de água deionizada. Mediu-se então o pH da solução e foram feitos os ajustes necessários com HCl e NaOH para se obter pH 7,4.

As soluções tampões foram utilizadas para hidratação dos filmes lipídicos e para diluição do mesmo.

### Preparação de LUVs

LUVs (large unilamellar vesicles) com diâmetro de aproximadamente 100 nm foram formadas por extrusão (Brunaldi et al, 2007). Pesou-se cerca de 10,3mg de POPC (de peso molecular de 760 g·mol) que foi então solubilizado em clorofórmio, seguido de rota evaporação do solvente, formando-se um filme lipídico uniforme por meio da deposição do POPC, que foi então colocado numa câmara de vácuo para secagem por 2h. Esta etapa descrita, é a da secagem dos lípidios do solvente orgânico mencionados na seção 1.1.2.

Para a dispersão dos lípidios em meio aquoso, utilizou-se de 5mL de solução tampão com pH 7,4, preenchendo também com gás nitrogênio para evitar o processo de oxidação. Manteve-se a hidratação por cerca de 24h, em temperatura ambiente, onde naturalmente ocorre a formação dos MLVs, como mostrado na Figura 1.7.

Foi montado o mini extrusor (Avanti Polar Lipids) de acordo com a Figura 3.1 e conectado duas seringas de vidro da Avanti, na qual a suspensão de fosfolipídio foi então submetido ao processo de extrusão, efetuando 12 ciclos na membrana de policarbonato de 100 $\mu$ m, resultando em 5mL de solução de LUVs com uma concentração de 2,71 mM.

O mini extrusor, o balão, e o cachimbo de vidro foram lavados três vezes utilizando água deionizada e álcool 99% e secados em estufa, antes e depois do processo para evitar contaminação externa, e sempre com o auxílio de luvas.

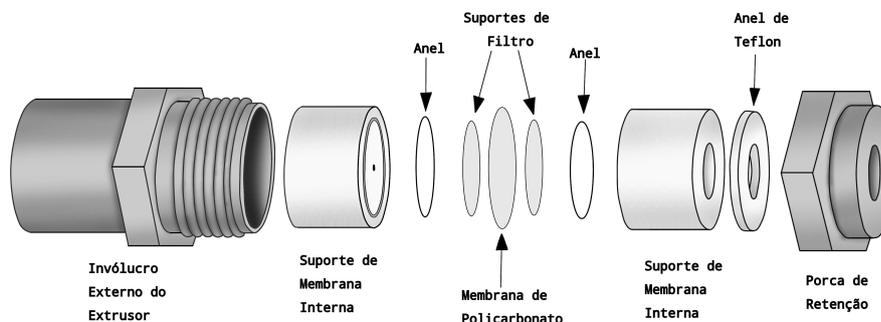


Figura 3.1: Montagem esquemática do mini extrusor da Avanti Polar Lipids.

Fonte: Adaptado do Manual da Avanti Polar Lipids.

### Preparação do estoque do ácido 2OHOA

A solução estoque do ácido 2OHOA foi preparada por meio da adição de NaOH 2M e 0,3M e 2OHOA em água Milli-Q, de acordo com a tabela 3.2, completando com 0,5mL de água Milli-Q, obtendo uma solução estoque de ácido a 56mM.

Componente químico	Peso/Volume
2OHOA	0,0402 g
NaOH (0,3M)	1,74 mL
NaOH (2M)	0,1 mL

Tabela 3.2: Reagentes utilizados para a formulação de uma solução estoque de ácido 2OHOA a 56mM.

A solução estoque do ácido se manteve com uma coloração branca, sendo necessário o processo de banho em ultrassom e/ou aquecimento para uma solubilização completa (Se tornando uma solução com um aspecto claro e translúcido), sendo necessário repetir o processo de aquecimento e banho em ultrassom em toda etapa de utilização do ácido em lipossomas.

## 3.2 Medidas de Espectroscopia de Impedância

A medição de impedância, ocorre por meio de uma ponte de impedância Solartron SI 1260 Impedance/Gain-phase analyzer da Figura 3.2 que foi então conectado a dois elétrodos por meio de um setup com um parafuso milimétrico, como esquematizado na Figura 3.3

Para padronizar as medidas de impedância, foi utilizado dois conjuntos de elétrodos, um de latão e um de aco-inoxidável para avaliar as interações entre os eletrodos e uma amostra de água Milli-Q. Foi utilizado água Milli-Q do Laboratório de Apoio Ao Grupo

de Estudos Fototérmicos do departamento de Física. A água foi depositada no centro do eletrodo utilizando uma seringa de 1mL. A distância entre os eletrodos de latão foi ajustado para 0,500 mm com um parafuso micrométrico para evitar a formação de bolsões de ar entre a amostra e o eletrodo.



Figura 3.2: Solartron SI 1260 Impedance/Gain-phase analyze da empresa Ametek Scientific Instruments.

Fonte: Ametek Scientific Instruments.

Com o *software* Zplot, foi possível colocar as condições de varredura da frequência de 1 Hz até 1 MHz, com uma amplitude de tensão alternada de 50 mV. Inicialmente foram efetuadas 5 medidas de impedância, com um tempo de repouso de 5 minutos entre cada medida.

