Diana María Martínez Muñoz

**Proposta de um protocolo para a caracterização e análise
das propriedades mecânicas de surfactantes exógenos**

**São Paulo
2013**

Diana María Martínez Muñoz

**Proposta de um protocolo para a caracterização e análise
das propriedades mecânicas de surfactantes exógenos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Área de concentração: Estudo de Mecânica
Pulmonar em Múltipla Escala
Especialidade: Surfactante Pulmonar
Orientador: Prof. Dr. Adriano Mesquita Alencar

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martínez-Muñoz, Diana María

Proposta de um protocolo para a caracterização e análise das propriedades mecânicas de surfactantes exógenos / Diana Maria Martínez Muñoz. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Adriano Mesquita Alencar.

Descritores: 1.Surfactantes pulmonares 2.Tensão superficial 3.Síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido 4.Fosfolipídios 5.Alvéolos pulmonares

USP/FM/DBD-280/13

*Ao meu pai **Leonardo**, minha mãe **Manuela** e
minha irmã **Karol**.
Por serem pessoas excepcionais e a razão da
minha vida.
Obrigada pelo apoio incondicional.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter me guiado ao longo da minha vida, por ser minha fortaleza em momento difíceis e por me dar uma vida de aprendizado, experiências e felicidade.

Agradeço a meus pais **Leonardo** e **Manuela** pelo seu infinito amor e apoio incondicional em cada etapa da minha vida, me sinto muito orgulhosa de vocês, são um exemplo a seguir.

À minha irmã **Karol**, por seus conselhos e abraços; em momentos felizes e difíceis sempre tive seu carinho e apoio quando mais o necessitei.

À minha avó **Olga Rivas**, por cada uma das suas orações, sempre me mandando anjos para cuidarem de mim.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Adriano Alencar** pela paciência, confiança, ajuda, apoio, disposição e dedicação, pela oportunidade que me deu de crescer tanto academicamente e como pessoa.

Ao **Professor Henrique Moriya**, por todo o apoio e disponibilidade em me atender, ajudar, agradeço por toda a paciência que teve comigo

Ao **Professor Celso Rebello** por disponibilizar o laboratório e o equipamento para que esta pesquisa.

Ao **Professor Joao Lyra** por sempre estar disposto a me ajudar e dar sua opinião sobre minha pesquisa.

Ao LabM²: Deste grupo agradeço especialmente a **Márcia Zotti Justo Ferreira**, pela sua ajuda incondicional, sempre disposta a me ajudar, escutar e por ser um apoio fundamental. Ao **Wagner** por toda a força, pelas discussões que foram importantes para concluir o artigo e esse mestrado, Ao **Marcel** por ser um grande apoio e um ótimo amigo, **Alexandre, Mariana Sacrini, Mac Gayver, Mariana Menegon, Danilo, Vitor**, além de serem meus amigos se converteram na minha família. Obrigada por me ajudarem em todos os momentos!

Ao **Jimmy Valencia**, por todo seu apoio e disposição para me ajudar em todo momento, agradeço enormemente pela disposição quando mais

À minha amiga **Oriana Mayorga**, por tudo o que vivemos juntas durante estes anos, por cada momento que compartilhamos, por ser um apoio sempre, te levo no meu coração.

À **Adriana Torres** por que a pesar de todos estes anos sempre estivemos quando mais precisávamos uma da outra.

À **Aura**, porque nada no mundo é por casualidade, obrigada por todo seu apoio, por chegar em um momento muito importante.

A **Guilherme Abib** pelo seu apoio, compressão, por todo seu amor e bons conselhos, obrigada por tudo, te amo muito.

À **família Martinez, Muñoz, amigos** que apesar não estarem presentes, me ajudaram direta o indiretamente.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro.

“Não se pode ensinar nada a um homem; pode-se apenas ajudá-lo
a encontrar a resposta dentro dele mesmo”

Galileu Galilei

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Requisitos uniformes para manuscritos/*International Committee of Medical Journals Editors*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed em Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivo Geral	04
2.2 Objetivos Específicos	04
3 REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1 Tensão Superficial.....	05
3.2. Filmes de superfície.....	08
3.2.1 Comportamento dos filmes de superfície na interface ar-líquido.....	08
3.3 Surfactantes.....	11
3.3.1 Importância das forças da tensão superficial na mecânica pulmonar.....	12
3.4 Surfactante pulmonar.....	13
3.4.1 Composição de surfactante pulmonar.....	14
3.4.1.1 Composição dos fosfolípidios.....	15
3.4.1.2 Composição das proteínas.....	19
3.4.2 Inibição ou inativação do surfactante pulmonar.....	21
3.5 Surfactantes exógenos.....	22
3.5.1 Fontes de obtenção e produção de surfactantes exógenos.....	22
3.6 Métodos para caracterização da tensão superficial.....	24

3.6.1 Balança de Wilhelmy.....	24
3.6.2 Vantagens e desvantagens do uso da balança de Wilhelmy	31
3.6.3 Surfactômetro de Bolha Pulsátil (SBP)	32
3.6.4 Surfactômetro de Bolha Cativa	33
4 MÉTODOS	35
4.1 Sistema geral para medição de tensão superficial.....	35
4.1.1 Caracterização física da balança de Wilhelmy.....	36
4.1.2 Controle de temperatura.....	40
4.1.3 Análise e aquisição dos dados.....	41
4.2 Protocolo proposto para medição da tensão superficial.....	41
4.2.1 Material e instrumentação.....	41
4.2.2 Procedimentos experimentais.....	42
4.2.3 Medição da tensão superficial	43
4.2.4 Quantificação do Trabalho (J)	45
4.2.5 Ajuste exponencial	45
4.2.6 Análise estatística	46
4.3 Limitações do equipamento	46
5 RESULTADOS	49
5.1 Medição da tensão superficial.....	49
5.2 Testes com surfactantes exógenos.....	50
5.2.1 Efeito das subfases e velocidades.....	50
5.2.2 Quantificação de trabalho em curva de histerese.....	55
5.3 Ajuste exponencial.....	58
5.3.1 Análises das velocidades.....	60
5.3.2 Análises das subfases.....	62
5.3.3 Análises entre surfactantes.....	63
5.3.3.1 Subfases	63
6 DISCUSSÃO	65

7 CONCLUSÕES	69
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	71
--------------------------	-----------

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Operação do programa do software da KSV

APÊNDICE 2 – Artigo submetido para revista

LISTA DE ABREVIATURAS

ed.	edição
et al.	e outros
ex.	exemplo
p.	página
Prof.	Professor
Rev.	Revista
v.	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{+2}	Íon de cálcio
cm^2	centímetro quadrado
θ	ângulo de contato
dinas/cm	dinas por centímetro
F	força
J	Joule (trabalho)
J/m^2	Joule por metro quadrado
m	metro
mA	miliAmpères
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm	milímetro
min	minuto
mm^2	milímetros quadrados
mmHg	milímetros de mercúrio
mN/m	miliNewton por metro
$\text{M}\Omega$	megaohm
N/m	Newton por metro
®	Marca registrada
°C	graus Celsius
°F	graus Fahrenheit
γ	tensão superficial
ΔP	diferença de pressão
%	porcento
μL	microlitros
π	Pressão Superficial

LISTA DE SIGLAS

CGS	Centímetro – Grama - Segundo
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FG	Fosfatidilglicerol
FI	Fosfatidilinositol
FL	Fosfolipídeos
FS	Fosfatidilserina
G	Gás
KSV	KSV Nima Lagmuir Troughs Medium 1000 IUD, Espoo, Finlândia/nome do fabricante da balança de Wilhelmy
L	Líquido
LBA	Lavado Bronco-Alveolar
LC	Líquida-condensada
LE	Líquida-expandida
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
RN	Recém-nascido
S	Sólido
SBC	Surfactômetro de Bolha Cativa
SBP	Surfactômetro de Bolha Pulsátil
SDR	Síndrome Desconforto Respiratório Infantil
SDRA	Síndrome Desconforto Respiratório Agudo
SI	Sistema Internacional de Unidades
SP-A	Proteína de surfactante A
SP-B	Proteína de surfactante B
SP-C	Proteína de surfactante C
SP-D	Proteína de surfactante D
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VM	Ventilação Mecânica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição das forças das moléculas da água. Pode se observar a diferença que existe entre as forças que atuam nas moléculas próximas a superfície daquelas localizadas no interior	06
Figura 2	Balança de Wilhelmy para medição da tensão superficial	09
Figura 3	Representação do comportamento das moléculas de um filme de superfície e os diferentes estados (Sólido S, Líquido L e Gasoso G) a medida que se comprime a monocamada a tensão superficial diminui e a pressão superficial aumenta	10
Figura 4	Bolhas de sabão com tamanhos de pressão diferentes, B bolhas interconectadas instáveis, C estabilidade alcançada pela alteração da tensão superficial, D gradiente de tensão superficial causa migração de surfactante para regiões com maiores tensões superficiais, voltando à instabilidade	13
Figura 5	Estrutura do alvéolo pulmonar. Processo de produção do surfactante pulmonar a partir dos Pneumocitos tipo II	14
Figura 6	Estrutura molecular dos fosfolipídios	16
Figura 7	Representação esquemática do metabolismo do surfactante	19
Figura 8	Proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D, e Domínio Receptor a Carboidratos (DRC)	20
Figura 9	Proteínas hidrofóbicas: SP-B e SP-C	21
Figura 10	Representação de um alvéolo com SDRA	25
Figura 11	Representação do surfactômetro de bolha pulsátil	28
Figura 12	Representação do surfactômetro de bolha cativa	33
Figura 13	Representação do sistema geral de medição da tensão superficial	34
Figura 14	Representação do sistema geral para medição da tensão superficial localizado no Laboratório do Instituto Butantã	36
Figura 15	Balança de Wilhelmy para medição da tensão superficial (Lagmuir Troughs Medium 1000 IUD, KSV Nima 1000 IUD, Finlândia)	36
Figura 16	Representação da placa de platina submersa em um líquido, nela observa-se a força do líquido agindo sobre a placa	37
Figura 17	Placa de platina imersa na subfase	38

Figura 18	Representação da bandeja de teflon na qual é depositada a subfase e a amostra cuja tensão superficial será medida	38
Figura 19	Representação das barreiras móveis	39
Figura 20	Área máxima e área mínima de abertura e fechamento das barreiras na superfície total da bandeja	40
Figura 21	Representação do sistema geral para o controle e manutenção da temperatura a 37°C	40
Figura 22	Representação da medição da tensão superficial em função da área de superfície	41
Figura 23	Representação da medição da tensão superficial da água ultrapura e da solução salina a 0.9%. Estas medidas demonstram a limpeza do equipamento e o calibram para realizar as medidas com surfactantes exógenos	45
Figura 24	Representação de uma curva de histerese	46
Figura 25	Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Curosurf® em diferentes concentrações e diferentes subfases a uma velocidade de 50 mm/min	47
Figura 26	Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Curosurf® a diferentes concentrações, diferentes subfases e a uma velocidade de 120 mm/min	48
Figura 27	Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Survanta® em diferentes concentrações e diferentes subfases	49
Figura 28	Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Survanta® em diferentes concentrações e diferentes subfases a uma velocidade de 120 mm/min	51
Figura 29	O círculo vermelho mostra o dado a ser desprezado da representação gráfica	52
Figura 30	Representação de uma curva de histerese, no círculo vermelho observa-se o decaimento da tensão superficial do Curosurf® em água ultrapura a 8 mg/mL	53
Figura 31	Ilustração de uma curva de histerese, representando o Trabalho (J) em uma compressão e expansão	54
Figura 32	Representação gráfica das medidas do trabalho e o desvio padrão para o Curosurf® em água ultrapura e solução salina para as velocidades de 50 e 120 mm/min	55
Figura 33	Representação gráfica das medias do trabalho e o desvio padrão para o Survanta® em água ultrapura e solução salina para as velocidades de 50 e 120 mm/min	56
Figura 34	Representação do ajuste exponencial para o Curosurf nas concentrações de 0.5, 2 e 8 mg/mL	57

Figura 35	Representação gráfica das medidas do trabalho e o desvio padrão para o Survanta em água ultrapura e solução salina para as velocidades de 50 mm/min e 120 mm/min	57
Figura 36	Representação do ajuste exponencial, Equação 2, para Curosurf [®] e Survanta [®] para 0.5 mg/mL, medidas de um conjunto de ciclos para esta concentração	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do surfactante pulmonar	15
Tabela 2	Composição dos surfactantes exógenos Curosurf® e Survanta®.	23
Tabela 3	Lista de equipamentos, materiais e reagentes utilizados na experimentação	42
Tabela 4	Diluição de Curosurf® e Survanta® em clorofórmio em diferentes concentrações	44
Tabela 5	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em água ultrapura em diferentes velocidades	61
Tabela 6	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em solução salina em diferentes velocidades	61
Tabela 7	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survanta® em água ultrapura em diferentes velocidades	61
Tabela 8	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survanta® em solução salina em diferentes velocidades	61
Tabela 9	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em subfases diferentes e velocidades iguais	62
Tabela 10	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em subfases diferentes e velocidades iguais	62
Tabela 11	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survanta® em velocidades iguais e subfases diferentes	62
Tabela 12	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survanta® em subfases diferentes e velocidades iguais	62
Tabela 13	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e o Survanta® em subfases e velocidades iguais	63
Tabela 14	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e o Survanta® em subfases e velocidades iguais	63
Tabela 15	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e o Survanta® em subfases e velocidades iguais	63
Tabela 16	Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e o Survanta® em subfases e velocidades iguais	63

RESUMO

Martínez-Muñoz DM. *Proposta de um protocolo para a caracterização e análise das propriedades mecânicas de surfactantes exógenos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O surfactante pulmonar é uma mistura complexa de fosfolipídios e proteínas, e encontra-se presente na interface ar-líquido dos alvéolos pulmonares. O seu papel principal é reduzir a tensão superficial para manter os alvéolos estáveis. A deficiência ou disfunção do surfactante leva ao colapso alveolar, provocando a falta de oxigenação que ocorre devido ao edema ou a resposta inflamatória nos pulmões. Em recém-nascidos, a imaturidade pulmonar, pela deficiência do surfactante, pode causar a Síndrome de Desconforto Respiratória (SDR). Nos adultos, a Síndrome de Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é a manifestação mais grave da Lesão Pulmonar Aguda (LPA), o tratamento para estas doenças inclui a utilização de surfactantes exógenos. Para entender a funcionalidade do surfactante é necessário caracterizá-lo biofisicamente. A principal característica observada neste estudo foi o espalhamento e recuperação do surfactante na subfase, para a interface ar-líquido. O espalhamento e recuperação foram quantificadas observando o trabalho feito em sucessivos ciclos de compressão e expansão na balança de Wilhelmy. Analisou-se o decaimento do trabalho ao longo dos ciclos até a sua estabilização. Os parâmetros obtidos neste ajuste do decaimento exponencial foram utilizados para a caracterização de dois surfactantes exógenos, o Curosurf[®] e o Survanta[®]. As comparações entre eles foram segundo a concentração, as subfases e das velocidades de barreira. O decaimento exponencial do trabalho nos ciclos só ocorreu para concentrações menores de surfactante. Quando em subfase de solução salina ocorreu a melhora na recuperação do surfactante para a interface ar-líquido, em comparação a subfase de água ultrapura. A melhor velocidade de barreira encontrada para otimização da recuperação do surfactante foi 120 mm/min. Foi observado nesse estudo que as propriedades de recuperação do Curosurf[®] foram melhores em relação ao Survanta[®], os parâmetros se mostraram de acordo com os dados clínicos encontrados na literatura, a caracterização da dinâmica do surfactante foi feita de forma diferente de todos os métodos encontrados.

Descritores: surfactante exógeno, tensão superficial, fosfolipídios, proteínas, balança de Wilhelmy

SUMMARY

Martínez-Muñoz DM. Proposal of a protocol for the characterization and analysis of the mechanical properties of exogenous surfactants [Dissertation]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Lung surfactant is a complex mixture of phospholipids and proteins, found at the air-liquid interface of pulmonary alveoli. The main role is to reduce the surface tension to keep alveoli stable. Surfactant deficiency, or dysfunctional, leads to alveolar collapse, causes a lack of oxygen and it may be due to edema or inflammatory response in the lungs. In newborn babies, pulmonary immaturity, caused by surfactant deficiency, may cause Respiratory Distress Syndrome (RDS). In adults, the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is the gravest manifestation of Acute Lung Injury (ALI), and the treatment includes Mechanical Ventilation (MV) and exogenous surfactants. To understand surfactant functionality, it is necessary to characterize them biophysically. The main characteristic observed in this work was the mobility and recovery of surfactant in the subphase to the air-liquid interface. The mobility and recover were quantified observing the work done in successive cycles of compression and expansion in a Wilhelmy plate tensiometer. The work decay was analyzed over cycles until its stabilization. The parameters obtained for the exponential fitting of decay were used for characterization of two exogenous surfactants, Curosurf[®] and Survanta[®]. The comparisons between them were done under concentration, subphases and barrier speeds. The exponential decay of the cycle work only happened for lower concentrations of surfactant. Saline solution subphase improved the surfactant recovery to the air-liquid interface over ultrapure water subphase. A suitable barrier speed founded to optimize surfactant recovery was 120 mm/min. In this study were observed that recovery properties of Curosurf[®] were better than Survanta[®], the parameters agrees with clinical data from the literature, and the dynamic characterization of surfactant was done of different way than founded methods.

Descriptors: Pulmonary surfactant, surface tension, phospholipids, proteins, Wilhelmy balance.