Posteriormente, 10 medidas com 10 minutos de descanso entre cada varredura de frequência com a amplitude AC de 50 mV no eletrodo de latão. O mesmo procedimento foi efetuado utilizando um porta-amostras com eletrodos de aço inoxidável.

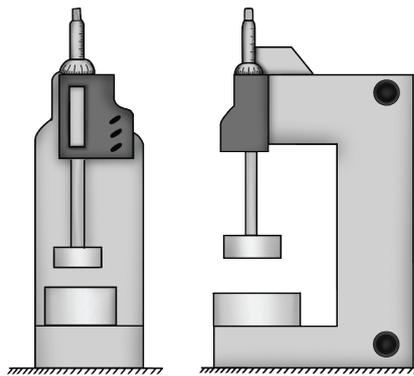


Figura 3.3: Montagem experimental para a medição da impedância.

Os dados foram coletados utilizando o *software* Zview, e as médias das medidas e todos os dados coletados foram analisados por meio de um *software* gráfico gratuito QtiPlot.

As amostras líquidas de tampão e LUV foram utilizadas a temperatura ambiente, a aproximadamente 23°C, medido com termômetro. Cerca de 1mL da amostra foi depositado no porta amostra seguindo os procedimento descritos anteriormente, de maneira que

preenchesse o centro todo do elétrodo. Utilizando os mesmos parâmetros: 0,5 mm de distância entre os elétrodos, 50mV de amplitude AC, 10 medidas consecutivas com 10 minutos de descanso entre cada medida, com uma varredura de frequência de 1 Hz a 1 MHz.

### **Medidas com a solução tampão, LUVs e 2OHOA**

Quatro amostras foram formuladas para as medidas: A solução tampão fosfato, as LUV, o tampão com a adição do ácido 2OHOA e as LUV com o 2OHOA.

Após 1 hora da formulação da solução tampão descrito na seção 3.1, as medidas de impedância foram efetuadas. Assim como, após 1 hora a extrusão das LUV, o mesmo processo de medição foi efetuado.

Foi adicionado  $1\mu\text{L}$  de solução estoque de ácido 2OHOA (56 mM) em 1mL de solução de LUV (2,71 mM) e em 1mL de tampão fosfato (10M), deixando incubar por 1 hora antes de ser submetido as medidas de impedância.

# Resultados e Discussões

Dez medidas de espectroscopia de impedância efetuadas na solução tampão fosfato com o intuito de fazer a caracterização elétrica da solução antes de adicionar a LUV e o 2OHOA, estão representadas na Figura 4.1, assim como o ajuste e a média das medidas.

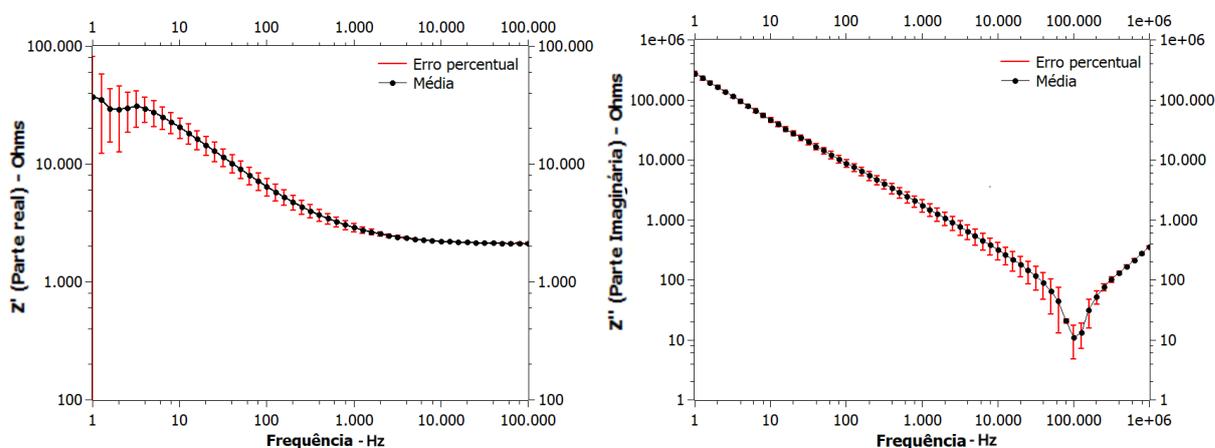


Figura 4.1: Espectro de impedância elétrica da amostra de solução tampão fosfato. A curva preta corresponde ao ajuste obtido com um circuito elétrico (Figura 4.2) e os pontos azuis ao valor médio das 10 medidas. O erro percentual médio foi de 5%.

São muito os fatores que podem contribuir para a qualidade do sinal elétrico. A dispersão das medidas na região de baixa frequência da amostra de tampão pode ser devido a instabilidade iônica da solução fosfato. O ajuste, feito com um circuito equivalente exibido na Figura 4.2 serve para auxiliar na visualização das propriedades elétricas da amostra. A medida que ocorre um aumento da frequência, o tampão se torna mais condutivo e apresenta um vale característico nas proximidades de 100kHz.

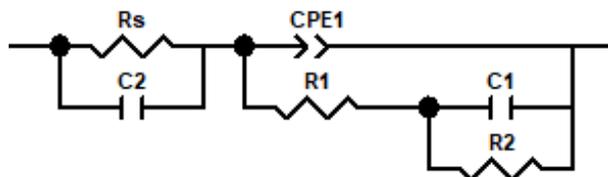


Figura 4.2: Circuito equivalente da solução tampão. Em que  $R_s$ ,  $R_1$  e  $R_2$  são resistores,  $C_2$  e  $C_1$  são capacitores e  $CPE1$  é um elemento de fase constante, atuando como um capacitor imperfeito.

A primeira malha do circuito, RC em paralelo, pode ser descrito como equivalente da água utilizada na solução. Na segunda malha, com R-RC em paralelo com um CPE,

Tabela 4.1: Elementos utilizados e seus respectivos valores para o ajuste da solução tampão.

Elemento	$R_S$	CPE1-T	CPE1-P	$R_1$	$R_2$	$C_1$	$C_2$
Valor	$2,75 \cdot 10^3$	$8,93 \cdot 10^7$	$7,79 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{13}$	$3,26 \cdot 10^3$	$2,27 \cdot 10^{-7}$	$-1,16 \cdot 10^{-11}$

descreve os fosfatos utilizados na solução. Ainda, a tabela 4.1 apresenta os valores encontrados para o ajuste.

O espectro da solução tampão apresentado na Figura 4.1, nos é importante pois as LUVs foram preparadas com essa solução, de forma que temos uma proporção de 1:96,5 de POPC para fosfato.

O mesmo procedimento, efetuado para a solução com LUV, e para a solução com o 2OHOA, resultou nos gráficos da Figura 4.3

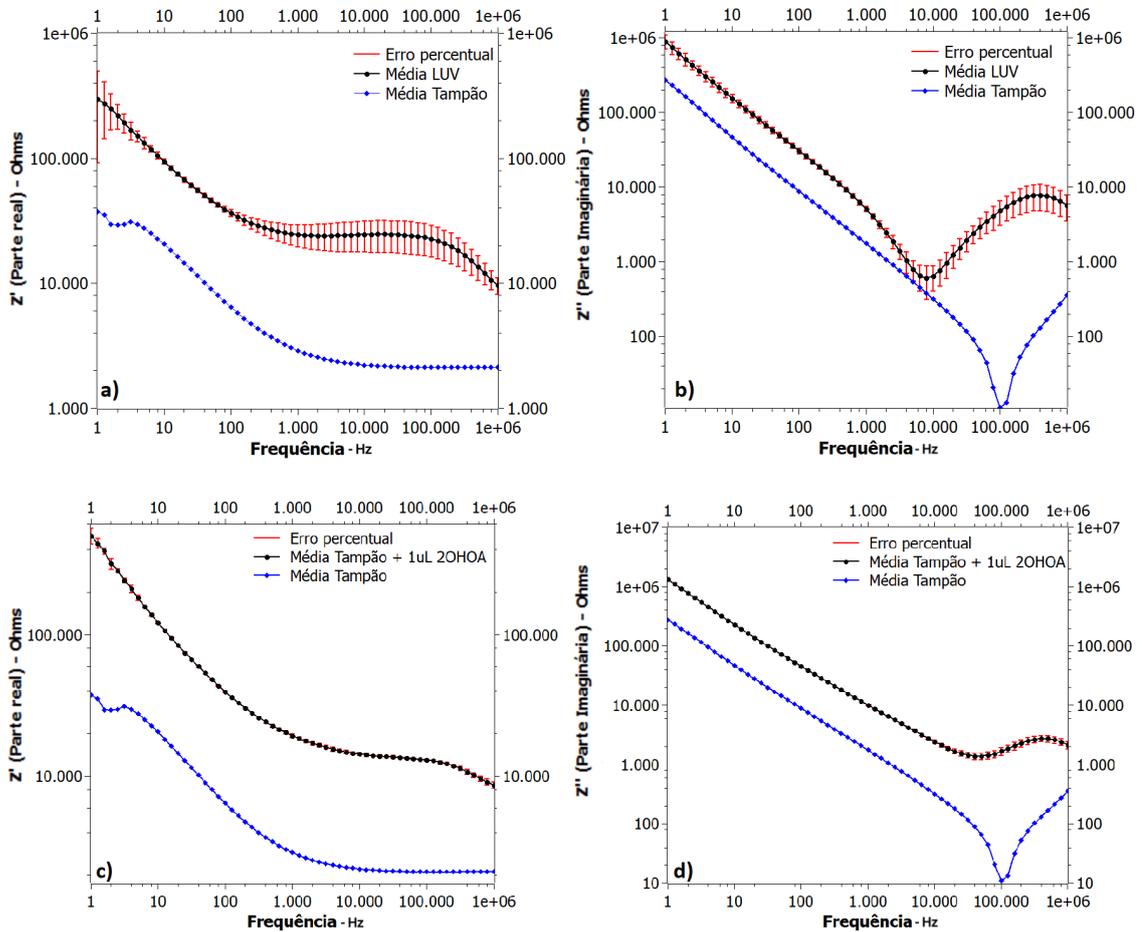


Figura 4.3: Espectro de impedância elétrica da amostra de solução tampão com LUV e do tampão com o ácido 2OHOA. Em a) e b) tem-se a parte real e a parte imaginária da da solução tampão com a LUV com concentração de 2,71mM e em c) e d) do tampão com a adição do ácido 2OHOA com concentração de 56mM.