1 INTRODUÇÃO

O surfactante pulmonar é uma mistura complexa, e é essencial para a manutenção da vida. É composto por fosfolipídios e proteínas e encontra-se presente na interface ar-líquido dos alvéolos pulmonares. Possui a propriedade de reduzir a tensão superficial, mantendo os alvéolos insuflados, dessa forma, sua presença é fundamental para que ocorra o processo da difusão na respiração, permitindo que ocorram as trocas gasosas e assegurando a permanente concentração de oxigênio no sangue e a retirada do gás carbônico (Alencar, 1999) (Serrano, Perez-Gil, 2006).

Os estudos para utilização de surfactante iniciaram-se na década de 1950, por causa do alto índice de mortalidade em recém-nascidos com imaturidade pulmonar (Avery, 1959). Neles a quantidade de surfactante produzida não era suficiente para evitar o colapso alveolar. Primeiramente foi denominada de Síndrome da Membrana Hialina e hoje é conhecida como Síndrome de Desconforto Respiratório (SDR) (Fugiwara, 1980).

Em adultos, na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que é a manifestação mais grave da Lesão Pulmonar Aguda (LPA), em sua fase inicial é caracterizada pelo *deficit* de oxigenação decorrente do edema e da resposta inflamatória nos pulmões, e esse processo é resultante da disfunção do surfactante (Ferreira, 2012) (Dushianthan et al., 2011).

Nessa síndrome pode se usar surfactantes exógenos, que são surfactantes naturais obtidos do extrato de pulmões de animais e vendidos comercialmente

(Ramanathan, 2004) (Willson, Notter, 2011). A terapêutica com surfactante exógeno é bastante efetiva, e este é um tratamento importante para o controle da mortalidade.

Apesar da eficácia alta demonstrada durante os últimos anos pelos surfactantes exógenos naturais, estes ainda não satisfazem a demanda do mercado mundial. Uma das razões é a disponibilidade limitada de matéria prima com qualidade que cumpra com os padrões necessários, para a produção de medicamentos a serem utilizados em humanos. Esse fator, unido aos altos custos de produção, ocasionou a busca de uma alternativa mais barata, ela foi encontrada em produtos artificiais ou sintéticos mais simples.

Tanto nos surfactantes exógenos naturais como nos sintéticos é necessária a avaliação biofísica de sua funcionalidade, um dos métodos que é altamente utilizado pela literatura internacional, e por meio da balança de Wilhelmy o qual foi o equipamento utilizado nesta pesquisa. Perante toda a bibliografia levantada, evidenciou-se a necessidade da padronização na utilização deste equipamento devido as controvérsias na metodologia que poderiam ser melhoradas e aperfeiçoadas.

Por tanto o objetivo deste estudo é apresentar um protocolo para caracterização e análise das propriedades mecânicas dos surfactantes exógenos comerciais os quais são disponíveis para o comercio brasileiro tais como o Curosurf® (porcino) e o Survanta® (bovino).

A balança de Wilhelmy utilizou-se para realizar medidas de tensão superficial destes dois surfactantes, comparando diferentes condições experimentais como são diferentes concentrações, velocidades de barreira e diferentes tipos de subfase.

Apos a medição da tensão superficial se realizou o estudo da mecânica do surfactante por médio de ferramentas matemáticas, avançando desta forma para o

estudo e o comportamento dos componente do surfactante e assim realizar uma aproximação ao que aconteceria na clinica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Apresentar um protocolo experimental para caracterização e análise das propriedades mecânicas de surfactantes exógenos utilizando a balança de Wilhelmy.

2.2 Objetivos Específicos:

- Comparar diferentes metodologias já descritos para o uso da balança de Wilhelmy.
- Medir a tensão superficial de surfactantes exógenos.
- Utilização do clorofórmio como solvente orgânico para espalhamento dos fosfolipídios na superfície.
- Comparar as medidas de tensão superficial a diferentes concentrações, subfases e velocidades.
- Comparar dois tipos de surfactantes os quais são os disponíveis para o comercio brasileiro tais como Curosurf® e Survanta®.
- Definir um novo tipo de calculo além da medição da tensão superficial que é o Trabalho (J)
- Definição do Trabalho propondo um ajuste matemático dos dados numa curva exponencial.
- Documentar o protocolo que foi desenvolvido de forma que possa ser seguido em estudos futuros e utilizado para interpretar dados na clinica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O objetivo deste capítulo é apresentar alguns dos conceitos teóricos fundamentais, no intuito de propor um protocolo para caracterização das propriedades mecânicas dos surfactantes exógenos. Deste modo, realizou-se uma revisão bibliográfica focada nos tópicos seguintes:

- 3.1 Tensão superficial
- 3.2 Filmes de superfície
- 3.3 Surfactantes
- 3.4 Surfactante pulmonar
- 3.5 Surfactantes exógenos
- 3.6 Métodos de caracterização da tensão superficial

Estes temas são importantes para a caracterização das propriedades mecânicas dos surfactantes exógenos. São abordados do ponto de vista biológico, com base nas grandezas físicas, o que facilita o entendimento do funcionamento dos componentes dos surfactantes.

3.1 Tensão superficial

A tensão superficial é uma manifestação das forças intermoleculares nos líquidos (Adam, 1968). Essa tensão é causada por forças que afetam cada molécula de forma diferente no interior e na superfície do líquido (Adam, 1968) (Adamson,

1997) (Notter, 2000). No caso de um líquido como a água, as moléculas que estão no interior sofrem forças iguais de atração, e na superfície essas forças se apresentam mais fracas pela presença do ar (Hills, 1999), conforme observado na Figura 1.

A força resultante que atua sobre as moléculas da água teria a tendência de ir para o interior do líquido, e esse fenômeno recebe o nome de pressão interna. Os componentes tangenciais desta força fazem com que a superfície da água se comporte como uma membrana elástica, que tenderá a contração, isto é, tenderá a ocupar a menor área possível (Adam, 1968).

Fonte: Disponível em: <http://qnintsbq.org.br> (2013)

Figura 1. Distribuição das forças das moléculas da água. Pode-se observar a diferença que existe entre as forças que atuam nas moléculas próximas à superfície das aquelas localizadas no interior

O valor da tensão de superfície depende da interação existente entre as moléculas do líquido. Quanto maiores as forças de coesão dentro do líquido, maior é a sua tensão superficial. A uma temperatura de 20°C, por exemplo, o valor da tensão superficial do etanol, da água e do mercúrio é de 22.55 mN/m, 72.75 mN/m e 485 mN/m, respectivamente (Adam, 1968) (Weast, 1988) (Notter, 2000).

No etanol existem forças intermoleculares que são chamadas de forças de Van der Waals. Na água, além das forças de Van der Waals existe a interação das pontes de hidrogênio, que se formam entre as moléculas. Já no mercúrio, predominam as ligações metálicas, por isso ele apresenta a maior tensão superficial (Vazquez et al., 1995).

A tensão superficial pode ser dimensionada no Sistema Internacional de Unidades (SI) como energia por unidade de área, J/m^2 (Joule por metro quadrado). Todavia, energia é dimensionada como força vezes comprimento ($1\text{J} = 1\text{N.m}$), assim, a tensão superficial também é expressa na dimensão de força por unidade de comprimento, ou seja N/m (Newtons por metro). No sistema CGS a tensão superficial é comumente expressa em dynes/cm (dynes por centímetro) (Adamsom, 1997) (Notter, 2000).

Existem várias maneiras de modificar a tensão superficial de um líquido, uma delas são alterações na temperatura. Qualquer mudança na temperatura afetaria inversamente a tensão superficial (Adamsom, 1997).

A presença de moléculas orgânicas, por exemplo, os surfactantes, que serão explicados abaixo, podem aumentar ou diminuir a tensão superficial de uma interface ar-líquido. Por exemplo, moléculas orgânicas que apresentam uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica, tais como os fosfolipídios (surfactantes), dão origem a um filme que é depositado na superfície do líquido, diminuindo a força de atração entre suas moléculas reduzindo assim, sua tensão superficial (Shaw, 1975).

3.2 Filmes de superfície

Os filmes de superfície têm sido estudados desde o século XIX, após os estudos de Benjamin Franklin, em 1774, quando ele observou que a adição de óleo na superfície da água formava uma fina camada que se espalha rapidamente. Em 1870, Lorde Rayleigh realizou experimentos com óleo e água, e quantificou a área ocupada pelas moléculas de óleo, conseguindo assim medir a espessura da camada formada. Essa descoberta contribuiu para que Pockels Agnes, em 1891, desenvolvesse um equipamento que media a área exata de uma película de óleo. Este equipamento foi o precursor da balança de Langmuir (Adamson, 1997).

Os primeiros trabalhos completos para o estudo dos filmes de superfície surgiram com Irving Langmuir, em 1930. Uma de suas principais colaboradoras foi Katherine Blodgett. Juntos, Langmuir e Blodgett fizeram descobertas relevantes sobre o assunto, tanto que os filmes moleculares recebem o nome de filmes de Langmuir-Blodgett (Blodgett, 1935). Hoje várias áreas de pesquisa continuam estudando esta questão. Na medicina, para produção de surfactante pulmonar, na farmacologia e química no estudo dos colóides e produção de novos medicamentos, na física no estudo dos fluidos complexos, dentre outros (Modrykamien, 2011).

3.2.1 Comportamento dos filmes de superfície em uma interface ar-líquido

Para determinar a tensão dos filmes de superfície formada sobre uma camada líquida, utiliza-se a balança de Wilhelmy conforme observado na Figura 2. Ela possui uma bandeja, na qual é depositado o líquido e a substância que formará um

filme, e terá uma pequena placa de platina, suspensa por um braço. Das forças exercidas nesse contato da placa com o líquido do equipamento, por meio de um transdutor de força, medirá a tensão superficial.

Fonte: Modificada de Zuo (2008)

Figura 2. Balança de Wilhelmy para medição da tensão superficial

Uma forma de analisar essa tensão é pela modificação da área, que é feita por barreiras que se encontram sobre a bandeja, local onde o líquido foi depositado. Pela movimentação dessas barreiras o filme é comprimido, e nessa situação ocorre a diminuição da área de superfície. No retorno das barreiras ocorre a expansão, aumento da área de superfície, portanto uma compressão e uma expansão representam um ciclo.

De acordo com a movimentação das barreiras pode-se estudar os filmes e acompanhar a variação da tensão superficial que foi formada na interface ar-líquido (Dervinchian, 1939).

O comportamento e a organização das moléculas que formam o filme na interface ar-líquido podem ser descrita, em termos de transição de estado, entre as fases sólida, líquida e gasosa, como se observa na Figura 3.

Fonte: Modificada do manual KSV (2010)

Figura 3. Representação do comportamento das moléculas de um filme de superfície e os diferentes estados (Sólido S, Líquido L e Gasoso G) à medida que se comprime a monocamada a tensão superficial diminui e a pressão superficial aumenta

Quando as barreiras estão abertas, o filme de superfície é semelhante a um gás (G), nesta fase as moléculas não estão interagindo entre si. A região que surge depois da primeira transição, é denominada de líquida-gasosa (LG), a seguinte fase é denominada como líquida-condensada (LC), nestas duas fases as moléculas estão mais próximas umas das outras, e interagem entre si. Finalmente a região de alta compressibilidade é denominada de sólida (S); nesta fase as moléculas do filme estão completamente organizadas e os valores da tensão superficial caem drasticamente (Dervinchian, 1939) (Harkins, 1940).

Existem diferentes tipos de substâncias que formam filmes, o representante mais importante dessa categoria são os surfactantes.

3.3 Surfactantes

O termo surfactante é uma contração para “agente de superfície ativa”. Por definição uma substância se qualifica como surfactante se for capaz de alterar a tensão superficial para um valor diferente daquele produzido pela mesma substância na forma pura (Adansom, 1997).

As gorduras, sabões e detergentes, são surfactantes pela sua natureza anfifílica, isto é, substâncias com uma parte polar e hidrofílica e outra apolar e hidrofóbica (Roberts, 1990). Elas são capazes de promover a interação entre meios que apresentam polaridade diferente como, por exemplo, água e óleo. Quando se fala em substância hidrofílica e polar entende-se que esta parte da molécula interage com a água, ao passo que a hidrofóbica e apolar, tende a repelir a água e interagir com um composto apolar, no caso o ar (Hills, 1999) (Notter, 2000) (Leblanc, 2006).

Um bom exemplo para entender os filmes de surfactante é pela formação das bolhas de sabão. Na água pura, por ter uma tensão superficial muito alta, não se consegue produzir bolhas de ar estáveis, mas ao misturar um pouco de sabão, diminui a tensão superficial e se obtém bolhas estáveis. Isto ocorre porque ao se misturar a água com o sabão, os enlaces das pontes de hidrogênio da água na interface ar-líquido são substituídos por ligações mais fracas entre o hidrogênio e a parte hidrofílica das moléculas do sabão, e diminuem, assim, as forças de tensão superficial (Adansom, 1997) (Hills, 1999).

3.3.1 Importância das forças de tensão superficial na mecânica pulmonar

A presença de uma tensão superficial pulmonar foi demonstrada pelo fisiologista von Neegaard (1929). Nos seus estudos em modelo animal concluiu que em todos os casos analisados de expansão pulmonar, a diminuição da tensão superficial do surfactante foi a principal causa para o colapso pulmonar, no qual a explicação para esse fato estaria na lei de Laplace. Hills (1999) ao seguir esta lei para esferas, afirmou que os alvéolos com raios diferentes teriam pressões internas diferentes, o que provocaria o colapso dos alvéolos menores e a distensão dos maiores (Bates, 2009). Isto pode ser explicado pela equação seguinte:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (1)$$

onde, a diferença da pressão ΔP dentro de uma bolha é inversamente proporcional a seu raio r e diretamente proporcional à tensão superficial γ .

O surfactante pulmonar permite a estabilidade alveolar e possibilita que os alvéolos de diferentes tamanhos funcionem com a mesma eficácia. Deste modo aumenta a distensibilidade pulmonar e reduz o trabalho respiratório. A razão pela qual a maioria dos alvéolos não colapsa, estaria relacionada unicamente com as propriedades da tensão superficial do surfactante pulmonar, conforme se observa na Figura 4.

Fonte: Modificada de Hills (1999)

Figura 4. Bolhas de sabão com tamanhos de pressão diferentes, B bolhas interconectadas instáveis, C estabilidade alcançada pela alteração da tensão superficial, D gradiente de tensão superficial causa migração de surfactante para regiões com maiores tensões superficiais, voltando à instabilidade

3.4 Surfactante pulmonar

O surfactante pulmonar é um dos mais potentes surfactantes conhecidos, e tem como característica a capacidade de baixar a tensão superficial a valores próximos a zero. Essa queda da tensão superficial é fundamental para a diminuição das forças que ocasionam o colapso alveolar. A interface ar-líquido, na qual atua a tensão superficial, é instável e cai à medida que a superfície alveolar vai tornando-se menor durante a expiração (Zuo, 2008). Já quando a superfície alveolar aumenta, o que ocorre durante a inspiração, a tensão superficial do surfactante pulmonar aumenta reduzindo a energia necessária para inflar os pulmões. Desta forma, o

surfactante pulmonar tem um papel fundamental na manutenção da mecânica respiratória (Bates, 2009) (West, 2010). É também responsável por manter os alvéolos abertos e reduz a tensão superficial, pelo efeito anti-edema, efeito anti-adesão de bactérias, vírus e fungos, proteção das células epiteliais na reabertura das vias aéreas, como também a dispersão dos fluidos e remoção de partículas (Zuo, 2008).

3.4.1 Composição do surfactante pulmonar

A existência do surfactante pulmonar em animais foi documentada em meados de 1950 por Pattle (1955) e Clements (1957). A composição do surfactante vem sendo estudada a partir da análise de Lavados Bronco Alveolares (LBA) de pulmões de animais de diferentes espécies (Notter, 2000). Todos possuem uma composição semelhante ao do surfactante humano. A partir do LBA obtém-se uma amostra dos componentes presentes nos alvéolos pulmonares, secretados pelos Pneumócitos tipo II que recobrem as vias aéreas, conforme mostrado na Figura 5.

Fonte: Modificada de Casals, (2012)

Figura 5. Estrutura do alvéolo pulmonar. Processo de produção do surfactante pulmonar a partir dos Pneumócitos tipo II

O surfactante é considerado um complexo lipoproteico. Entre 80 e 85% do peso do surfactante corresponde a material lipídico; entre 5 e 10% a proteínas e entre 5 e 10% a outros lipídios, como se pode observar na Tabela 1 (Christmann, 2009).

Tabela 1. Composição do surfactante pulmonar

Fosfolipídios	80-85 %
Fosfatidilcolina (FC)	75 % (50% DPPC)
Fosfatidilglicerol (FG)	12 %
Fosfatidiletanolamine (FE)	5 %
Fosfatidilinositol (FI)	4 %
Fosfatidilserina (FS)	2 %
Esfingomielina (SPM)	1.5 %
Lisofosfolipidos (LPL)	Menos 1 %
Lipídios neutros	5-10 %
Colesterol	90-95 %
Proteínas	5-10 %
Proteína surfactante (SP-A)	50-70 %
Proteína surfactante (SP-B)	10%
Proteína surfactante (SP-C)	10%
Proteína surfactante (SP-D)	10-30%

DPPC, di-palmitoilfosfatidilcolina

3.4.1.1 Composição dos fosfolipídios

Os Fosfolipídios (FL) são os componentes principais do surfactante pulmonar, os quais lhe conferem a capacidade de diminuir a tensão superficial. Os FL são moléculas com estrutura anfifílica, formada de um lado por um esqueleto de glicerol 3 carbono, que possui a forma de uma cabeça e é hidrofílica, isto é, tem afinidade pela água. Por outro lado, é formado por duas cadeias de ácidos graxos que possuem a forma de uma cauda e são hidrofóbicos, isto é, que tem afinidade pelo ar. Estas duas estruturas são unidas como mostrado na Figura 6 (Berhard, 2001).

A classe dos FL é determinada pelo tipo de grupo funcional presente na região hidrofílica ou cabeça, se esta apresenta uma carga positiva e uma negativa é

considerado como zwitteriônicos, mas se apresenta uma carga negativa é considerado como aniônico. Cada classe de FL possui a capacidade de subdividir-se em vários tipos moleculares de acordo com o tamanho da cadeia de ácidos graxos (Berhard, 1997) (Berhard, 2001).

Fonte: Modificada de Christmann (2009)

Figura 6. Estrutura molecular dos fosfolípidios

O surfactante pulmonar contém diferentes classes de fosfolípidios, e o seu componente principal é a fosfatidilcolina (FC), e representa 75% do total dos lipídeos, e nela 40% encontra-se na forma saturada e possui duas cadeias de ácidos graxos saturados, chamados de ácido palmítico que formam a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), e 35% na forma insaturada e possui, pelo menos, uma cadeia de ácido graxo monoinsaturado, todos representados em massa.

A DPPC caracterizasse por se compactar na interface ar-líquido melhor que outros fosfolípidios, isto se explica porque a parte da molécula semelhante a uma cauda, também conhecida por apolar, é reta. Essas características tornam o

espalhamento lento e demorando levando um tempo maior para ser absorvida. Isto ocorre principalmente porque a temperatura de transição do DPPC puro entre a fase gel e a de cristal-líquido é de 41°C, sendo maior que a temperatura do corpo humano (Hills, 1999).

As proteínas SP-B e SP-C reduzem a temperatura crítica (T_c) da DPPC de 41°C para valores menores que 37°C, melhorando assim a adsorção e a velocidade de espalhamento na interface ar-líquido (Hills, 1999).

Dos outros componentes dos FL, o segundo mais abundante é o Fosfatidilglicerol (FG). O FG é essencial para a formação dos corpúsculos laminares nos Pnenumócitos tipo II. Seguido a este se encontra o Fosfatidilinositol (FI), que está em maior concentração que o FG nos pulmões imaturos, a relação baixa entre o FG e FI é um indicador de imaturidade pulmonar (Field, 1997). Já a Fosfatidiletanolamina (FE), Fosfatidilserina (FS) e lisofosfatidilcolina apresentam uma baixa porcentagem na composição do surfactante pulmonar, dessa forma um aumento na sua concentração é um indicador de um processo inflamatório (Griese, 1999).

Os lipídios restantes são constituídos por formas neutras, sobretudo pelo colesterol. A função do colesterol é muito importante porque aumenta a fluidez da monocamada do surfactante, ajudando no espalhamento das moléculas da DPPC sobre a superfície alveolar (Possmayer, 1991).

A síntese da DPPC, FG, FI, e dos lipídeos restantes, sintetizam-se no retículo endoplasmático dos Pnenumócitos tipo II. A partir dos seguintes precursores: a

colina, ácidos graxos, fósforo e o glicerol, os precursores são transportados para o complexo de Golgi onde são processados e se agregam as proteínas SP-B e SP-C em bicamadas compactadas e concêntricamente organizadas. Posteriormente são enviados para os orgânulos de armazenagem, chamados de corpúsculos laminares, nos quais são secretados para a luz alveolar (Wright, 1990) (Notter, 2000).

Nos alvéolos, os corpúsculos laminares se expandem para a estrutura chamada de mielina tubular. As proteínas SP-A, SP-B e o íon Ca^{2+} são importantes para a conformação geométrica e a ativação do surfactante na interface. A mielina tubular é uma forma de armazenamento extracelular do surfactante, ela é a precursora da monocamada da interface ar-líquido (Veldhuizen, 2004).

Durante a expansão pulmonar, os componentes do surfactante presentes na hipófase, que são os fosfolipídios antes de se organizarem com um filme, migram para a monocamada. Na expiração, a monocamada é comprimida de tal forma que são excluídas as proteínas, os fosfolipídios não saturados e outros lipídios. Por este mecanismo, a monocamada fica enriquecida em DPPC, que é o componente mais importante para a diminuição da tensão superficial durante a compressão (Veldhuizen, 2004), conforme mostra a Figura 7.

Fonte: Modificado de Christmann (2009)

Figura 7. Representação esquemática do metabolismo do surfactante

3.4.1.2 Composição das proteínas

O surfactante é constituído por quatro proteínas específicas: SP-A, SP-B, SP-C e SP-D. Elas se agrupam de duas maneiras, as SP-A e SP-D são hidrofílicas e formam oligômeros de tamanho maior, pertencem ao grupo das coletinas e contém em sua estrutura domínios com capacidade de reconhecer e se juntar a certas cadeias oligosacarídicas em presença de cálcio, esse domínio é chamado Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (DRC) (Kuroki, 1994) (Perez-Gil, 2010) conforme observado na Figura 8. Já as SP-B e SP-C cumprem funções fundamentais nos mecanismos de defesa do pulmão e são capazes de neutralizar as endotoxinas e os vírus como também estimular a fagocitose.

Fonte: Modificado de Christmann (2009)

Figura 8. Proteínas hidrofílicas: SP-A e SP-D, Domínio Receptor a Carboidratos (DRC)

As SP-B e SP-C, por outro lado, são polipeptídios catiônicos de tamanho reduzido e seu caráter hidrofóbico elevado resulta que sejam solúveis em solventes orgânicos.

A SP-B é a proteína mais importante do surfactante para a manutenção da fisiologia respiratória. A inativação da expressão do gene da SP-B leva a uma insuficiência respiratória letal no nascimento, como resultado da impossibilidade de manter o pulmão aberto levando-o ao colapso. Porém, esta proteína é vital para a função do surfactante pulmonar, pois melhora o espalhamento como também a difusão da monocamada do surfactante na interface ar-líquido. Entre suas funções, destacam-se a formação e a organização da mielina tubular no interior do alvéolo (Baoukina, Tieleman, 2011).

A SP-C apesar de ter funções similares as da SP-B, sua deficiência congênita não resulta em morte por insuficiência respiratória (Rebello et al., 2002). As proteínas SP-B e SP-C são as principais responsáveis pelas propriedades biofísicas e funcionais do surfactante pulmonar (Notter, 2000) (Sati, 2010), conforme observado na Figura 9.

Fonte: Modificado de Christmann (2009)

Figura 9. Proteínas hidrofóbicas: SP-B e SP-C

3.4.2 Inibição ou inativação do surfactante pulmonar

A deterioração dos componentes do surfactante está associada a diferentes mecanismos de alteração. A deficiência de surfactante apresenta mudanças quantitativas, já a alteração do surfactante está associado às mudanças qualitativas.

A deficiência de surfactante se deve a imaturidade ou dano nos Pneumócitos tipo II, levando a insuficiência na síntese, armazenagem ou liberação do surfactante. Os inibidores do surfactante incluem proteínas plasmáticas (albumina, fibrinogênio ou fibrina), hemoglobina, lipídios celulares (FL não saturados, lisofosfolípidos, colesterol, ácidos graxos) e mecônio dentre outros. Estes inibidores se acumulam nos alvéolos dificultando a difusão do filme de surfactante na interface ar-líquido e competem pelo espaço (Enhoring, 1993).

3.5 Surfactantes exógenos

Fugiwara (1980) publicou o primeiro estudo clínico bem sucedido sobre a utilização de surfactante exógeno. O surfactante foi preparado a partir do extrato lipídico de pulmão bovino e foi enriquecido com FC saturada, além de outros lipídios. Com uma única dose intratraqueal, observou-se uma melhora significativa na oxigenação em prematuros com SDR, mostrando a eficácia do novo tratamento de reposição (Fugiwara, 1980) (Soll, 2001).

3.5.1 Fontes de obtenção e produção de surfactantes exógenos

A terapia de reposição de surfactante dispõe de duas opções diferentes: surfactantes naturais e sintéticos. Os surfactantes naturais podem ser obtidos de LBA e de macerado de pulmões bovinos ou porcinos (Goerke, 1998).

Os surfactantes produzidos a partir de LBA tem menor composição de lipídeos e proteínas, por causa do processo de extração. Entre os mais utilizados comercialmente, cita-se: Alveofact® (Boehringer Ingelheim, Germany) (Bernhard, 2000), Infasurf® (Forest Laboratory EUA) (Bloom, 1997) e Bles® (Canada Biochem BLES) (Yu, 1983) obtidos de fonte porcina, e o Surfacen® (CENSA) (Manzanares, 1995) obtido de fonte bovina.

Os surfactantes obtidos a partir de macerado pulmonar são extraídos por meio de procedimentos mais rigorosos. Por exemplo, Curosurf® (Chiesi Pharmaceuticals, Italy) (Ramanathan, 2004) (Rudiger, 2005), Survanta® (Abbot Laboratories, EUA)

(Ross, 1999) (Ramanathan, 2004), (Rudiger, 2005) e Surfactant TA® (Tokio Tanabe Co Ltd.) (Fujiwara, 1980). Estes surfactantes têm compostos adicionais, pois quando se realiza a extração, perdem-se proteínas essenciais tais como a SP-A, SP-D e alguns fosfolípidios.

O Survanta® é suplementado com DPPC porque apresenta menor quantidade de lipídeos em sua composição. Por outro lado, o Curosurf®, por ter maior concentração de lipídeos, não sofre adição de DPPC e tem seus lipídeos neutros removidos por cromatografia. Assim, a quantidade de DPPC nestes dois tipos de surfactantes é diferente, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos surfactantes exógenos Curosurf® e Survanta®

Fonte Composição	Macerado Pulmão	
	Curosurf®	Survanta®
FL	99.0	84.0
FC	78.0 (67.5)	62.0-87.0
DPPC (%FC)	35-56.0	70.0
FI	3.3-7.2	0.5
FG	1.2-3.5	2.5-3.2
PE	4.5-7.5	2.2
FS	1.2±1.1	3.7-4.8
LFC	<1.0-6.9	2.2
SM	1.8±0.3-8	0.8±0.15-4.8
Colesterol	NR	NR
FA		6
Proteínas (B+C)	1	0.5-1
SP-B**	2-3.7	0-1.3
SP-C**	5-11.6	1-20

Fonte: Modificada de Blanco (2007); **μL proteína/μmol de FL.

Os surfactantes sintéticos utilizados comercialmente possuem em sua composição uma mistura de FL, e o DPPC é o componente principal de superfície ativa. Entre os mais conhecidos, cita-se: Colfosceril palmitato Exosurf® (GlaxoSmithKline, London), Pneumactant® (Britania RU).

Atualmente encontra-se em estudo dois novos surfactantes sintéticos, o Surfaxin® (Discovery, EUA) e o Venticute® (Byk Gulden, Alemanha). Além da suplementação com FL e DPPC, a diferença é que estes também são suplementados com as proteínas SP-B e SP-C.

Em comparação com as preparações sintéticas, os surfactantes naturais apresentam melhor atividade biofísica como também resistência à inativação dos mediadores inflamatórios. A vantagem dos surfactantes pulmonares sintéticos é que possuem uma composição mais uniforme e não apresentam risco potencial para transmissão de doenças (Rebello, 2001) (Blanco, 2007) (Perez-Gil, 2010).

3.6 Métodos para caracterização da tensão superficial

O método físico utilizado para a avaliação das propriedades tenso ativas de um surfactante pulmonar inclui diferentes equipamentos desenhados com a finalidade de medir a tensão superficial, e de forma dinâmica com a variação da área. Entre os mais utilizados cita-se os seguintes: balança de Wilhelmy (Clements, 1957); o surfactrômetro de bolha pulsátil (Enhörning, 1977); e, o surfactômetro de bolha cativa (Schurch, 1995).

3.6.1 Balança de Wilhelmy

A balança de Wilhelmy, por medir as propriedade mecânicas dos surfactantes, constitui um método biofísico, dessa forma é utilizada para analisar as propriedades da superfície ativa em surfactantes pulmonares endógenos e exógenos.

Vários fatores na constituição da balança de Wilhelmy favorecem a análise do comportamento do surfactante pulmonar, dentre eles o espalhamento dos fosfolipídios e a simulação de um ciclo respiratório. Esses comportamentos podem ser observados ao se adicionar surfactante pulmonar exógeno sobre uma subfase líquida, ao modificar a tensão superficial observa-se o espalhamento e pela movimentação das barreiras ocorre um modelo fisiológico semelhante a uma inspiração, momento em que os pulmões são insuflados com ar.

Desta forma, a inspiração é representada na balança de Wilhelmy por uma expansão ou abertura das barreiras, nesse momento as partículas de surfactante encontram-se mais espalhadas na interfase alveolar, aumentando a medida da tensão superficial. A expiração é representada na balança por uma compressão ou fechamento das barreiras, nesse momento as partículas de surfactante se encontram mais agrupadas, diminuindo a tensão superficial rapidamente. Esta diferença de comportamento durante a inspiração e expiração é representada graficamente por uma histerese, conforme observado na Figura 10.

Fonte: Modificada de Juzar et al. (1999)

Figura 10. Representação de uma curva de histerese

No levantamento bibliográfico feito foram encontrados diferentes metodologias para medida de tensão superficial utilizando-se a balança de Wilhelmy. Na maioria destes artigos as medidas foram realizadas utilizando solventes orgânicos para a formação das monocamadas na superfície.

Acher e La Mer (1955) comprovaram a formação de uma monocamada utilizando diferentes solventes orgânicos, como o benzeno e o hexano. A verificação foi feita por um aparato simplificado, semelhante a uma bandeja e nela era observada a formação de monocamadas, que eram pesadas após a evaporação da água. Gaines (1963) demonstrou pela primeira vez a formação de uma monocamada utilizando clorofórmio como solvente orgânico.

Peterson (1990) evidenciou no seu trabalho que a técnica de Langmuir-Blodgett, era um método para realizar a formação de monocamadas orgânicas ultrafinas com uma estrutura de camada controlada, influenciadas pela organização altamente anisotrópica. Isto quer dizer que seu grupo funcional tinha dois tipos de carga elétrica, uma positiva e uma negativa, essencialmente de duas dimensões nas suas moléculas constituintes.

Moghaddam (2011) afirma que a formação de monocamadas de superfície dependerá diretamente da solubilidade dos surfactantes, ou seja, se forem solúveis formaram monocamadas de Langmuir-Blodgett, mas se não forem, formaram monocamadas de Gibbs. Para formar este tipo de monocamadas se realiza primeiramente uma solução, utilizando-se surfactante diluído num solvente orgânico e posteriormente depositado em uma interfase aquosa. Desta forma pode-se espalhar espontaneamente na interface e posteriormente evaporar.

Os solventes que poderiam ser empregados para realizar monocamadas incluem, por exemplo, clorofórmio, benzeno e ciclo hexano.

No manual da balança que foi utilizada no presente estudo (KSV NIMA 1000 IUD, Finlândia), reporta-se dados com a utilização de três solventes orgânicos: hexano, clorofórmio ou metano. É importante saber o modelo da balança para utilizar a quantidade suficiente de solvente e não danificar as propriedades da bandeja.

Apesar do mencionado anteriormente, ainda se encontram estudos nos quais foi realizada a medição da tensão superficial sem o uso de solventes orgânicos. Gupta (2000) apresenta um protocolo para medir a tensão superficial da DPPC na balança de Wilhelmy, sem empregar solventes orgânicos.

Em outro estudo realizado por Possmayer (2001), realizaram medidas de tensão superficial de amostra de surfactante puro sem fazer nenhuma diluição com solventes orgânicos, empregando o mesmo equipamento que o utilizado no presente estudo. Em outra pesquisa, realizada por Ikegami (1987), o autor não reporta o uso de solventes orgânicos para medidas de tensão superficial de surfactantes.

Ao começar este estudo realizaram-se medidas sem o uso de solventes orgânicos, mas observou-se que quando era depositado o surfactante na subfase, imediatamente se formavam vesículas que decantavam no fundo da bandeja. Durante o levantamento bibliográfico, mesmo com a descoberta da utilização do clorofórmio por Gaines, em 1963, ele não era utilizado nas medições da tensão superficial.

Ao verificar o manual da Balança da Wilhelmy notou-se que também indicava o uso de clorofórmio. Por isso foram iniciados novos testes incluindo o uso

desse solvente orgânico e os resultados mostraram-se muito promissores, pois se observou um rápido espalhamento das moléculas do surfactante na superfície do líquido e também a quantidade utilizada foi dez vezes menor conforme observado na Figura 11.

Figura 11. A representa a adição de surfactante sem o uso do clorofórmio pode-se observar como as moléculas se decantam no fundo da bandeja, B representa a adição do surfactante dissolvido em clorofórmio, onde as moléculas do surfactante se espalham na superfície da subfase

Mediante o que foi levantado na literatura e nos experimentos realizados, fica clara a necessidade da utilização de solventes orgânicos para a realização das medidas da tensão superficial, com surfactantes exógenos na balança de Wilhelmy. Uma das principais razões é a composição do surfactante, que é 90 % lipídica, e isso o impede criar um filme de superfície na interface ar-líquido.

Os surfactantes, quando são dissolvidos num solvente orgânico volátil não aquoso, como é o caso do clorofórmio, são depositados sobre uma superfície líquida polar. O solvente evapora deixando as moléculas de surfactante orientadas para a interface ar-líquido. Os grupos de caráter hidrofílico levam as moléculas para a

subfase e os grupos de caráter hidrofóbico se direcionam para o ar. Uma monocamada de superfície somente será alcançada se o equilíbrio anfipático da molécula for alcançado, ou seja, ocorrer o equilíbrio entre as partes hidrofóbicas e hidrofílicas (Roberts, 1990).