As dez medidas da solução de LUVs, possuem um descasamento inicial, que nas medidas subsequentes manteve-se estável, gerando assim um erro percentual grande quando comparado ao tampão só e do tampão com ácido. Ainda que a solução de LUV possua muito menos POPC, que fosfato na solução, é perceptível que as LUVs fornecem

resultados bem diferentes que a solução tampão sozinha. A solução se tornou menos condutiva, de maneira que, em 1Hz, a resistividade foi de aproximadamente 50 k $\Omega$  para 297 k $\Omega$ , mas também houve aumento nas reatâncias, fornecendo um aumento geral da impedância elétrica. Como as LUVs são membranas feitas de fosfolípidios puros (sem canais iônicos), é natural que ocorra um aumento da impedância elétrica, pois as LUVs neste caso agem como isolante. Além disto, o circuito elétrico equivalente apresentado anteriormente (Figura 4.2) já não consegue fornecer um ajuste tão bom da solução tampão com os lipossomas.

Da mesma maneira, o ácido 2OHOA também resultou numa diminuição da condutividade da solução tampão, entretanto, a estabilidade apresentada por essa amostra foi muito maior para toda a faixa de frequência, em contraste com os dados vistos anteriormente. O comportamento apresentado, de um aumento geral da impedância, pode ocorrer com a organização do ácido 2OHOA em bicamadas associado ao pH [43].

Entretanto, as LUVs incubadas com o ácido 2OHOA apresentam um comportamento diferente.

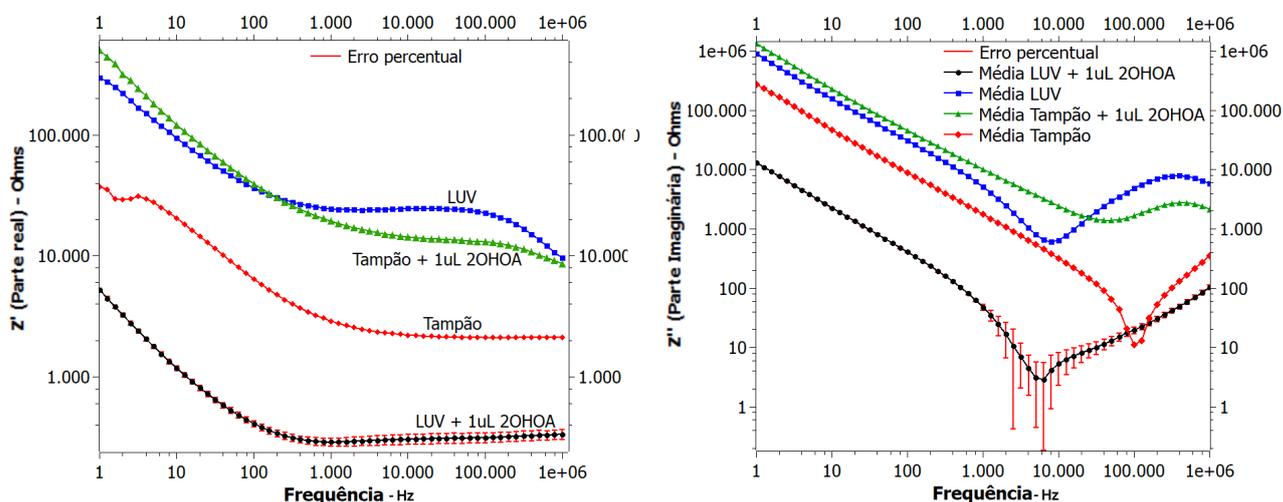


Figura 4.4: Espectro de impedância elétrica da amostra da LUV com ácido 2OHOA incubado por 1h, em comparação com as medidas anteriores. Com um erro percentual associado a esta medida foi de 11%.

Como visto anteriormente, a LUV e o ácido em solução tampão fosfato, diminuíram a condutividade da solução tampão, apresentando comportamento mais resistivos. Já as LUVs incubadas com o ácido 2OHOA, apresentou um aumento na condutividade.

Esta redução da impedância pode estar associado ao aumento da condutividade da membrana, por meio da forma ionizada do ácido 2OHOA, que possui a capacidade de transpor íons H<sup>+</sup> por conta do grupamento carboxila, e quando na membrana, o ácido possui pKa de aproximadamente 7,6 e, portanto no pH de 7,4, tem-se aproximadamente 50% do 2OHOA ionizada, e a aplicação de uma corrente elétrica nesta forma ionizada, favorece o movimento do mesmo [44].

De maneira geral, é provável que o comportamento mais condutivo das LUVs incorporada com o ácido seja por efeito do 2OHOA na membrana, assim, é possível avaliar características da interação do ácido com a membrana por meio da técnica EIE. Ainda, não foi possível encontrar um circuito equivalente para as LUVs, com e sem a adição do ácido e para o tampão com o ácido. Entretanto, o comportamento geral apresentado por todas as medidas foram parecidos, com patamares na parte real entre 1kHz a 100kHz

e vales na parte imaginária, com deslocamento pra esquerda do vale apresentando pela solução tampão.

# Conclusões

---

Neste trabalho foi feita uma revisão dos preceitos e princípios fundamentais mais básicos relacionado a técnica de espectroscopia de impedância. Foi visto que a impedância elétrica depende não só da resistência, mas também das reatâncias associadas aos elementos passivos de um circuito. Posteriormente, uma apresentação curta sobre bioquímica e biofísica de membranas foi apresentado, demonstrando algumas das características inerentes das membranas fosfolipídicas, que são essenciais para a formulação dos lipossomas, demonstrando também a sua grande importância como modelo biomimético de membrana e de carregador de fármaco. Nossas investigações evidenciam que a membrana fosfolipídica interage com o ácido 2OHOA, sendo a técnica de espectroscopia de impedância versátil e possuindo boa sensibilidade para a aplicação.