Além de não usar clorofórmio, o levantamento também mostrou a inexistência de uma metodologia padrão e isso nos impulsionou a propor um protocolo que uniformizasse e incluísse diferentes condições experimentais como o controle de temperatura, diferentes tipos de subfases, concentrações e velocidade de barreira no método de medida da tensão superficial na balança de Wilhelmy.

Controle de temperatura:

A temperatura média corporal normal é geralmente de 37°C (98,6°F), (Mackowiak, 2009), desta forma, para realizar os experimentos a temperatura foi mantida em $37 \pm 0,2$ °C nas duas subfases, tanto para água ultrapura como para solução salina, com isto a temperatura permaneceria próxima à fisiológica.

Subfases

Utilizaram-se dois tipos de subfases para os experimentos, e elas são água ultrapura e solução salina, e nelas foi comparado o espalhamento (Gerbart, 1996).

Água ultrapura

A subfase mais utilizada para o estudo de filmes é a água ultrapura (Milli-Q, Millipore®). Normalmente, as medições são efetuadas de forma que se exclua qualquer contaminante da subfase. A preparação das soluções deve ser realizada

cuidadosamente. A água utilizada para a determinação da tensão superficial deve ser da maior pureza possível, com ausência de partículas, bactérias e contaminação iônica, isto é, apresentar uma resistividade de 18.2 MΩ.cm (Hills, 1999) (Notter, 2000) (KSV, 2010).

Solução salina

Ao contrário da água ultrapura, uma solução salina contém íons. Neste estudo se utilizou solução salina de cloreto de sódio a 0.9 % (ADV®) por possuir um pH ácido. Nesta solução, as moléculas do surfactante interagem com maior facilidade do que com água ultrapura. A solução de cloreto de sódio tem uma composição similar a do líquido extracelular do organismo. Estando a solução de cloreto de sódio a 0.9 %, ela possui aproximadamente a mesma pressão osmótica que a dos líquidos corporais.

O sódio é o principal cátion do líquido extracelular que atua, normalmente no controle da distribuição da água, equilíbrio dos fluídos e dos eletrólitos, e na pressão osmótica (Fanaroof, 1992) (Jobe, 1999) (Brodsky, 2003). Além de representar melhor o ambiente fisiológico, os íons da solução salina facilitam o espalhamento do surfactante.

O surfactante é composto, sobretudo por DPPC. Este fosfolipídio tem um comportamento zwitteriônico, ou seja, esse grupo funcional apresenta dois tipos de cargas, uma negativa e uma positiva, grupos amônio (+) e grupos fosfato (-). Além disso, apresenta um comportamento anfotérico, isto é, pode reagir como um ácido ou como uma base.

Velocidade das barreiras

Nos experimentos foram utilizadas duas velocidades, 50 mm/min e 120 mm/min. A velocidade de uma compressão e uma expansão determinará também a velocidade com que as moléculas dos fosfolipídios se organizam na superfície da subfase. Esta propriedade é chamada de espalhamento, característica que está diretamente relacionada à funcionalidade tanto dos fosfolipídios como das proteínas e, portanto, está diretamente relacionada aos valores próximos a 0 na medida da tensão superficial.

Com a balança de Wilhelmy não se poderia alcançar uma velocidade de compressão e expansão igual à fisiológica, mas com os dados deste estudo conseguiu-se uma aproximação ao que poderia acontecer normalmente nos pulmões.

3.6.2 Vantagens e desvantagens do uso da balança de Wilhelmy

A utilização da balança de Wilhelmy pode ser combinada com técnicas microscópicas e espectroscópicas (Dynarowicz-Latka, 2001). Com a combinação destas técnicas pode se conhecer a estrutura molecular e a orientação das moléculas na superfície da interface ar-líquido.

A balança de Wilhelmy tem sido utilizada com microscopia de fluorescência (Nahmen, 1997) (Piknova, 2001), microscopia confocal (Hollars, 1998), microscopia de varredura (Kramer, 2000), microscopia de força atômica (Nag, 1999) e espectroscopia infra-vermelha (Brockman, 2003), entre outras.

Apesar das vantagens anteriores, a balança possui algumas desvantagens para o estudo de surfactantes, dentre eles, ciclos de expansão-compressão relativamente lentos, dificuldade para se controlar com precisão a temperatura e a umidade fisiológica, e não simula diretamente um ciclo respiratório (Hills, 1999).

3.6.3 Surfactômetro de Bolha Pulsátil (SBP)

O surfactômetro de bolha pulsátil baseia-se em uma técnica que foi desenvolvida por Enhorning (1977), para medição da tensão superficial dinâmica em uma bolha de ar. Essa técnica consiste de um capilar que é introduzido em uma gota do fluido a ser analisado. Esse capilar irá injetar ar no interior dessa gota e assim medir a variação da pressão exercida sobre essa bolha e a alteração da curvatura, essa bolha simula um alvéolo pulmonar (Zuo et al., 2005). O sensor mede diretamente a pressão da solução em torno da bolha. A tensão superficial é calculada pela lei de Laplace conforme equação que calcula a tensão superficial de uma superfície esférica. O registro simultâneo dos ciclos de compressão-expansão da bolha se realiza por meio de uma câmera de vídeo.

As vantagens do SBP em relação à balança de Wilhelmy inclui a medida da tensão superficial de uma superfície esférica, ciclos mais rápidos de expansão-compressão do filme de surfactante, pequenos volumes de amostra, realização de uma quantidade maior de ensaios em um curto período de tempo (Notter, 2000), o equipamento pode ser observado na Figura 12.

O SBP apresenta algumas dificuldades técnicas como: escape de líquido do sistema; deformações que a bolha pode sofrer (afastando-se de forma esférica e da

aplicação da lei de Laplace); necessidade de vários ciclos para a absorção adequada do surfactante; e, a impossibilidade de determinar a concentração do surfactante na interface ar-líquido (Zuo, 2008).

Fonte: Modificado de Zuo (2008)

Figura 12. Representação de surfactômetro de bolha pulsátil

3.6.4 Surfactômetro de Bolha Cativa

O Surfactômetro de Bolha Cativa (SBC) foi introduzido por Samuel Schurch no final da década de 1980 (Schurch, 1989) e desenhado e melhorado a partir do surfactômetro de bolha pulsátil, porém tem os mesmos princípios físicos. Uma bolha de ar é criada com uma seringa, que flutua em uma solução que contém surfactante, na parte superior da bolha encontra-se um gel de ágar hidrofílico que forma uma camada semicurva, conforme mostra Figura 13. A bolha é monitorada por uma câmera de vídeo e sua forma é analisada utilizando a relação altura-diâmetro, deste modo se calcula a tensão superficial (Schoel, 1994). Este equipamento possui a vantagem de não haver perda de amostra, é um método mais preciso na determinação da tensão superficial, os ciclos de expansão-compressão são mais rápidos, como, também, podem ser utilizadas câmaras de menor tamanho.

As desvantagens do SBC incluem a complexidade de análise dos dados, a dificuldade de mudar de solução, a possibilidade de visualização da bolha pulsátil em concentrações de surfactantes maiores do que 3 mg/mL.

Fonte: Modificado de Zuo (2008)

Figura 13. Representação do surfactômetro de bolha cativa

4 MÉTODOS

Este capítulo é dividido em cinco partes e nele será abordada a metodologia experimental proposta para a caracterização e análise das propriedades mecânicas de surfactantes, conforme segue:

4.1 Sistema geral para a medição da tensão superficial:

4.1.1 Caracterização física da balança de Wilhelmy;

4.1.2 Controle de temperatura;

4.1.3 Controle e aquisição de dados;

4.1.4 Análise e processamento dos dados.

4.2 Protocolo proposto para medição da tensão superficial;

4.3 Medição da tensão superficial;

4.4 Análise do Trabalho (J)

4.4 Ajuste Matemático

4.5 Análise estatístico

4.1 Sistema geral para a medição da tensão superficial

Na Figura 14 encontra-se o esquema com todas as partes que compõem o sistema e na Figura 15, a foto que mostra como foi montado o sistema para a medição da tensão superficial.

Figura 14. Representação do sistema geral da medição da tensão superficial

Figura 15. Representação do sistema geral para medição da tensão superficial montado no Laboratório localizado no Instituto Butantan

4.1.1 Caracterização física da balança de Wilhelmy

Para a aquisição dos dados foi utilizada a balança de Wilhelmy de alta precisão, modelo *Langmuir Troughs Medium 1000 IUD*, KSV NIMA, Finlândia.

Este equipamento, mostrado na Figura 16, consiste de:

- a) painel de controle;
- b) transdutor de força;
- c) bandeja de teflon hidrofóbica;
- d) barreiras móveis hidrofílicas;
- e) placa de platina.

Figura 16. Balança de Wilhelmy para medição da tensão superficial (Lagmuir Troughs Medium 1000 IUD, KSV Nima 1000 IUD, Finlândia)

Partes principais da balança de Wilhelmy

Transdutor de força e placa de platina

O transdutor de força mede a tensão superficial por meio de uma placa de platina geométrica retangular, que fica suspensa verticalmente. O lado inferior da placa é colocado em contato (horizontalmente) com a superfície do líquido. Logo é

exercida uma força vertical sobre a placa para levantá-la, conforme observado no esquema da Figura 17.

Fonte: <http://163.178.205.6/boletin/boletin108/Palabras1.html>, (2013).

Figura 17. Representação da placa de platina submersa em um líquido, nela observa-se a força do líquido agindo sobre a placa

A placa apresenta as dimensões seguintes: 29.9 mm de largura, 16 mm de comprimento, 0.1 mm de espessura e 60 mm de perímetro total, e é levemente rugosa. A placa também pode ser feita de vidro, quartzo ou papel filtro (Gaines et al., 1977). Ela trabalha pendurada e um terço da sua área total fica imersa no líquido (subfase) conforme mostra a Figura 18.

Figura 18. Placa de platina imersa na subfase

Bandeja de teflon

A bandeja é composta por dois tipos de materiais na parte superior, na qual se deposita a subfase (no caso água ultrapura ou solução salina) de teflon*. Esse material possui propriedades hidrofóbicas, que impedem que a subfase transborde. O teflon* fica aderido a uma placa de alumínio e nesta existe um sistema de válvulas externas que permitem a entrada e saída do líquido, conforme mostra a Figura 19.

A bandeja mede 90 mm de largura por 380 mm de comprimento com profundidade de 6.2 mm, com área total de 27.375 mm^2 e capacidade total de 180 mL, conforme mostra a Figura 19.

Figura 19. Representação da bandeja de teflon na qual é depositada a subfase e a amostra cuja tensão superficial será medida

Barreiras móveis

As barreiras são fabricadas com polímero polyacetal*, com propriedades hidrofílicas e suficientemente pesado para impedir o transbordamento do filme. As barreiras manipulam a área de superfície por compressão e expansão do filme, durante a medida da tensão superficial, conforme mostra a Figura 20.

Figura 20. Representação das barreiras móveis

A Figura 21 mostra a área máxima e área mínima de abertura e fechamento das barreiras na superfície total da bandeja.

Figura 21. Área máxima e área mínima de abertura e fechamento das barreiras na superfície total da bandeja

4.1.2 Controle de temperatura

Para controlar a temperatura do líquido dentro da bandeja foi montado um sistema, composto por banho Maria que mantinha a temperatura constante em 37°C. Para que o líquido circulasse pelo sistema foi colocada uma bomba de submersão

dentro do banho Maria e as mangueiras foram conectadas entre a bomba e a bandeja, conforme se observa na Figura 22.

Figura 22. Representação do sistema geral para o controle e manutenção da temperatura a 37°C

4.1.3 Análises e processamento dos dados

Para a avaliação dos dados registrados em cada experimento foi utilizado o *Software* da balança de Wilhelmy KSV *SGserve*, os dados foram analisados em ambiente MATLAB® (versão 7.10.0.499 R2010a, *The MathWorks, Inc., EUA*). Neste ambiente foi quantificado o Trabalho (J) e realizado o ajuste matemático dos dados em M-linguagem de MATLAB® e posteriormente se realizou a análise estatística utilizando as ferramentas do Excel.

4.2 Protocolo proposto para medição de tensão superficial

4.2.1 Material e instrumentação

O material e a instrumentação utilizados estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de equipamentos, materiais e reagentes utilizados na experimentação

Material / Instrumentação	Especificações (Marca)
Computador	Dell
Balança de Wilhelmy	KSV Minitrough (15)
Banho Maria/regulador de temperatura	LabLine
Luvas de nitrilo sem pó	Safe Skin
Micro pipeta ou micro seringa	Eppendorf/ Hamilton
Termômetro	Ciencor
Bico de Bunsen	Labbio
Água ultrapura	Millipore
Solução salina	ao 0.9% (ADV®)
Clorofórmio	Merck
Etanol	92.8 % Merck

4.2.2 Procedimentos experimentais

Os primeiros passos experimentais se seguiram de acordo ao procedimento indicado no manual da balança de Wilhelmy como se segue a continuação:

Primeiramente conectam-se os cabos da balança de Wilhelmy no computador, em seguida espera-se 15 minutos para atingir o equilíbrio térmico. Em seguida lava-se a bandeja e as barreiras, primeiro com água e sabão, e depois com uma quantidade abundante de etanol a 92.8 %, e após cada lavagem enxagua-se com água ultrapura.

A placa de platina deve ser mergulhada em etanol a 92.8 % e depois queimada em um bico de Bunsen, ou similar. É fundamental que a bandeja, as barreiras e placa de platina estejam muito bem limpas, e esta é das fases mais críticas do procedimento, pois a presença de qualquer sujeira altera a medida da tensão superficial.

Após a limpeza coloca-se a bandeja no suporte da balança de Wilhelmy, nela se depositam 175 mL de água ultrapura ou solução salina.

A água ultrapura pode-se obter a partir de um sistema Direct-Q 3 (Millipore, EUA), com uma resistividade de 18,2 M Ω .cm para comprovar sua pureza. A solução salina (NaCl 0,9 %) foi adquirido (ADV, Brasil).

A seguir posicionam-se as barreiras sobre a subfase. Pendura-se a placa de platina no transdutor de força, que ficará submersa em um terço de sua área total na subfase. Em seguida deixa-se estabilizar a placa por 10 minutos e remove-se da superfície a primeira camada de água, com uma micropipeta para garantir a limpeza antes de iniciar o procedimento.

O programa do software da KSV chamado *SGserve* é aberto, aparece uma primeira tela chamada de *Manual Control Unit*, conforme observado no Apêndice 1.

4.2.3 Medição da tensão superficial

Inicialmente foram realizadas medidas da tensão superficial de água ultrapura 18 Ω e solução salina a 0.9 %, tendo como padrão o valor citado na literatura de 70 mN/m a 37°C (Hills, 1979) (Hills, 1981) (Hills, 1982) (Georke, 1982) (Hills, 1999) (Mohammadi, 2006). Esta medição realizasse para verificação do valor da tensão superficial a 37°C e também para verificação da limpeza da água. Se a variação da tensão superficial estiver menor que 70.3 mN/m, sabe-se que essa água ou placa de platina estão sujos, assim será necessário iniciar novamente todo o procedimento de limpeza, como descrito acima. Os valores registrados da tensão superficial tanto da água ultrapura como da solução salina estão descritos no seguinte capítulo.

Ao se constatar que a água ultrapura ou a solução salina e a placa de platina estão limpas inicia-se o experimento com as amostras de surfactante. Para a medição

do surfactante, primeiramente é necessário deixá-lo a temperatura ambiente. A retirada da amostra de surfactante é feita por uma microseringa, para torná-lo uma solução com melhor espalhamento é acrescentado clorofórmio em quantidades especificadas na Tabela 4, e esta solução é depositada sobre a subfase na bandeja.

Para executar as medições neste estudo, foram preparadas soluções com Curosurf[®] (solução 1) e Survanta[®] (solução 2) nas concentrações seguintes: 0.5 mg/mL; 2 mg/mL e 8 mg/mL. A solução de surfactante diluído em clorofórmio (solvente) foi colocada sobre a bandeja com um volume constante de 100 µL, para cada concentração como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Diluição de Curosurf[®] e Survanta[®] em clorofórmio em diferentes concentrações.

Concentração do surfactante (mg/mL)	ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DO FILME				Volume da Solução filme (µL)
	SOLUÇÃO 1 (µL) Curosurf® Solvente		SOLUÇÃO 2 (µL) Survanta® Solvente		
0.5	0.6	99.4	2	98	100
2	2.5	97.5	8	92	100
8	10	90	32	68	100

Assim que a solução de surfactante e clorofórmio foi depositada sobre a superfície de água ultrapura da bandeja, iniciou-se a ciclagem das barreiras da balança.

Foram utilizadas duas velocidades no intuito de comparar o comportamento do surfactante em baixa e alta velocidade e os valores escolhidos foram: 50 mm/min e 120 mm/min.

Uma vez estabilizada a superfície, a medição da tensão superficial foi realizada obtendo-se uma curva de histerese, como mostra a Figura 23.

Figura 23. Representação da medição da tensão superficial em função da área de superfície

4.2.4 Quantificação do Trabalho (J)

Em uma curva de histerese pode se medir o Trabalho (J) como a quantidade de energia necessária para diminuir a energia livre de superfície, e é representado pela área interna da curva. Em outras palavras o trabalho é calculado pela subtração da área da curva de expansão pela área da curva de compressão.

4.2.5 Ajuste exponencial:

Para nossos experimentos, o Trabalho (J) foi calculado para cada ciclo (c) e os dados obtidos dessa análise foram ajustados a uma curva exponencial utilizando Matlab®.

4.2.6 Análise estatística

O teste t de *Student* foi utilizado para verificar a significância estatística para comparar a diferença entre os parâmetros exponenciais de cada ajuste. Adotou-se significância estatística para $p < 0,05$.