Espectros de impedância obtidas das amostras (solução tampão, LUV, tampão fosfato com a adição de 2OHOA e LUV com a adição de 2OHOA) possibilitou ver o comportamento das propriedades eletroquímicas com uma variação de frequência. As soluções com ácido apresentaram comportamentos diversos. Primeiramente, o tampão com o ácido 2OHOA, mostrou que a impedância elétrica aumentou quando comparado com a solução tampão, o que pode ser um indicativo de formação de bicamadas em pH neutro, por sua vez, os lipossomas com o ácido apresentou um comportamento divergente do lipossoma e do ácido sozinho, com uma grande diminuição da impedância, isto é, um aumento na condutividade elétrica, o que pode indicar o ácido 2OHOA ionizado na membrana lipídica, favorecendo um fluxo de íons  $H^+$ , assim, com a técnica de espectroscopia de impedância é possível observar um interação eletroquímica da membrana com a droga.

Tem-se como perspectiva futura, obter novas medidas, aliado a outras técnicas para uma caracterização mais completa deste efeito eletroquímico do ácido na membrana lipídica, com a utilização de lipossomas e com células de GBM, da linha celular T98G. O ácido 2OHOA já está em estudo clínico na fase 2, sendo testado em humanos, entender a interação entre a membrana e a droga, fornecendo uma melhor visão do tratamento e da relação da droga com a fisiologia humana.

# Referências Bibliográficas

---

- [1] A. L. Riley and S. Kohut, “Drug toxicity,” *Encyclopedia of Psychopharmacology*, p. 441, 2010.
- [2] P. Fernández-García, C. A. Rosselló, R. Rodríguez-Lorca, R. Beteta-Göbel, J. Fernández-Díaz, V. Lladó, X. Busquets, and P. V. Escribá, “The opposing contribution of sms1 and sms2 to glioma progression and their value in the therapeutic response to 2ohoa.,” *Cancers*, vol. 11, no. 88, 2019.
- [3] M. L. Martin, G. Liebisch, S. Lehneis, G. Schmitz, M. Alonso-Sande, J. Bestard-Escalas, D. H. Lopez, J. M. García-Verdugo, M. Soriano-Navarro, X. Busquets, P. V. Escribá, and G. Barceló-Coblijn, “Sustained activation of sphingomyelin synthase by 2-hydroxyoleic acid induces sphingolipidosis in tumor cells.,” *Journal of Lipid Research*, vol. 54, pp. 1457–1465, 2013.
- [4] S. Terés, V. Lladó, M. Higuera, G. Barceló-Coblijn, L. Martin, M. A. Noguera-Salvà, A. Marcilla-Etxenike, J. M. García-Verdugo, M. Soriano-Navarro, C. Saus, U. Gómez-Pinedo, X. Busquets, and P. V. Escribá, “Normalization of sphingomyelin levels by 2-hydroxyoleic acid induces autophagic cell death of sf767 cancer cells. autophagy,” *Autophagy*, vol. 8, no. 10, pp. 1542–1544, 2012.
- [5] G. Barceló-Coblijn, M. L. Martin, R. F. M. de Almeida, M. A. Noguera-Salvà, A. Marcilla-Etxenike, F. Guardiola-Serrano, A. Lüth, B. Kleuser, J. E. Halver, and P. V. Escribá, “Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (sms) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 8, no. 49, pp. 19569–19574, 2011.
- [6] M. Ibarguren, P. Fernández-García, L. Arbona, X. Busquets, and P. V. Escribá, “2-hydroxyoleic acid,” *Encyclopedia of Cancer*, pp. 2173–2175, 2017.
- [7] P. J. Robinson, J. Noronha, J. J. DeGeorge, L. M. Freed, T. Nariai, and S. I. Rapoport, “A quantitative method for measuring regional in vivo fatty- acid incorporation into and turnover within brain phospholipids: review and critical analysis.,” *Brain Research*, vol. 17, no. 3, pp. 187–214, 1992.
- [8] A. Omri, Z. E. Suntres, and P. N. Shek, “Enhanced activity of liposomal polymyxin b against pseudomonas aeruginosa in a rat model of lung infection,” *Biochem Pharmacol*, vol. 64, no. 9, pp. 1407–1413, 2010.
- [9] R. M. Schiffers, S. G. and I. A. Bakker-Woudenberg, “Host factors influencing the preferential localization of sterically stabilized liposomes in klebsiella pneumoniae-infected rat lung tissue,” *Pharm Res*, vol. 18, no. 6, pp. 780–787, 2001.

- [10] P. Stano, S. Bufali, C. Pisano, F. Bucci, M. Barbarino, M. Santaniello, P. Carminati, and P. L. Luisi, “Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method,” *Journal of Liposome Research*, vol. 14, pp. 87–109, 2004.
- [11] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, and et al., “Liposome: classification, preparation, and applications,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 8, no. 102, 2013.
- [12] G. K. Radda and J. Varnderkooi, “Can fluorescent probes tell us anything about membranes?,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, vol. 265, no. 4, pp. 509–549, 1972.
- [13] L. L. F. Lima, A. A. L. Vieira, H. Mukai, C. M. G. Andrade, and P. R. G. Fernandes, “Electric impedance of aqueous kcl and nacl solutions: Salt concentration dependence on components of the equivalent electric circuit.,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 241, pp. 530–539, 2017.
- [14] H. Mazzer, L. Cardozo-Filho, and P. R. F. Garcia, “Broadband dielectric spectroscopy of protic ethylammonium-based ionic liquids synthesized with different anions,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 269, pp. 556–563, 2018.
- [15] T. M. Cassol, A. R. Duarte, C. S. Ribas, and P. R. G. Fernandes, “Dielectric characterization of new task ionic liquids with carboxyl groups by means of impedance spectroscopy from 10mhz to 10mhz,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 332, p. 115804, 2021.
- [16] R. Ornaqui de Oliveira, *Investigação da impedância elétrica da mistura KL/DeOH/água com o uso de circuitos elétricos equivalentes*. Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso.
- [17] R. Curi and J. Procopio, *Fisiologia Básica*. Guanabara Koogan, 2017.
- [18] M. de Mello Aires, *Fisiologia*. Guanabara Koogan, 2012.
- [19] D. L. Nelson, M. M. Cox, and A. A. Hoskins, *Princípios da Bioquímica de Lehninger*. Grupo A, 2022.
- [20] G. Boenny Strapasson, *Síntese e caracterização de lipossomas termossensíveis com potencial para atuar como Drug Delivery System*. Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso.
- [21] D. W. Deamer, “From “banghasomes” to liposomes: A memoir of alec bangham, 1921–2010,” *FASEB*, vol. 24, pp. 1308–1310, 2010.
- [22] G. Gregoriadis, “Liposomes and mrna: Two technologies together create a covid-19 vaccine,” *Med Drug Discov.*, vol. 12, p. 100104, 2021.
- [23] E. G. Pierri and M. P. D. Gremião, “Métodos de preparação de lipossomas,” *INFARMA - Informativo Profissional do Conselho Federal de Farmácia*, vol. 11, no. 9, pp. 60–66, 1999.

- [24] J. Kroger, S. Jacobs, E. H. J. M. Jansen, A. Fristche, H. Boeing, and M. B. Schulze, “Erythrocyte membrane fatty acid fluidity and risk of type 2 diabetes in the epic-potsdam study,” *Diabetologia*, vol. 58, pp. 282–289, 2015.
- [25] B. Engelmann, S. Streicha, U. M. Schönthier, W. O. Richter, and J. Duhma, “Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipidemias. i. increased phosphatidylcholine and reduced sphingomyelin in patients with elevated levels of triacylglycerol-rich lipoproteins,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1165, no. 1, pp. 32–37, 1992.
- [26] Q. Hassan, S. Ahmadi, and K. Kerman, “Coexistence and survival in conservative lotka-volterra networks,” *Micromachines*, vol. 11, p. 590, June 2020.
- [27] N. I. Gerasimov, A. N. Goloschchapov, and E. B. Burlakova, “Investigation of changes in fluidity of brain membranes in mice bearing experimental alzheimer’s disease using spin labeling electron paramagnetic resonance,” *Biofizika*, vol. 58, no. 2, pp. 252–256, 2013.
- [28] M. Koter, I. Franiak, K. Strychalska, M. Broncel, and J. Chojnowska-Jeziarska, “Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia,” *Int J Biochem Cell Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 205–2015, 2004.
- [29] Y. Akamine Martins, *Fluidez e composição de membranas de hemácias de camundongos transgênicos para a apolipoproteína CIII*. Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2019. Dissertação de Mestrado.
- [30] F. B. Furnari, T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho, and W. K. Cavenee, “Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment.,” *Genes and Development*, vol. 21, pp. 2683–2710, 2007.
- [31] “A clinical phase iib trial with 2ohoa in patients with newly-diagnosed malignant glioma..” <https://cordis.europa.eu/project/id/755179>. Acessado: 07 de Março de 2023.
- [32] O. Heaviside *Electrical Papers*, vol. 1, 1894.
- [33] O. Heaviside *Electrical Papers*, vol. 2, 1894.
- [34] M. Orazem, E. and B. Tribollet, *Eletrochemical Impedance Spectroscopy*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2008.
- [35] J. C. A. dos Santos, *Números Complexos aplicados à Geometria*. Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, 2014. PROFMAT - Mestrado Profissional em Matemática em Rede Nacional.
- [36] C. A. E. Simões, *Equações Diferenciais na Física*. Departamento de Matemática, Universidade de Évora, 2014. Dissertação de Mestrado.
- [37] H. M. Nussenzveig, *Curso de Física Básica 3: Eletromagnetismo*. São Paulo: Edgard Blucher, 1997.