A figura 24 representa um esquema das etapas realizadas para a quantificação e análises da tensão superficial.

Figura 24. Representação gráfica das etapas da quantificação da tensão superficial

4.3 Limitações do equipamento

Mediante a sensibilidade do equipamento pode-se observar dois tipos de situação: a primeira vinculada à estabilidade do equipamento a choques e a segunda vinculada às altas concentrações de surfactante no filme, o que está explicado abaixo.

A primeira situação observada é mostrada na Figura 25, nela nota-se no círculo vermelho um ponto totalmente fora do padrão das retas que se apresentam na medida da tensão superficial no momento da calibração. Isto ocorre por causa da sensibilidade do equipamento a qualquer movimentação, nele ou próximo a ele. Por isso, deve-se preservar a área da medição de qualquer alteração ou vibração e esse cuidado deve ser tomado em todas as fases da medição, pois isso altera totalmente o resultado na análise dos dados. Dessa forma, assim que se notar esse comportamento anormal em um gráfico, esse dado deve ser desprezado.

Figura 25. O círculo vermelho mostra o dado a ser desprezado da representação gráfica

O segundo comportamento é observado para altas concentrações de surfactante. Na Figura 26, no círculo vermelho a seta indica uma queda abrupta na tensão superficial. Esse comportamento errático na curva de histerese ocorre pela formação de multicamadas no filme, denominadas por Hills (1999) de camadas oligolaminares e isso pode acontecer tanto na expansão como na compressão.

Figura 26. Representação de uma curva de histerese, no círculo vermelho observa-se o decaimento da tensão superficial do Curosurf[®] em água ultrapura a 8 mg/mL

Para confirmar esses comportamentos entrou-se em contato com o fabricante da balança, que explicou que esses valores incompatíveis de grandeza aparecem quando a calibração não é executada corretamente ou quando o equipamento não se encontra eletronicamente estabilizado, por uma interferência do ambiente externo. Essas informações obtidas da KSV corroboram com os resultados obtidos mostrados no capítulo 4 desta dissertação.

5 RESULTADOS

5.1 Medição da tensão superficial

O gráfico da tensão superficial por área esta representado por duas linhas quase retas. Apresenta este comportamento, pois não ocorre alteração da tensão superficial. Isso significa que não apresenta contaminantes tais como poeira, resíduo de detergente, lipídios, dentre outros. Tanto para a água ultrapura como para a solução salina, determinou-se que a subfase está apta a realizar medidas de tensão superficial com surfactantes exógenos.

Figura 27. Representação da medição da tensão superficial da água ultrapura e da solução salina a 0.9 %. Estas medidas demonstraram a limpeza do equipamento e o calibram para realizar as medidas com surfactantes exógenos

5.2 Testes com surfactantes exógenos

Comparou-se as medidas de tensão superficial dos surfactantes comerciais Curosurf® (porcino) e Survanta® (bovino).

5.2.1 Efeito das subfases e velocidades

Neste experimento avaliou-se o efeito das subfases para Curosurf®, em diferentes concentrações: 0.5 mg/mL, 2 mg/mL e 8 mg/mL utilizando água ultrapura e solução salina, velocidade de 50 mm/min e 120 mm/min, conforme observado nas Figuras 28 e 29.

Figura 28. Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Curosurf em diferentes concentrações e diferentes subfases a uma velocidade de 50 mm/min

Figura 29. Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Curosurf[®] a diferentes concentrações, diferentes subfases e a uma velocidade de 120 mm/min

Neste experimento avaliou-se o efeito das subfases para Survanta[®], nas concentrações de 0.5 mg/mL, 2 mg/mL e 8 mg/mL, utilizando-se água ultrapura e solução salina, velocidade de 50 mm/min e 120 mm/min, conforme observado nas Figuras 30 e 31.

Figura 30. Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Survanta[®] em diferentes concentrações e diferentes subfases

Figura 31. Representação gráfica das curvas de histerese, obtidas com Survanta® em diferentes concentrações e diferentes subfases a uma velocidade de 120 mm/min

Na Figura 32, no círculo vermelho a seta indica uma queda abrupta na tensão superficial. Esse comportamento errático na curva de histerese ocorre pela formação de multicamadas no filme, denominadas por Hills (1999) de camadas oligolaminares e isso pode acontecer tanto na expansão como na compressão.

Figura 32. Representação de uma curva de histerese, no círculo vermelho observa-se o decaimento da tensão superficial do Curosurf[®] em água ultrapura a 8 mg/mL

5.2.2 Quantificação de trabalho em curva de histerese

Em uma curva de histerese pode-se quantificar o trabalho (J). Este parâmetro foi calculado em ambiente Matlab[®] e este valor corresponde à área interna entre uma compressão e uma expansão. O trabalho é definido como a diferença das energias da superfície durante a expansão e a compressão. A energia da superfície é calculada pela tensão superficial aplicada sobre uma área. No esquema da Figura 33 indica-se a região na qual são obtidos os valores de trabalho (J) em uma curva de histerese.

Figura 33. Ilustração de uma curva de histerese, representando o Trabalho (J) em uma compressão e uma expansão

O cálculo do trabalho foi realizado para quantificar a atividade do surfactante na superfície, tanto para água ultrapura como para solução salina. Foi testado em duas velocidades: 50 mm/min e 120 mm/min e em três concentrações diferentes: 0.5 mg/mL, 2 mg/mL e 8 mg/mL.

Os gráficos das Figuras 34 e 35 representam a media das três repetições executadas para cada concentração.

Figura 34. Representação gráfica das medidas do trabalho e o desvio padrão para o Curosurf em água ultrapura e solução salina para as velocidades de 50 mm/min e 120 mm/min

Figura 35. Representação gráfica das medidas do trabalho e o desvio padrão para o Survanta em água ultrapura e solução salina para as velocidades de 50 mm/min e 120 mm/min

Os dados obtidos na análise do trabalho mostraram uma tendência de decaimento. Esse comportamento pode ser ajustado matematicamente por uma função exponencial. O modelo exponencial é utilizado para caracterizar e quantificar, por meio de constantes matemáticas, o comportamento do surfactante pulmonar em condições experimentais.

5.3 Ajuste exponencial

O ajuste matemático foi realizado utilizando o comando de ajuste de curva em ambiente Matlab[®]. As curvas exponenciais são um grupo de funções matemáticas e neste estudo representam o comportamento do trabalho por ciclo, como mencionado anteriormente. Um ciclo é determinado por uma compressão e uma expansão, esta função está determinada pela seguinte equação:

$$T(c) = a + be^{-kc} \quad (2)$$

onde, a representa o trabalho por ciclo em regime permanente, desta forma representa a tendência dos dados; b representa a diferença entre o trabalho dos ciclos iniciais que se encontram em regime transientes, isto é, que mudam com o tempo e que com respeito aos últimos ciclos se encontram em regime permanente, isto é, que permanecem constantes no tempo. Portanto, se b é menor significa que existe uma recuperação maior ou re-espalhamento do surfactante na superfície da subfase. Mas se o valor é maior poderia se inferir que exista uma perda de surfactante durante os

ciclos iniciais e provavelmente menor recuperação das moléculas de surfactante a medida que aumenta o numero de ciclos. Já $\bar{k}$ representa a velocidade de decaimento do trabalho por cada ciclo. Quanto menor for o $\bar{k}$ ao compará-lo em condições similares, pode-se inferir que as moléculas do surfactante estão se re-espalhando com maior facilidade durante a expansão.

Na Figura 36 são mostrados os gráficos obtidos do ajuste exponencial para o Curosurf® e Survanta em solução salina. Pode-se observar que a uma concentração de 0.5 mg/mL todos os pontos se ajustam à função exponencial, já para as concentrações de 2 e 8 mg/mL os dados não se ajustam a uma função exponencial deixando pontos fora da curva.

Figura 36. Representação do ajuste exponencial, Equação 2, para Curosurf® e Survanta® para 0.5 mg/mL, medidas de um conjunto de ciclos para esta concentração

Quando os dados do ajuste matemático foram obtidos, observou-se que a aproximação exponencial somente seria aplicada para concentrações baixas. Já para concentrações altas os valores não seguiam uma tendência exponencial. Portanto, não se pode utilizar comando de ajuste de curva.

Com o ajuste exponencial foram obtidos os parâmetros a , b e k , e também foi obtido o coeficiente de correlação, que mede o grau de efetividade do ajuste.

Para as concentrações 0.5 mg/mL o coeficiente de correlação foi de 0.90 ± 0.16 , para 2 mg/mL foi de 0.83 ± 0.23 e para 8 mg/mL foi de 0.51 ± 0.33 . Este coeficiente pode variar entre os valores 0 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação com a curva utilizada e o valor 1 indica uma relação perfeita.

Só foi possível considerar o resultado para a concentração de 0.5 mg/mL, nele o ajuste representa a progressão dos trabalhos ao longo dos ciclos, mas não para as concentrações de 2 mg/mL e 8 mg/mL. Pois na concentração 2 mg/mL o ajuste ficou inferior a 1 de tal forma que muitos pontos ficaram fora da curva. Já para a concentração 8 mg/mL, o mais provável é que tenha apresentado o comportamento semelhante ao que acontece na Figura 32, que é explicado pela formação de camadas oligolaminares.

Foram realizadas, então, 10 repetições somente para a concentração de 0.5 mg/mL, nas mesmas condições experimentais, isto é, diferentes subfase (água ultrapura e solução salina) e velocidade (50 mm/min e 120 mm/min).

Além do ajuste exponencial para cada condição, foi realizada a análise estatística utilizando-se o *t-test* para correlacionar os dados entre si.

5.3.1 Análises das velocidades

Os dados obtidos pela análise referente às diferentes velocidades estão nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em água ultrapura em diferentes velocidades

Parâmetros	Curosurf® AMQ 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Curosurf® AMQ 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	312.018±145.156	393.983±110.374	0.173
<i>b</i>	3872.19±2268.83	128639.328±296243.644	0.215
<i>k</i>	0.882±0.34	2.17±1.847	0.055

Tabela 6. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em solução salina em diferentes velocidades

Parâmetros	Curosurf® SS 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Curosurf® SS 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	228.485±306.05	445.393±264.33	0.10
<i>b</i>	10718.08±23640.74	2589.15±1051.87	0.30
<i>k</i>	0.52±0.60	0.46±0.27	0.76

Tabela 7. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survantã® em água ultrapura em diferentes velocidades

Parâmetros	Survanta® AMQ 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® AMQ 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	312.102±76.14	298.501±101.26	0.738
<i>b</i>	4852.03±1126.73	16784.54±11718.62	0.010
<i>k</i>	1.508±0.88	1.573±0.59	0.851

Tabela 8. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survantã® em solução salina em diferentes velocidades

Parâmetros	Survanta® SS 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® SS 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	429.79±117.14	445.77±135.63	0.781
<i>b</i>	4224.52±650.30	2589.15±1051.87	0.085
<i>k</i>	0.551±0.13	0.656±0.38	0.432

5.3.2 Análises das subfases

Os dados obtidos por análise referente às diferentes subfases estão nas Tabelas 9, 10, 11 e 12.

Tabela 9. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em subfases diferentes e velocidades iguais.

Parâmetros	Curosurf AMQ 50 mm/min (Média±Desvio-padrão) (n=10)	Curosurf SS 50 mm/min (Média±Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
a	312.018±145.156	228.485±306.05	0.449
b	3872.19±2268.83	10718.08±23640.74	0.385
k	0.882±0.34	0.52±0.60	0.131

Tabela 10. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® em subfases diferentes e velocidades iguais.

Parâmetros	Curosurf AMQ 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Curosurf SS 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
a	393.983±110.374	445.393±264.33	0.580
b	128639.328±296243.644	2589.15±1051.87	0.211
k	2.17±1.847	0.46±0.27	0.009

Tabela 11. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survanta® em velocidades iguais e subfases diferentes.

Parâmetros	Survanta® AMQ 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® SS 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
a	312.102±76.14	429.79±117.14	0.017
b	4852.03±1126.73	4224.52±650.30	0.148
k	1.508±0.88	0.551±0.13	0.007

Tabela 12. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Survanta® em subfases diferentes e velocidades iguais.

Parâmetros	Survanta® AMQ 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® SS 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
a	298.501±101.26	445.77±135.63	0.013
b	16784.54±11718.62	2589.15±1051.87	0.019
k	1.573±0.59	0.656±0.38	0.0009

5.3.3 Análises entre Surfactantes

5.3.3.1 Subfases

Os dados obtidos por análise referente às diferentes subfases entre os surfactantes estão nas Tabelas 13, 14, 15 e 16.

Tabela 13. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e Survanta® em subfases e velocidades iguais.

Parâmetros	Curosurf® AMQ 50 mm/min (Média±Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® AMQ 50 mm/min (Média±Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	312.018±145.156	312.102±76.14	0.998
<i>b</i>	3872.19±2268.83	4852.03±1126.73	0.242
<i>k</i>	0.882±0.34	1.508±0.88	0.060

Tabela 14. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e Survanta® em subfases e velocidades iguais.

Parâmetros	Curosurf® AMQ 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® AMQ 120 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	393.983±110.374	298.501±101.26	0.059
<i>b</i>	128639.328±296243.644	16784.54±11718.62	0.263
<i>k</i>	2.17±1.847	1.573±0.59	0.348

Tabela 15. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e Survanta® em subfases e velocidades iguais.

Parâmetros	Curosurf® SS 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® SS 50 mm/min (Média ± Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	228.485±306.05	429.79±117.14	0.076
<i>b</i>	10718.08±23640.74	4224.52±650.30	0.912
<i>k</i>	0.52±0.60	0.551±0.13	0.348

Tabela 16. Dados obtidos na análise do ajuste exponencial para o Curosurf® e o Survanta® em subfases e velocidades iguais.

Parâmetros	Curosurf® SS 120 mm/min (Média±Desvio-padrão) (n=10)	Survanta® SS 120 mm/min (Média±Desvio-padrão) (n=10)	Significância estatística p
<i>a</i>	445.393±264.33	445.77±135.63	0.996
<i>b</i>	2589.15±1051.87	6204.02±3200.68	0.006
<i>k</i>	0.46±0.27	0.656±0.38	0.218

Todos os resultados do presente estudo foram reunidos em artigo submetido para a revista *International Journal of Pharmaceutics* (Apêndice 2).

6 DISCUSSÃO

Para este estudo realizamos diferentes condições experimentais para poder analisar o comportamento do surfactante em diferentes velocidades de barreira e subfases. Em todas estas condições, foi necessária a utilização do clorofórmio como solvente orgânico, razões já discutidas na revisão da literatura e nos experimentos realizados na balança de Wilhelmy.

Para interpretar o ajuste exponencial dos dados para uma concentração de 0.5 mg/mL, é necessário correlacionar o Trabalho realizado por cada ciclo. Devido o efeito do surfactante na interface, na compressão normalmente diminui a tensão superficial, uma vez que aumenta progressivamente a densidade de surfactante. Na expansão teria o efeito inverso. Devido ao excesso de surfactante na interface, parte do surfactante deixa a interface durante a compressão e entra no volume da subfase, sendo recuperado durante a expansão. O Trabalho (J) em um ciclo seria diretamente relacionado à diferença na quantidade de surfactante na interface durante a compressão e na expansão. Assim, no ajuste exponencial, o parâmetro a pode ser correlacionada com a recuperação do surfactante durante a expansão, ou, em outras palavras, a mobilidade do surfactante durante o ciclo. O decaimento de trabalho ao longo dos ciclos pode ser interpretada como proporcional à perda não recuperável do surfactante em cada ciclo. Para o ajuste exponencial, isto significa que um b e um k inferior pode estar relacionada com uma melhor recuperação e o espalhamento do surfactante na interface da subfase. Todos os parâmetros para o ajuste exponencial foram usadas para comparar as propriedades de surfactante sob diferentes velocidades de barreira e subfases.

A velocidade foi um parâmetro no qual se conseguiu quantificar a capacidade de recuperação do surfactante, junto aos parâmetros do ajuste matemático, ela é melhor visualizada no parâmetro $\hat{b}$ do Survanta®, que possui uma significância estatística de 0.010, em água ultrapura a 50 mm/min e 120 mm/min. Na velocidade de 120 mm/min foi mais fácil verificar o efeito do espalhamento.

Uma explicação para esse fato pode ser de que o movimento mais rápido impõe um período mais curto para a recuperação do surfactante durante a expansão. Assumindo que a recuperação do surfactante é uma propriedade constante do sistema, composto pela subfase do surfactante. Uma velocidade muito baixa das barreiras não permitiria qualquer observação de recuperação ao longo do tempo. A capacidade para observar as diferenças na perda de surfactante, entre as velocidades das barreiras, é uma indicação de que o intervalo de tempo de recuperação do surfactante é comparável com o tempo de expansão para essas velocidades.

A capacidade para observar diferenças na perda de surfactante entre as velocidades de barreira é uma indicação de que o intervalo de tempo de recuperação de surfactante é comparável com o tempo de expansão para essas velocidades. A velocidade elevada de barreira foi capaz de diferenciar melhor propriedades surfactantes sob as mesmas condições: cinco parâmetros exponenciais foram significativamente diferentes com uma velocidade de 120 mm min⁻¹, mas apenas dois de 50 mm/min.

Já para a água ultrapura, é mais difícil realizar o espalhamento porque não contem íons que ajudem os lipídios a formar o filme, para a solução salina, observou-

se que existe um melhor espalhamento dos lipídios, demonstrou-se com os dados obtidos pelo ajuste matemático.

Quando o surfactante estiver em uma subfase salina, ocorrerá o aumento do parâmetro a indicando uma mobilidade maior do surfactante e uma diminuição nos parâmetros b e k indicando uma melhoria na recuperação do surfactante. Observa-se, na Tabela 11, o valor de k para o Survanta® em água ultrapura é de 1.50 ± 0.88 e em solução salina de 0.55 ± 0.13 com uma significância estatística de $p < 0.007$. Na Tabela 12 o valor de k para o Curosurf® em água ultrapura é de $2,17 \pm 1,8$ e em solução salina 0.46 ± 0.27 , com uma significância estatística de $p < 0.009$. Nessas duas situações com a solução salina obteve-se o valor mais baixo, concluindo-se que exista uma maior facilidade de espalhamento das moléculas do surfactante na superfície da subfase e, portanto, uma melhor recuperação das moléculas para a interfase.

Algumas limitações do estudo estão relacionadas com a viscosidade dos surfactantes. O curosurf é mais viscoso que o Survanta, é importante relatar que a replicação dos experimentos com Curosurf® fica mais difícil, pois sua viscosidade é maior, comparada ao Survanta®. Ao se coletar uma amostra diluída em clorofórmio, a maior viscosidade do Curosurf® dificulta a retirada com a micropipeta, dessa forma não existindo a garantia que a quantidade é sempre a mesma. Assim, para amostras menores que 0.5 mg/mL, a quantidade coletada poderia ser inadequada e reportar valores de tensão superficial inconsistentes, já que a leitura da tensão é válida, mas não é a esperada.

Outra fonte de imprecisão na execução dos experimentos está ligada à rápida evaporação do clorofórmio. Isso exige rapidez e perícia de quem está executando o experimento, pois se houver demora no processo, ocorrerá a evaporação do clorofórmio e assim o surfactante ficará mais concentrado, o que dificultará o seu espalhamento sobre a subfase podendo ocorrer até precipitações com formação de vesículas.

7 CONCLUSÕES

Este estudo comparou os métodos já descritos na literatura para a utilização da balança de Wilhelmy na medição da tensão superficial com surfactantes exógenos e endógenos, buscando a padronização do protocolo e minimizando as flutuações nas medidas, de forma que os dados obtidos sejam reproduzíveis.

Reproduziram-se as condições mais próximas das fisiológicas em diferentes condições experimentais, utilizando-se temperatura controlada a 37°C e solução salina na subfase da balança.

A uma concentração de 0.5 mg/mL, a uma velocidade de barreira a 120 mm/min, em solução salina e com a utilização do clorofórmio se obteve uma melhor mobilidade e recuperação do surfactante na interface ar-líquido.

Apresentou-se um protocolo experimental para caracterização e análise das propriedades mecânicas dos surfactantes exógenos utilizando-se a balança de Wilhelmy. Utilizou-se esse protocolo para comparar dois surfactantes comerciais exógenos, em duas velocidades e subfases diferentes. Ajustando o trabalho do ciclo a uma curva exponencial.

Com a adaptação do protocolo para a utilização do clorofórmio como solvente orgânico do surfactante, além de diminuir a quantidade da amostra, houve uma melhora no espalhamento sobre a subfase. No início eram utilizados entre 200 μ L e 600 μ L, e com o uso do clorofórmio passou-se a utilizar entre 1 μ L e 10 μ L.

Quanto à comparação dos surfactantes comerciais, o Curosurf[®] apresentou uma melhor capacidade e facilidade de espalhamento em relação ao Survanta[®]. Na solução salina e velocidade das barreiras a 120 mm/min, o Curosurf[®] mostrou o parâmetro b inferior ao do Survanta[®], conforme mostra a Tabela 16. Isso indica que a perda de surfactante não recuperável vai diminuindo ao longo dos ciclos.

Concluimos que a metodologia desenvolvida aqui pode ser utilizada para avaliação de propriedades físicas de surfactantes, podendo ser útil para o desenvolvimento e quantificação de surfactantes. Em todos os casos, estudos em modelos animais e clínicos são necessários para comprovar a verdadeira eficácia em terapias de reposição de surfactantes.

REFERÊNCIAS

- Adam NK. *The physics and chemistry of surfaces*. New York: Dover Publications 1968.
- Adamson AW, Gast AP. *Physical Chemistry of surfaces*. 6th ed. New York: Wiley-Interscience 1997.
- Alencar AM, Arold SP, Buldyrev SV, Majumdar A, Stamenovic D, Stanley HE, Suki B. Dynamic instabilities in the inflating lung. *Nature*. 2002;417:809-11.
- Alencar AM, Buldyrev SV, Majumdar A, Stanley HE, Suki B. Avalanche dynamics of crackle sound in the lung. *Physical Review Letters*. 2001; 87.
- Alencar AM. *Criticalidade e fenômenos de transporte em estruturas ramificadas* [tese]. São Paulo:Universidade Federal do Ceará;1999.
- Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RD, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CRR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1998;338:347-54.
- Archer RJ, La Mer VK. The rate of evaporation of water through fatty acid monolayers. *The Journal of Physical Chemistry*. 1955;59:200-8.
- Avery M E, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 1959;97: 517.
- Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child*. 1959;97:517-23.
- Banerjee R, Bellare JR. Scoring of surface parameters of physiological relevance to surfactant therapy in respiratory distress syndrome. *Journal of Applied Physiology*. 2001;90:1447-54.
- Baoukina S, Teleman DP. Lung surfactant protein SP-B Promotes Formation of Bilayer Reservoirs from Monolayer and Lipid Transfer between the Interface and Subphase. *Biophysical Journal*. 2011;100: 1678-87.
- Barrow RE, Hills BA. A critical assessment of the Wilhelmy method in studying lung surfactants. *J. Physiol*. 1979;295: 217-27.
- Bates JH. *Lung Mechanics: an inverse modeling approach*. New York: Cambridge University Press; 2009.

- Baughman RP, Sternberg RI, Hull W, Buchsbaum JA, Whitsett J. Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:653-7.
- Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowsky H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitsma JJ, Freihorst J, von der Hardt H, Poets CF. Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;25:725-31.
- Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, Van Eijk ME, Von der Hardt, H. Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1997;17:41-50.
- Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, Von der Hardt, HORST, Poets CF. Commercial versus native surfactants: surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162:1524-1533.
- Blanco O, Catala A. Surfactant protein A inhibits the non-enzymatic lipid peroxidation of porcine lung surfactant. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2001;65:185-190.
- Blanco O, Pérez-Gil J. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: Role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. *European Journal of Pharmacology*. 2007;568:1-15.
- Bland R. Formation of fetal lung liquid and its removal near birth. In: Polin and Fox. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2000; 1047-1054.
- Blodgett KB. 1935, J. Amer. Chem. Soc., 57, 1067.
- Bloom BT, Kattwinkel J, Hall RT, Delmore PM, Egan EA, Trout JR, Malloy MH, Brown DR, Holzman IR, Coghill CH, Carlo WA, Pramanik AK, McCaffree MA, Toubas PL, Laudert S, Gratny LL, Weatherstone KB, Seguin JH, Willett LD, Gutcher GR, Mueller DH, Topper WH. Comparison of Infasurf (calf lung surfactant extract) to Survanta (Beractant) in the treatment and prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1997;100:31-38.
- Brackenbury AM, Puligandla PS, McCaig LA, Nikore V, Yao LJ, Veldhuizen RA, Lewis JF. Evaluation of exogenous surfactant in HCL-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163:1135-1142.
- Brockman JM, Wang Z, Notter RH, Dluhy RA. Effect of hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C on binary phospholipid monolayers: II. Infrared external reflectance-absorption spectroscopy. *Biophysical journal*. 2003;84:326-340.
- Brodsky D. *Neonatology review*. Philadelphia: Hanley and Belfus; 2003. p.46-47.

- Casals, C., Cañadas, O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2012: 1818-11.
- Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri M, Quintel M, Russo SG, Gattinoni L. Lung opening and closing during ventilation of acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181:578-86.
- Christmann, U., et al. "Role of lung surfactant in respiratory disease: Current knowledge in large animal medicine." *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2009: 227-242.
- Christmann U, Buechner-Maxwell VA, Witonsky SG, Hite RD. Role of lung surfactant in respiratory disease: Current knowledge in large animal medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2009;23:227-242.
- Clements J. Surface tension of lung extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957; 95:170-72.
- Clements J. Surface phenomena in relation to pulmonary function. *Physiologist*. 1962;5:11-28.
- Detrich A, Deák A, Hild E, Kovács AL, Hórvölgyi Z. Langmuir and Langmuir–Blodgett Films of Bidisperse Silica Nanoparticles. *Langmuir*. 2009;26:2694-9.
- Dervichian D. A New Technique for the Spreading of Proteins and the Spreading Number. *Nature*. 1939;144:629-30.
- Doménech Martínez E, Fuster Jorge P, León Quintana C, Cortabarría Bayona C, Castro Conde JR, Méndez Pérez A. Morbilidad y mortalidad de los recién nacidos según el patrón de crecimiento intrauterino. *An Pediatr (Barc)*. 2005;63:300-6.
- Dushianthan A, Grocott MPW, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgraduate Medical Journal*. 2011;87:612-22.
- Dynarowicz-Łątka P, Dhanabalan A, Oliveira J. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in colloid and interface science*. 2001; 91:221-293.
- Enhörning G, Holm BA. Disruption of pulmonary surfactant's ability to maintain openness of a narrow tube. *Journal of Applied Physiology*. 1993;74:2922-2927.
- Enhörning G. Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *Journal of applied physiology*. 1977;43:198-203.

- Fanaroff AA, Wright LL, Stevenson DK, Shankaran S, Donovan EP, Ehrenkranz RA, Younes N, Korones SB, Stoll BJ, Tyson JE, Bauer CR, Oh W, Lemons JA, Papile LA, Verter J. Very-low-birth-weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, May 1991 through December 1992. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;173:1423-1431.
- Fanaroff A, Martin R. *The respiratory system. Neonatalperinatal medicine*. Philadelphia, PA: Mosby; 1992.
- Ferreira M. Z. F. Estudo da aplicação de ondas sonoras na árvore pulmonar de roedores, *Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas*, Brasil, 2012.
- Freites JA, Choi Y, Tobias DJ. Molecular dynamics simulations of a pulmonary surfactant protein B peptide in a lipid monolayer. *Biophysical Journal*. 2003;84:2169-80.
- Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet*. 1980;1:55-9.
- Gaines GL, Richard WR. Evaporation of Langmuir–Blodgett Monolayers in Vacuum. *Nature*. 1963;197:787.
- Gaines GL. On the use of filter paper Wilhelmy plates with insoluble monolayers. *J. Colloid Interface Sci*. 1977;62:191-2.
- Glick PL, Stannard VA, Leach CL, Rossman J, Hosada Y, Morin FC. Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia II: the fetal lamb CDH model is surfactant deficient. *J. Pediatr Surg* 1992;27:382-8.
- Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1408:79-89.
- Goerke J. Lung surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1974;344:241-61.
- Goerke J, Clements JA. Alveolar surface tension and lung surfactant. *Comprehensive Physiology*. 1986.
- Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *European Respiratory Journal*. 1999;13:1455-76.
- Gruenwald P. Surface tension as a factor in the resistance of neonatal lungs to aeration. *Am J Obstet Gynecol*. 1947;53:996-1001.

- Gupta M, Hernandez-Juviel JM, Waring AJ, Bruni R, Walther FJ. Comparison of functional efficacy of surfactant protein B analogues in lavaged rats. *European Respiratory Journal*. 2000;16:1129-33.
- Gwaltney JM. Acute bronchitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2005:58.
- Halliday HL, Speer CP, Robertson B. Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant. *Eur J Pediatr*. 1996;155:1047-51.
- Hantos Z, Tonai J, Asztalos T, Petak F, Adamicza A, Alencar AM, Majumdar A, Suki B. Acoustic evidence of airway opening during recruitment in excised dog lungs. *Journal of Applied Physiology*. 2004;97:592-8.
- Harkins HN. *The treatment of burns*. 1940.
- Hellmuth RA. *Modelo de alvéolo pulmonar incluindo efeitos de tensão superficial* [trabalho de formatura]. São Paulo: Departamento de Engenharia Mecânica, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo; 2006.
- Hills BA. An alternative view of the role (s) of surfactant and the alveolar model. *Journal of Applied Physiology*. 1999;8:1567-83.
- Hills BA. What forces keep lung air spaces dry? *Thorax*. 1982;37:713-7.
- Hills BA. What is the true role of surfactant in the lung? *Thorax*. 1981;36:1-4.
- Hills BA, Barrow RE. The contact angle induced by DPL at pulmonary epithelial surfaces. *Respir. Physiol*. 1979;38:173-83.
- Hohlfeld JM, Ahlf K, Enhorning G, Balke K, Erpenbeck VJ, Petschallies J, Hoymann HG, Fabel H, Krug N. Dysfunction of pulmonary surfactant in asthmatics after segmental allergen challenge. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;159:1803-9.
- Hollars CW, Dunn RC. Submicron Structure in α -Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers and Bilayers Probed with Confocal, Atomic Force, and Near-Field Microscopy. *Biophysical journal*. 1998;75:342-53.
- Ikegami M, Na CL, Korfhagen TR, Whitsett JA. Surfactant protein D influences surfactant ultrastructure and uptake by alveolar type II cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2005;288: L552-L561.
- Ingenito EP, Mark L, Morris J, Espinosa FF, Kamm RD, Johnson M. Biophysical characterization and modeling of lung surfactant components. *Journal of Applied Physiology*. 1999;86:1702-14.

- Jobe AH. Fetal lung development, tests for maturation, induction of maturation, and treatment. In: Creasy R, Resnik R, editors. *Maternal-fetal medicine*. Philadelphia, PA: WB Saunders;1999. Chap. 1, p.404-422.
- Juzar A, Summer WR, Levitzky MG, eds. *Pulmonary pathophysiology*. McGraw-Hill, Health Professions Division, 1999.
- Keating E, Zuo YY, Tadayyon SM, Petersen NO, Possmayer F, Veldhuizen R.A. A modified squeeze-out mechanism for generating high surface pressures with pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2012;1818:1225-34.
- Khan A, Marques, EF. Synergism and polymorphism in mixed surfactant systems. *Current opinion in colloid & interface science*. 1999;4:402-10.
- Kramer A, Wintergalen A, Sieber M, Galla HJ, Amrein M, Guckenberger R. Distribution of the surfactant-associated protein C within a lung surfactant model film investigated by near-field optical microscopy. *Biophysical Journal*. 2000;78:458-465.
- Krause KP, Müller RH. Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenisation. *International journal of pharmaceutics*. 2001;214:21-4.
- KSV Nima Langmuir Troughs Medium 1000 IUD, Espoo, Finland/nome do fabricante da balança de Wilhelmy
- Kuroki Y, Voelker DR. Pulmonary surfactant proteins. *Journal of Biological Chemistry-Paper Edition*. 1994;269:25943-25946.
- Lamm Wayne JE, Albert RK. Surfactant Replacement Improves Lung Recoil in Rabbit Lungs after Acid Aspiration1-3. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:1279-83.
- Leblanc RM. Molecular recognition at Langmuir monolayers. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006;10:529-536.
- Lewis JF, Alan HJ. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *American Review of Respiratory Disease*. 1993;147:218-33.
- Lyra JC. Different doses of exogenous surfactant for treatment of meconium aspiration syndrome in newborn rabbits. *Rev. Hosp. Clín*. 2004;58:104-12.
- Mackowiak SA, Herman TK, Kaufman LJ. Spatial and temporal heterogeneity in supercooled glycerol: Evidence from wide field single molecule imaging. *The Journal of chemical physics*. 2009;131:244-513.
- Mackowiak SA. Temperature regulation and the pathogenesis of fever. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2009:chap 50.

- Manzanares D, Díaz E, Alfonso W, Escobar A, Colomé H, Muñoz MC, Noa M, Rabell S, Hidalgo A. Surfactante pulmonar porcino. *Repúb. Cuba*. 1995;61:35-42.
- Maron-Gutierrez T, Araujo I, Morales MM, Garcia CSNB, Rocco PRM. Stem cell therapy in acute respiratory distress syndrome. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2009;21:51-57.
- Meyboom A, Maretzki D, Stevens PA, Hofmann KP. Reversible calcium-dependent interaction of liposomes with pulmonary surfactant protein A analysis by resonant mirror technique and near-infrared light scattering. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:14600-5.
- Modrykamien A, Chatburn RL, Ashton RW. Airway pressure release ventilation: an alternative mode of mechanical ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2011;78:101-10.
- Moghaddam B, Ali MH, Wilkhu J, Kirby DJ, Mohammed AR, Zheng Q, Perrie Y. The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417:235-244.
- Mohammadi-Karakani A, Ghazi-Khansari M, Sotoudeh M. Lisinopril ameliorates paraquat-induced lung fibrosis. *Clinica Chimica Acta*. 2006;367:170-174.
- Nag K, Munro JG, Inchley K, Schürch S, Petersen NO, Possmayer F. SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipid films. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1999;277:L1179-L1189.
- Ngiam N, Kavanagh BP. Ventilator-induced lung injury: the role of gene activation. *Current Opinion in Critical Care*. 2012;18:16-22.
- Notter RH. *Lung surfactants. Basic science and clinical applications*. New York: Marcel Dekker; 2000.
- Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*. 1955; 175:1125-26.
- Perez-Gil, J. El sistema surfactante pulmonar. *Investigación y ciencia*. 2010;401:38-45.
- Peterson, I. R. Langmuir-blodgett films. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 1990;23:379.
- Piknova B, Schief WR, Vogel V, Discher BM, Hall SB. Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function. *Biophysical Journal* 2001;81:2172-2180.
- Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *American Review of Respiratory Disease*. 1988;138: 990-8.