- [38] L. A. de Carvalho, A. R. de Andrade, and P. R. Bueno, "Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis," *Quim Nova*, vol. 29, 2006.
- [39] V. F. Lvovich, *Impedance Spectroscopy: Applications to Eletrochemical and Dielectric Phenomena*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons", 2012.
- [40] X. Zhang, A. Nurashikin Nordin, J. Tarbell, and I. Voiculescu, "Toxicity studies using mammalian cells and impedance spectroscopy," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 3, pp. 112–121, 2015.
- [41] G. Luka, A. Ahmadi, H. Najjaran, E. Alocilja, M. DeRosa, K. Wolthers, A. Malki, H. Aziz, A. Althani, and M. Hoorfar, "Microfluidics integrated biosensors: A leading technology towards lab-on-a-chip and sensing applications," *Sensors*, vol. 15, pp. 30011–30031, 2015.
- [42] E. Kandel and et al, *Principios da Neurociência*. Grupo A, 2014.
- [43] D. P. Cistola, J. A. Hamilton, D. Jackson, and D. M. Small, "Ionization and phase behavior of fatty acids in water: Application of the gibbs phase rule," *Biochemistry*, vol. 27, pp. 1881–1888, 1988.
- [44] K. Brunaldi, M. A. Miranda, F. Abdulkader, R. Curi, , and J. Procopio, "Fatty acid flip-flop and proton transport determined by short-circuit current in planar bilayers," *Journal of Lipid Research*, vol. 46, pp. 245–251, 2005.

# Operações com números complexos

---

Os números complexos possuem parte real e parte imaginária, então, uma definição geral destes conjunto é dado por:

$$z = a + bi, \quad (\text{A.1})$$

onde  $a$  e  $b$  são números reais, e  $a$  é chamado de parte real do número complexo. E  $bi$  é a parte imaginária.

O complexo conjugado representa uma reflexão no eixo das ordenadas (imaginária) de um plano complexo, e é definido por:

$$\bar{z} = a - bi. \quad (\text{A.2})$$

Assim, usando o número complexo definido acima, temos algumas propriedades relacionados aos números complexos e o complexo conjugado:

**Propriedade 1** - Um número complexo multiplicado por seu complexo conjugado, resulta no quadrado das partes reais:

$$z\bar{z} = a^2 + b^2. \quad (\text{A.3})$$

**Propriedade 2** - Se um número complexo é igual ao seu complexo conjugado,  $z = \bar{z}$ , então  $z$  é um número real:

$$\begin{aligned} z &= \bar{z}, \\ a + bi &= a - bi, \\ b &= -b. \end{aligned}$$

**Propriedade 3** - O conjugado da soma de dois números complexos é igual à soma dos conjugados desses números. Seja  $w$  um número complexo, tal que:  $w = c + di$

$$\begin{aligned} z + w &= \bar{z} + \bar{w}, \\ (a + bi) + (c + di) &= a - bi + c - di, \\ (a + c) + (bi + di) &= a + c - bi - ci, \\ a + c - bi - di &= a + c - bi - ci. \end{aligned}$$

**Propriedade 4** - O conjugado do produto entre dois números complexos é igual ao produto de seus conjugados.

$$\begin{aligned} z \cdot w &= \bar{z} \cdot \bar{w}, \\ (a + bi)(c + di) &= (a - bi)(c - di), \\ ac + adi + bic - bd &= ac - adi - bic - bd, \end{aligned}$$

$$(ac - bd) + (-adi - bic) = (ac - bd) + (-adi - bic).$$

**Propriedade 5** - O produto de um número complexo por seu complexo conjugado, é igual ao módulo do quadrado do número complexo.

$$z \cdot \bar{z} = |z|^2.$$

**propriedade 6** - O módulo de um número complexo é igual ao módulo de seu conjugado:

$$|z| = |\bar{z}|.$$

**Propriedade 7** - O módulo do produto de  $z$  e  $w$  é igual ao produto do módulo de  $z$  e  $w$

$$|z \cdot w| = |z| \cdot |w|.$$

Com essas propriedades, podemos efetuar as mais variadas operações básicas (soma, subtração, multiplicação e divisão) dos números complexos.

Outra propriedade importante, é a do número imaginário  $i$  e suas potências. Ao contrário de um número real (por excessão de  $-1$ , como veremos), um número imaginário elevado a  $n$ -ésima potência, se comporta de forma cíclica. Tomando como exemplo  $n = 3$ . Tem-se:

$$n = 0 \rightarrow i^0 = 1,$$

$$n = 1 \rightarrow i^1 = i,$$

$$n = 2 \rightarrow i^2 = \sqrt{-1^2} = -1,$$

$$n = 3 \rightarrow i^3 = i^2 \cdot i = -1 \cdot i = -i.$$

A partir de  $n = 4$ , os resultados voltam a se repetir de maneira cíclica:

$$n = 4 \rightarrow i^4 = i^2 \cdot i^2 = (-1) \cdot (-1) = 1.$$

# Cálculo da Impedância para um circuito RC e RL

Seja o circuito RC da figura 2.7, pela lei de Kirchoff, temos que:

$$V = RI + \frac{Q}{C} \rightarrow \hat{V} = R\hat{I} + \frac{\hat{Q}}{C}. \quad (\text{B.1})$$

Fazendo uma derivação em relação ao tempo  $t$ :

$$\begin{aligned} \frac{d\hat{V}}{dt} &= \frac{dR}{dt}\hat{I} + \frac{d}{dt}\frac{\hat{Q}}{C}, \\ i\omega\hat{V} &= R\frac{d\hat{I}}{dt} + \frac{1}{C}\frac{d\hat{Q}}{dt}. \end{aligned}$$

Como a variação de cargas em relação ao tempo é a corrente, então:

$$\begin{aligned} i\omega\hat{V} &= R\hat{I}i\omega + \frac{\hat{I}}{C} = i\omega\left(R + \frac{1}{i\omega C}\right)\hat{I}, \\ \hat{V} &= R\hat{I} + \frac{\hat{I}}{i\omega C} = \left(R + \frac{1}{i\omega C}\right)\hat{I}. \end{aligned}$$

Como a impedância é dado pela razão entre a tensão e a corrente:  $\frac{V}{I} = Z$ , então:

$$\begin{aligned} \frac{\hat{V}}{\hat{I}} &= \left(R + \frac{1}{i\omega C}\right), \\ \bar{Z} &= \left(R + \frac{1}{i\omega C}\right). \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

O termo  $(i\omega C)^{-1}$  pode ser interpretado como a reatância capacitiva:

$$X_C = \frac{1}{i\omega C}. \quad (\text{B.3})$$

Analogamente, para um circuito RL em série, a lei de Kirchoff resulta em:

$$V = RI + L\frac{dI}{dt}. \quad (\text{B.4})$$

Aplicando as notações complexas 2.11 e 2.12 na equação B.4, obtêm-se:

$$\hat{V} = \bar{V}e^{i\omega t} = (R + i\omega L)\bar{I}e^{i\omega t} = (R + i\omega L)\bar{I}. \quad (\text{B.5})$$

Como visto anteriormente em 2.29, basta fazer a razão entre a tensão e a corrente para encontrarmos a impedância do circuito RL. Pela equação acima, pode-se isolar a razão  $\frac{\bar{V}}{\bar{I}}$ :

$$\frac{\bar{V}}{\bar{I}} = \bar{Z} = R + i\omega L = R + iX_L. \quad (\text{B.6})$$

# Soluções de Equações Diferenciais Ordinárias

---

As equações diferenciais ordinárias (EDO), é uma equação que envolve uma incógnita e as derivadas desta incógnita, por exemplo:

$$\frac{dy}{dt} + y = 0. \quad (\text{C.1})$$

A equação (C.1) possui outras características inerentes. É uma equação de ordem 1 e linear. A ordem da equação se dá pela ordem da derivada mais alta da equação, enquanto a linearidade é por conta de não existir produto envolvendo  $y$  [16].

Além disto, uma equação diferencial podem ser homogêneas ou não-homogêneas, onde, para ser homogênea, precisa satisfazer o seguinte:

$$y(xt) = xy(t). \quad (\text{C.2})$$

Com  $x \neq 0$

## C.1 Separação de variáveis

Uma das maneiras de encontrar a solução para as EDOs, é por meio do método de separação de variáveis. Este método consiste em encontrar uma solução geral por meio de uma separação das variáveis presentes na equação.

Seja  $y$  uma função de  $t$  e  $\alpha$  uma constante real, de tal forma que:

$$\frac{dy(t)}{dt} + \alpha y(t) = 0, \quad (\text{C.3})$$

é possível reescrever a equação acima isolando  $\alpha$

$$\begin{aligned} \frac{\frac{dy(t)}{dt}}{y(t)} &= -\alpha, \\ \frac{dy}{y(t)} &= -\alpha dt. \end{aligned} \quad (\text{C.4})$$

Integrando de ambos os lados:

$$\ln(y(t)) = -\alpha t + C, \quad (\text{C.5})$$

onde  $C$  é uma constante de integração.

Reorganizando:

$$y(t) = e^C e^{-at} = C_1 e^{-at}, \quad (\text{C.6})$$

é a solução geral, no qual  $e^C = C_1$  é constante. É possível ainda analisar este resultado empregando diferentes limites para  $t$ , de zero a infinito e observar o comportamento por meio de um gráfico.

Este método para encontrar as soluções de uma EDO, é simples, e pode ser empregado tanto para equações homogêneas e não-homogêneas.

Entretanto, para equações de ordem superiores, é necessário outro métodos.

## C.2 EDOs de Segunda ordem

Para as EDOs de segunda ordem, é possível encontrar a solução partindo de um suposto modelo de solução que não conhecemos.

Seja a EDO de segunda ordem:

$$\frac{d^2 y(t)}{dt^2} + a \frac{dy(t)}{dt} + by(t) = 0. \quad (\text{C.7})$$

É possível supor que sua solução geral é da forma:  $y(t) = C e^{At}$ , pois é parecido com as soluções de primeira ordem que vimos anteriormente. Utilizando esta solução, é possível efetuar duas derivações:

$$\begin{aligned} \frac{dy(t)}{dt} &= CAe^{At}, \\ \frac{d^2 y(t)}{dt^2} &= CA^2 e^{At}. \end{aligned}$$

Com isso, é possível aplicar essas derivadas na equação diferencial.

$$(CA^2 e^{At}) + a(CAe^{At}) + b(Ce^{At}) = 0. \quad (\text{C.8})$$

Reorganizando:

$$A^2 + aA + b = 0. \quad (\text{C.9})$$

Como se trata de uma equação de segundo grau, é possível solucionar facilmente e obteremos dois resultados, ou, simplesmente:

$$A = \frac{-a \pm \sqrt{a^2 - 4b}}{2}. \quad (\text{C.10})$$

As soluções de equações de segunda ordem, podem ter soluções reais ou complexas. As soluções reais possuem somente incógnitas ou constantes que estão dentro do conjunto dos números reais e as soluções complexas possuem parte imaginária.