- Ramanathan R, Rasmussen MR, Gerstmann DR, Finer N, Sekar K. A randomized, multicenter masked comparison trial of poractant alfa (Curosurf) versus beractant (Survanta) in the treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants. *American Journal of Perinatology*. 2004;21:109-19.
- Rebello CM, Proença RS, Troster EJ, Jobe AH. Terapia com surfactante pulmonar exógeno: o que é estabelecido e o que precisamos determinar. *J. Pediatr*. 2002;78:215.
- Rehder KE, Marsh M. Respiratory mechanics during anesthesia and mechanical ventilation. Handbook of physiology. The respiratory system. Mechanics of breathing. Am. Physiol. Soc. Bethesda. 1986;3:737-752.
- Roberts MP, Gabriel NP. Unilamellar lipid vesicles and method for their formation. *U.S. Patent*. 1990;4:921.
- Ross, GF, Ikegami M, Steinhilber W, Jobe AH. Surfactant protein C in fetal and ventilated preterm rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1999;277:L1104.
- Rüdiger M, Tölle A, Meier W, Rüstow B. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L379-L383.
- Sati L, Yasemin S-C, Ramazan Demir. Lung surfactant proteins in the early human placenta. *Histochemistry and cell biology*. 2010;133: 85-93.
- Schürch S, Qanbar R, Bachofen H, Possmayer F. The surface-associated surfactant reservoir in the alveolar lining. *Neonatology*. 1995;67:61-76.
- Schoel, WM, Schürch S, Goerke J. The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1994;1200:281-290.
- Schürch S, Bachofen H, Goerke J, Possmayer F. A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *Journal of Applied Physiology*. 1989;67:2389-96.
- Schwartz RM, Luby AM, Scanlon JW, Kellogg RJ. Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500 g. *New England Journal of Medicine*. 1994;330:1476-80.
- Serrano, A.G., Perez-Gil J. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2006;141:105-118.

- Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;2.
- Sun B, Cursted T, Song GW, Robertson B. Surfactant improves lung function and morphology in newborn rabbits with meconium aspiration. *Biol neonate.* 1993;63:96-104.
- Taeusch HW, Lu KW, Goerke J, Clements J A. Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1999;159:1391-95.
- Tashiro K, Kobayashi T, Robertson B. Dextran reduces surfactant inhibition by meconium. *Acta Paediatrica.* 2000;89:1439-45.
- UNICEF. *Mortalidade por doenças pulmonares em neonatos.* 2011.
- Vázquez G, Alvarez E, Navaza MJ. Surface tension of alcohol + water from 20 to 50 c. J. *Chem. Eng.* 1995;40:611-4.
- Veldhuizen RA, McCaig LA, Akino T, Lewis JF. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1995;152:1867-71.
- Von Nahmen A, Schenk M, Sieber M, Amrein M. The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy. *Biophysical Journal.* 1997;72:463-9.
- Von Neergaard K. New notions on a fundamental principle of respiratory mechanics: the retractile force of the lung, dependent on the surface tension in the alveoli. *Z. Gesamte Exp. Med.* 1929;66:373-394.
- Willson DF, Notter RH. The future of exogenous surfactant therapy. *Respiratory Care.* 2011; 56:1369-86.
- Weast RC, Astle MJ. *CRC handbook of physics and chemistry.* Boca Raton: CRC Press; 1988.
- West JB. *Fisiologia respiratória.* 8ª ed. São Paulo: Editora Artmed; 2010.
- Wright, J. R. Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1990, vol. 259, no 2, p. L1-L12.
- Zelter M, Escudier BJ, Hoeffel JM, Murray JF. Effects of aerosolized artificial surfactant on repeated oleic acid injury in sheep. *The American review of respiratory disease.* 1990;141:1014.

- Zuo W, Zhu M, Yang W, Yu H, Chen Y, Zhang Y. Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polymer Engineering & Science*. 2005;45:704-9.
- Zuo YY, Veldhuizen RA, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant—inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778:1947-77.
- Zuo YY, Li D, Acosta E, Cox PN, Neumann AW. Effect of surfactant on interfacial gas transfer studied by axisymmetric drop shape analysis-captive bubble (adsa-cb). *Langmuir*. 2005;21: 5446-5452.
- Wright, J. R. "Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1990;259:L1-L12.

APÊNDICE 1

O programa do software da KSV chamado *SGserve* é aberto. Aparece uma primeira tela chamada de *Manual Control Unit.*, conforme a Figura a.

Figura a. Imagem da primeira tela chamada *Manual Control Unit*

Nesta janela existem duas possibilidades:

- *Balance(s)* - esta opção deixa o transdutor de força em zero, no qual se posiciona a placa de Wilhelmy, ela é utilizada para tarar a balança.
- *Barrier1*- nesta opção pode-se modificar o tamanho da abertura das barreiras obtendo a mudança no tamanho da área e quantificar a velocidade para cada experimentação, ela não será utilizada nessa fase.

Ao selecionar uma das opções anteriores, a balança fica configurada para a experimentação, seguindo para a segunda janela na qual anotam-se os dados necessários para cada ensaio.

Nesta janela tem-se a opção chamada *ISO* e encontra-se circulada em vermelho na Figura b, essa opção nos levará à janela seguinte, como mostra a Figura c.

Figura b. Janela para selecionar a opção *Iso* para ir para a configuração das condições experimentais

Nesta parte são explicadas as opções que devem ser preenchidas, pois as outras opções não podem ser modificadas, e estes parâmetros são determinados pelo fabricante da balança.

- *Name*: Nesta opção escrevesse o nome do experimento que se realizara.
- *User*: Usuário que esta realizando o experimento.
- *Date*: data do experimento.
- *Subphase*

Name: líquido que se utilizara em cada experimento.

T: Temperatura °C

pH: medida da acidez ou alcalinidade da solução.

- *Substance I*

Name: nome da substância que se depositará na subfase para ser avaliada.

Conc: concentração da substância.

Comments: especificar as condições em que foi realizado o experimento.

Figura c. Janela para especificar as condições do experimento

Depois de preencher as especificações se clica no *start* para continuar na outra janela conforme Figura d.

Nesta janela tem-se as opções de mudar os parâmetros seguintes:

No of Cycles: quantidade de ciclos, de modo que um ciclo representa uma compressão e uma expansão, portanto para realizar cinco ciclos deve-se colocar o dobro de ciclos.

Compression Parameters: nesta opção encontram-se dois parâmetros que se poderia mudar: *Target* e *Rate*, mas se mantém os mesmos valores que o fabricante da balança sugere.

Nesta janela também se pode controlar as barreiras, o seu posicionamento, e dar início à medição da tensão superficial.

Figura d. Janela para escolher o numero de ciclos e a velocidade das barreiras

APÊNDICE 2

Artigo Submetido para a Revista: *International Journal of Pharmaceutics*

Characterization of exogenous lung surfactants by cycle work under different conditions in a Wilhelmy plate tensiometer

Diana M. Martinez^{1,2}, Jimmy M. Valencia³, Marcia Z. J. Ferreira^{2,4}, Mac Gayver S. Castro^{1,2}, Celso Moura Rebello⁵, Henrique T. Moriya³, Wagner S. Nishitani², Adriano M. Alencar^{2,*}

¹ Department of Experimental Pathophysiology, Medical School, University of São Paulo (USP), São Paulo - SP, 01246903, Brazil

² Instituto de Física, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo - SP, 05508-090, Brazil

³ Biomedical Engineering Laboratory, University of São Paulo (USP), São Paulo - SP, 05508-010, Brazil

⁴ School of Electrical and Computer Engineering, Department of Microwaves and Optics, University of Campinas (UNICAMP), Campinas - SP, 13083-970, Brazil

⁵ Hospital Israelita Albert Einstein, Departamento Materno-infantil, São Paulo - SP, 04501-000, Brazil.

* Corresponding author: aalencar@if.usp.br

Abstract

Lung surfactant is a complex mixture of phospholipids and proteins, found at the air-liquid interface of pulmonary alveoli and small airways, with the main role of reducing the surface tension to keep alveoli stable. Surfactant deficiency, or dysfunctional, leads to alveolar collapse, causes a lack of oxygen and it may be due to edema or inflammatory response in the lungs. In newborn babies, pulmonary immaturity with surfactant deficiency may cause Respiratory Distress Syndrome (RDS). In adults, the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is an aggravated manifestation of Acute Lung Injury (ALI). The treatment includes Mechanical Ventilation (MV) and exogenous surfactants. To understand surfactant functionality, it is necessary to characterize them biophysically. The main characteristic observed in this work was the mobility and recovery of surfactant from the subphase to the air-liquid interface. The mobility and recovery were quantified observing the work done in successive cycles of compression and expansion in a Wilhelmy plate tensiometer, and analyzing the work decay over the cycles until the stabilization. The parameters obtained for an exponential fitting of the decay were used to characterize two exogenous surfactants (Curosurf® and Survanta®), and compare for different: (i) concentrations of surfactant, (ii) subphases and (iii) barrier speeds. Our results showed that the exponential decay of the cycle work only happened for lower concentrations of surfactant. We also showed that the saline solution subphase improved the surfactant recovery to the air-liquid interface over ultrapure water subphase, and a suitable barrier speed must be found to optimize the observation of surfactant recovery.

1. Introduction

Lung surfactant is a complex mixture of phospholipids and proteins, essential to the maintenance of life. It is found most at the air-liquid interface of pulmonary alveoli, with the main role of reducing the surface tension to keep alveoli stable. The presence of surfactant is also fundamental for the oxygen and CO₂ diffusion, improving the ventilation/perfusion ratio, allowing the effective gas exchange (Serrano and Perez-Gil, 2006). Surfactant deficiency may lead to airway and alveolar collapse which can be detected by an acoustical event called pulmonary crackle sound (Alencar *et al.*, 2001; Alencar *et al.*, 2002; Hantos *et al.*, 2004). The studies and therapeutic usage of surfactants date back to the 1950s, due to the high mortality of newborn babies with pulmonary immaturity (Avery and Mead, 1959). It was first denominated Hyaline Membrane Disease, but known today as Respiratory Distress Syndrome (RDS) (Fujiwara *et al.*, 1980). In adults, the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), an aggravated manifestation of Acute Lung Injury (ALI), is characterized in its first stages by the deficit of oxygen. The lack of oxygen is due to edema and inflammatory response in the lungs, resulting from dysfunctional surfactant (Dushianthan *et al.*, 2011). The treatment includes Mechanical Ventilation (MV) (Caironi *et al.*, 2010; Suki *et al.*, 1998; Arold *et al.*, 2003), a basic life support element in Intensive Care Units (ICU). Beside MV, exogenous surfactants have also been used, which can be natural surfactants extracted from animal lung and available commercially (Ramanathan *et al.*, 2004; Willson and Notter, 2011). Two of them are extracted from macerated lung tissue: Curosurf® (porcine) (Ramanathan *et al.*, 2004; Rudiger *et al.*, 2005) and Survanta® (bovine) (Ross *et al.*, 1999; Ramanathan *et al.*, 2004; Rudiger *et al.*, 2005). The therapeutic use of exogenous surfactants is effective to reduce mortality. It is necessary full biophysical characterization to better understand and improve their functionality. A good surfactant should have the following properties: (i) spread quickly at the air-liquid interface; (ii) reduce the surface tension to values close to 0 mN/m; (iii) low compressibility; (iv) ability to return to the interface during inspiration if pushed out of the air-liquid interface during expiration; and (v) stability at higher pressures to avoid collapse (Banerjee and Bellare, 2001). One of the available methods to characterize a surfactant is the Wilhelmy plate tensiometer.

The Wilhelmy plate tensiometer has a shallow chamber, trough, with a liquid subphase where the surfactant film will be deposited. A platinum plate is placed in contact with the air-surfactant/subphase interface and a force transducer is used to measure the surface tension. Two barriers delimit the area of the trough, allowing the measurement of the surface tension for different surface areas, emulating the change in surface area at the alveoli during respiration. Then, the surfactant film properties are inferred from the variation of surface tension with the area of the air-liquid interface (Dervinchian, 1939). The graph of surface tension by the trough area allows us to calculate the work done in a given cycle. Work is defined as the difference between surface energies during expansion and compression. The surface energy is the surface tension multiplied by the air-liquid interface area. The difference of the surface energies over expansion and compression, a cycle work, is due to the difference in amount of surfactant at the air-liquid interface over the cycle. The decrease in cycle work over time would indicate a permanent loss of surfactant to the interface. Thus, the analysis of the cycle work allows the characterization of the recovery of surfactant to the interface, which is an important property to determine for lung surfactants (Notter *et al.*, 1980; Banerjee, 2002; Casals, 2012)

Clements (1957) was the first to measure variation in surface tension with lung surfactant with this equipment, a fundamental step for the knowledge advancement in the field. This tensiometer allows the combination other techniques to obtain insights on the molecular structure and orientation at the air-liquid interface: fluorescent microscopy (Nag *et al.*, 1999) and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy (Brockman *et al.*, 2003). Other techniques were also used to study the surfactant film from Wilhelmy plate tensiometers, using Langmuir-Blodgett transfers, giving insights on the molecular structure and orientation at the air-liquid interface. A list of these techniques were presented by Dynarowicz-Latka *et al.* (2001), including microscopy, spectroscopy, X-ray diffraction and reflectivity, electrical and rheological measurements. Some other examples are: scanning force microscopy (von Nahmen *et al.*, 1997), fluorescence and Brewster angle microscopy (Piknova *et al.*, 2001), confocal microscopy, atomic force microscopy (Hollars and Dunn, 1998), Scanning Near-field Optical Microscopy (Hollars and Dunn, 1998; Kramer *et al.*, 2000). On the other side, Wilhelmy plate tensiometers work at a quasi-

equilibrium state, allowing only a relatively slow change in the air-liquid interface area, which is different from the lung surfactant environment (Seurynck-Servoss *et al.*, 2007). Despite this difference in conditions, it has been used side by side with other types of tensiometers, such as the captive bubble tensiometer (Panda *et al.*, 2004).

Along with its usefulness, the use of Wilhelmy plate tensiometers is not standardized. For example, even the surfactant adsorption has been done in different ways. It has been demonstrated that the formation of a surfactant monolayer film for the measurements can be optimized by the usage of organic solvents, such as chloroform (Gaines and Roberts, 1963). Then, Archer and La Mer (1955) showed that the monolayer formation could also be achieved using other organic solvents such as benzene and hexane. Another feasible way is to directly deposit the surfactant on the air-liquid interface, without the use of organic solvents (Ikegami *et al.*, 1987). Another variation is observed in the subphase: it has been used water (Brockman *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2000, von Nahmen *et al.*, 1997; Panda *et al.*, 2004) or some kind of saline solution (Hollars and Dunn, 1998; Nag *et al.*, 1999; Pikhova *et al.*, 2001; Seurynck-Servoss *et al.*, 2007; Ikegami *et al.*, 1987; Notter *et al.*, 1980; Ross *et al.*, 2001). Thus, an exploration of different conditions for this tensiometer would be of interest to improve its use.

In this work, Curosurf® and Survanta® were characterized by a Wilhelmy plate tensiometer at different: (i) concentrations, (ii) subphases (ultrapure water or saline solution), and (iii) barrier speeds. The surfactants were spread on the air-liquid interface with chloroform. The data was gathered in full cycles, which involves compression and expansion of the interface area. We used the work done in each cycle to characterize the surfactant properties. For the study of subphases, we used ultrapure water, normally used for studies with monomolecular films (Hills, 1999; Notter, 2000) and 0.9% NaCl saline solution. Saline solution has been used as subphase before (Goerke, 1974; Banerjee and Bellare, 2001) and represents a better approximation to physiological environment than ultrapure water, with the presence of ions and an osmotic pressure similar to bodily fluids. To better approximate

physiological conditions, all experiments were carried out at a controlled temperature of 37°C.

2. Methods

2.1 Subphases

The subphases used in the experiments were ultrapure water and saline solution. The ultrapure water was obtained from a Direct-Q 3 system (Millipore, USA) with a resistivity of 18.2 MΩ.cm to attest its purity. The saline solution (0.9% NaCl) was purchased (ADV, Brazil).

2.2 Exogenous surfactants preparation

Curosurf® (Chiesi Pharmaceuticals, Italy) and Survanta® (Abbot Laboratories, USA) were equilibrated at room temperature, and then, diluted in chloroform to a total of 100 µl of solution. Due to the volatility of the solvent, it must be done immediately before the experiments. As both surfactants have different concentrations of lipids and proteins (the active part of surfactants), the dilutions were calculated to normalize the amount of these components and are presented in **Error! Reference source not found..**

Table 1: Dilution of surfactant used for experiments

Surfactant concentration (mg/ml)	Curosurf®	Survanta®	Total volume of solution (µl)		
	Surfactant (µl)	Solvent (µl)	Surfactant (µl)	Solvent (µl)	
0.5	0.6	99.4	2	98	100
2.0	2.5	97.5	8	92	100
8.0	10	90	32	68	100

2.3 Measurement of surface tension

The surface tension was measured using a Wilhelmy plate tensiometer (Langmuir Troughs Medium 1000 IUD, KSV NIMA, Finland), composed by a shallow teflon chamber (trough top) with movable hydrophilic barriers that delimit the surfactant film area and a surface pressure sensor. In the setup used, the surface pressure sensor was attached to a platinum plate, which was in contact with the air-liquid interface. The trough top was warmed to $37\pm0.2^{\circ}\text{C}$ by the circulation of temperature controlled water, pumped from a water bath. The equipment is shown in Figure 1. The software *KSV SGserve* was used to control the barrier position and acquire the data. The data are the measured surface tension for a series of barrier position cycles. A full compression and expansion path composed each cycle, during this path the barriers continually move from the maximal surface area ($11,250\text{ mm}^2$) to the minimal surface area ($2,250\text{ mm}^2$), and then back to the maximum. The trough top is 75 mm wide and the length delimited by the barriers varies from 30 mm to 150 mm.

Figure : Wilhelmy plate tensiometer setup.

Before each experiment, the trough top and barriers were washed with soap and thoroughly rinsed with water and ultrapure water. Afterwards, they were rinsed with 92.8% ethanol and ultrapure water. The platinum plate was rinsed in 92.8% ethanol and, then, heated at a Bunsen burner before the assembly in the tensiometer. The careful cleaning of the setup is critical for the accurate measurement of surface tension. The trough top was filled with 175 ml of subphase (ultrapure water or saline solution depending on the group we used), the barriers and platinum plate were positioned and, with the circulation of hot water, the system was allowed to thermally equilibrate for 10 minutes. Right before the experiment, approximately one milliliter of the surface water was pumped out with a pipette to ensure that the water surface was clear of larger impurities. Then, before depositing any surfactant in the trough top, the measurements were done for one cycle to verify the purity of the subphase interface and calibration of the setup. The equipment was ready for the experiment. The surfactant solution, freshly prepared, was carefully deposited with a

micropipette on the subphase surface between the barriers. With the surfactant in place, the surface tension was measured for 10 cycles of compression and expansion.

Due to normal instabilities of the surface pressure sensor, a few surface tension points with abnormal order of magnitude were disregarded, as discussed with the manufacturer (personal communication).

2.4 Measurement of work per cycle

The work in a cycle of compression and expansion of the surfactant film was numerically calculated using Matlab® platform (MathWorks, USA), corresponding to the area between the compression and expansion curve (**Error! Reference source not found.**). For each experiment, 10 cycles were recorded, resulting in a set of 10 values of work.

Figure 2: Graph of surface tension by trough area, with the work for a compression and expansion.

2.5 Exponential fitting

For an experiment, the work (W) calculated for each cycle (c) was fitted using Matlab® to an exponential decay with the form:

$$W(c) = a + b \cdot e^{-k \cdot c}$$

where, a is the work in a cycle at steady state, b represents the difference between the work at the first cycles and the work at steady state and k is the decay constant of the work per cycle. Matlab® also provided a correlation coefficient to allow an assessment of goodness of fit, a value closer to 1 represents a good fit.

2.6 Statistical analysis

Student's t-test was used to verify statistical significance in the difference between exponential parameters of each condition. It was adopted statistical significance for $p < 0.05$.

3. Results

The experiment was carried on a set of different conditions: different surfactants (Curosurf® and Survanta®), different concentrations (0.5, 2.0 and 8.0 mg/ml), different subphases (ultrapure water and saline solution) and different barrier speeds (50 mm/min and 120 mm/min). An example of result for each condition is presented from **Error! Reference source not found.** to **Error! Reference source not found.**. Some erratic behavior was observed for higher concentrations (2.0 and 8.0 mg/ml), marked on the examples shown. First, all conditions were repeated three times and the cycle work was averaged, shown in **Error! Reference source not found.** (Curosurf®) and **Error! Reference source not found.** (Survanta®).

Figure : Graphs of surface tension by area for Curosurf® at different concentrations and subphases: ultrapure water (a,c,e) and saline solution (b,d,f), with a barrier speed of 50 mm/min. Some erratic behavior for higher concentrations is marked with a red circle.

Figure : Graphs of surface tension by area for Curosurf® at different concentrations and subphases: ultrapure water (a,c,e) and saline solution (b,d,f), with a barrier speed of 120 mm/min. Some erratic behavior for higher concentrations is marked with a red circle.

Figure : Graphs of surface tension by area for Survanta® at different concentrations and subphases: ultrapure water (a,c,e) and saline solution (b,d,f), with a barrier speed of 50 mm/min. Some erratic behavior for higher concentrations is marked with a red circle.

Figure : Graphs of surface tension by area for Survanta® at different concentrations and subphases: ultrapure water (a,c,e) and saline solution (b,d,f), with a barrier speed of 120 mm/min. Some erratic behavior for higher concentrations is marked with a red circle.

Figure : Cycle work averages and deviations for Curosurf® in different subphases, ultrapure water (a,b) and saline solution (c,d) concentrations and barrier speeds: 50 mm/min (a,c) and 120 mm/min (b,d).

Figure : Cycle work averages and deviations for Survanta® in different subphases, ultrapure water (a,b) and saline solution (c,d) concentrations and barrier speeds: 50 mm/min (a,c) and 120 mm/min (b,d).

Due to the erratic behavior for higher concentrations, the exponential fitting had a better correlation for surfactants at 0.5 mg/ml. The correlation coefficients for 0.5, 2.0 and 8.0 mg/ml were, respectively, 0.90 ± 0.16 , 0.83 ± 0.23 and 0.51 ± 0.33 . Thus, for the concentration of 0.5 mg/ml, more experiments were conducted to raise the samples to a total of ten. Each experiment result was fitted to the exponential form and the parameters were averaged. The exponential parameters for each condition were compared to each other. These comparisons are shown from **Error! Reference source not found.** through **Error! Reference source not found.**

3.1 Comparison of different barrier speeds

A statistically significant difference was observed for parameter b for Survanta® on water ($p=0.010$). The higher barrier speed resulted in a higher b .

Table : Comparison of exponential fitting for Curosurf® on ultrapure water for different barrier speeds.

Parameter	Curosurf®, water, 50 mm/min (average $\pm$ SD, n=10)	Curosurf®, water, 120 mm/min (average $\pm$ SD, n=10)	Statistical significance (p)
a	312 $\pm$ 145	394 $\pm$ 110	0.173
b	3,870 $\pm$ 2,269	129,000 $\pm$ 296,000	0.215
k	0.882 $\pm$ 0.340	2.17 $\pm$ 1.85	0.055

Table : Comparison of exponential fitting for Curosurf® on saline solution for different barrier speeds.

Parameter	Curosurf®, saline, 50 mm/min (average $\pm$ SD, n=10)	Curosurf®, saline, 120 mm/min (average $\pm$ SD, n=10)	Statistical significance (p)
a	228 $\pm$ 306	445 $\pm$ 264	0.100
b	10,700 $\pm$ 23,600	2,590 $\pm$ 1,050	0.300
k	0.520 $\pm$ 0.600	0.460 $\pm$ 0.270	0.760

Table : Comparison of exponential fitting for Survanta® on ultrapure water for different barrier speeds.

Parameter	Survanta®, water, 50	Survanta®, water, 120	Statistical
-----------	----------------------	-----------------------	-------------

	mm/min (average±SD, n=10)	mm/min (average±SD, n=10)	significance (p)
<i>a</i>	312±76	299±101	0.738
<i>b</i>	4,850±1,130	16,800±11,700	0.010
<i>k</i>	1.51±0.88	1.57±0.59	0.851

Table : Comparison of exponential fitting for Survanta® on saline solution for different barrier speeds.

Parameter	Survanta®, saline, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, saline, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	430±117	446±136	0.781
<i>b</i>	4,220±650	2,590±1,052	0.085
<i>k</i>	0.551±0.130	0.656±0.380	0.432

3.2 Comparison of different subphases

There was a statistically significant difference for the following parameters: *k* for Curosurf® with barriers at 120 mm/min (p=0.009); *a* and *k* for Survanta® with barriers at 50 mm/min (p=0.017 and p=0.007, respectively); *a*, *b* and *k* for Survanta® with barriers at 120 mm/min (p=0.013, p=0.019 and p=0.0009, respectively). For Curosurf®, saline solution yielded a lower *k* with barriers at the higher speed. For Survanta®, saline solution caused an increase in *a* and a decrease in *k*, regardless of the barrier speed. For Survanta® with barriers at the higher speed, saline solution caused a decrease in *b*.

Table : Comparison of exponential fitting for Curosurf® with barriers at 50 mm/min on different subphases.

Parameter	Curosurf®, water, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Curosurf®, saline, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	312±145	228±306	0.449
<i>b</i>	3,870±2,270	10,700±23,600	0.385
<i>k</i>	0.882±0.340	0.520±0.600	0.131

Table : Comparison of exponential fitting for Curosurf® with barriers at 120 mm/min on different subphases.

Parameter	Curosurf®, water, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Curosurf®, saline, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	394±110	445±264	0.580
<i>b</i>	129,000±296,000	2,590±1,050	0.211
<i>k</i>	2.17±1.85	0.460±0.270	0.009

Table : Comparison of exponential fitting for Survanta® with barriers at 50 mm/min on different subphases.

Parameter	Survanta®, water, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, saline, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	312±76	430±117	0.017
<i>b</i>	4,850±1,130	4,220±650	0.148
<i>k</i>	1.51±0.88	0.551±0.130	0.007

Table : Comparison of exponential fitting for Survanta® with barriers at 120 mm/min on different subphases.

Parameter	Survanta®, water, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, saline, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	299±101	446±136	0.013
<i>b</i>	16,800±11,700	2,590±1,050	0.019
<i>k</i>	1.57±0.59	0.656±0.380	0.0009

3.3 Comparison of different surfactants

A statistically significant difference was found only for saline solution and barrier speed of 120 mm/min. The parameter *b* was lower for Curosurf® in this condition (p=0.006).

Table : Comparison of exponential fitting for different surfactants on ultrapure water and barriers at 50 mm/min.

Parameter	Curosurf®, water, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, water, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	312±145	312±76	0.998
<i>b</i>	3,870±2,270	4,850±1,130	0.242
<i>k</i>	0.882±0.340	1.51±0.88	0.060

Table : Comparison of exponential fitting for different surfactants on ultrapure water and barriers at 120 mm/min.

Parameter	Curosurf®, water, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, water, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	394±110	299±101	0.059
<i>b</i>	127,000±296,000	16,800±11,700	0.263
<i>k</i>	2.17±1.85	1.57±0.59	0.348

Table : Comparison of exponential fitting for different surfactants on saline solution and barriers at 50 mm/min.

Parameter	Curosurf®, saline, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, saline, 50 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	228±306	430±117	0.076
<i>b</i>	10,700±23,600	4,220±650	0.912
<i>K</i>	0.520±0.600	0.551±0.13	0.348

Table : Comparison of exponential fitting for different surfactants on saline solution and barriers at 120 mm/min.

Parameter	Curosurf®, saline, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Survanta®, saline, 120 mm/min (average±SD, n=10)	Statistical significance (p)
<i>a</i>	445±264	446±136	0.996
<i>b</i>	2,590±1,050	6,200±3,200	0.006
<i>K</i>	0.460±0.270	0.656±0.380	0.218

4. Discussion

One could notice the relatively high deviation observed throughout the experiments and it has indeed hindered statistical significance from the results. There are two main issues that may have affected repeatability of the results: (i) viscosity of surfactant in its original state; and (ii) volatility of the solvent (chloroform) used in the surfactant preparation. The resulting parameters of the exponential fit may have been influenced by the lack of precision involved in the manipulation due to the surfactant viscosity. High viscosities make it difficult to ensure the right amount of surfactant is being used in the solution preparation. There may be a significant amount of surfactant adhered to the outside of the micropipette and unknowingly included in the solution, for example. Also, the surfactant solution preparation with chloroform had to be done quickly due to the volatility of the solvent. This volatility may have added some error in concentration depending on the time between the preparation and deposition of surfactant.

One issue considered before the exponential fitting was the erratic behavior of the surface tension curves for higher concentrations (2.0 and 8.0 mg/ml). Because of this behavior, any data from the exponential fitting under these circumstances would not be accurate. This behavior was not completely random, as the curve usually jumped closer to another, from other cycles, following its trajectory. It was as if the interface was reproducing a condition/surfactant density from other cycles. This behavior may be explained by the fact that surfactant in excess tends to form additional layers parallel to the monolayer at the interface. This is called oligolamellar coating (Hills, 1999). The formation of this kind of structure during compression and the way it unravels during expansion, if their occurrence is high enough, may be related to the jumps in the surface tension curve to values already reached in previous cycles.

To better understand the state of the surfactant at the air-liquid interface for the lowest concentration (0.5 mg/ml), The density at the liquid-air interface of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), the main lipid component of surfactants,

was related to the decrease in surface tension, being found in "gaseous", "expanded" and "condensed" states for the experiment conditions, below the transition temperature (Hills, 1999). With data from literature regarding surfactant composition, estimates were made regarding the average area per DPPC molecule for Curosurf® and Survanta® (Blanco and Pérez-Gil, 2007). These estimates would place them between "expanded" (maximum of $79 \text{ \AA}^2$ for Curosurf® and $47 \text{ \AA}^2$ for Survanta®) and "condensed" states (minimum of $9.9 \text{ \AA}^2$ for Curosurf® and $9.3 \text{ \AA}^2$ for Survanta®) throughout the barrier cycles. During expansion, the "condensed" DPPC will not readily spread again, but will most likely crack (Hills, 1999), which could be accounted as a loss of surfactant active on the air-liquid interface. As the surfactants are not purely DPPC, the presence of other lipids and proteins may interfere with the "condensed" formation, helping in its spreading at the interface. It is also important to remember that the protein SP-B, present in the lung surfactant, may assist in the DPPC spreading during expansion. This protein possibly helps the formation of folds in the "expanded" lipid monolayer by local bending and keeps the lipid bilayers closer to the interface monolayer, which would allow a faster access of lipids to the interface during expansion (Baoukina and Tieleman, 2011).

To interpret the exponential fitting of data from surfactant concentration of 0.5 mg/ml , it is necessary to correlate the cycle work to surfactant properties. Due to the surfactant effect on an interface, compression would normally decrease the surface tension as it progressively increases the density of surfactant. Expansion would have the reverse effect. Then, considering that part of the surfactant is lost from the interface during compression and recovered during expansion, the work in a cycle would be proportional to the difference in amount of surfactant at the interface during compression and expansion. Thus, in the exponential fitting, the parameter a could be correlated to the recovery of surfactant during expansion or, in other words, the mobility of surfactant during the cycle. The decay of work throughout the cycles may be interpreted as proportional to the non-recoverable loss of surfactant in each cycle. In other words, it could be inversely proportional to the recovery of surfactant, as a perfect recovery would mean no decay at all. For the exponential fitting, it means that a lower b and k can be related to a better recovery and spreading of

surfactant on the subphase interface. All parameters for the exponential fitting were used to compare surfactant properties under different barrier speeds and subphases.

Higher barrier speeds may have caused an increased loss of surfactant from the first cycle to the steady state condition, indicated by an increase of the parameter b for Survanta® on ultrapure water (**Error! Reference source not found.**). One explanation is that the faster barrier movement would impose a shorter period for the recovery of surfactant during expansion. Assuming that the recovery of surfactant is a constant property of the system subphase-surfactant, a very low barrier speed would not allow any observation of recovery over time. Every recovery would be perceived as the maximum possible and closer to a perfect one. On the other hand, a very high barrier speed also would not allow any observation of recovery over time, as the expansion time would be too short for any appreciable recovery. The ability to observe differences in surfactant losses between barrier speeds is an indication that the time scale of surfactant recovery is comparable to the expansion time for these speeds. The higher barrier speed was able to better differentiate surfactant properties under the same conditions: five exponential parameters were significantly different with speed of 120 mm/min, but only two for 50 mm/min.

Saline solution subphase may improve surfactant mobility to the interface, allowing a better recovery than observed for ultrapure water subphase. Considering different conditions and surfactants, saline subphase caused an increase in a , indicating better surfactant mobility, and a decrease in b and k , indicating an improvement in surfactant recovery. These improvements may be explained by the presence of ions in the subphase. Although zwitterionic at physiological pH, DPPC can be effectively cationic when mobile cations are present. The mobile cations will assist in creating a strongly cohesive layer of surfactant by the process known as "phosphating" (Hills, 1999). In the saline solution used in this work, this role would be fulfilled by the sodium cations. With a stronger layer of surfactant, there may be a decrease in surfactant loss due to formation of vesicles during compression. Therefore, the surfactant may have an increased availability to return to the surface during expansion.

Regarding surfactant performance, the results suggests Curosurf® to have better properties than Survanta®. For saline solution subphase and barrier speed of 120 mm/min, Curosurf® showed a lower parameter b than Survanta®, indicating a decreased non-recoverable surfactant loss throughout the cycles. In fact, Curosurf® performed better than Survanta® in reducing mortality of infants with RDS (Ramanathan *et al.*, 2004).

4. Conclusions

The main characteristic observed in this work was the mobility and recovery of surfactant in the subphase to the air-liquid interface. It was accomplished by calculating the work done in successive cycles of compression and expansion in a Wilhelmy plate tensiometer and analyzing the work decay over the cycles. The parameters obtained for an exponential fitting of the decay were used for the characterization of two exogenous surfactants (Curosurf® and Survanta®) and compared for different concentrations of surfactant, subphases and barrier speeds. The exponential decay of the cycle work only happened for lower concentrations of surfactant. Saline solution subphase improved the surfactant recovery to the air-liquid interface over ultrapure water subphase. A suitable barrier speed must be found to optimize the observation of surfactant recovery, depending on the trough geometry and surfactant recovery dynamics. The improved recovery properties of Curosurf® over Survanta® observed in this work agrees with the improved results from Curosurf® when compared to Survanta® in the literature.

Financial Support: grant numbers 2012/21103-0, 2012/07907-9, 2011/18322-9, 2010/04676-0 from São Paulo Research Foundation (FAPESP) and CNPq (Brazil).

References

- Alencar, A.M., Buldyrev, S.V., Majumdar, A., Stanley, H.E., Suki, B., 2001. Avalanche dynamics of crackle sound in the lung. *Physical Review Letters*. 87 Article Number: 088101.
- Alencar, A.M., Arold, S.P., Buldyrev, S.V., Majumdar, A., Stamenovic, D., Stanley, H.E., Suki, B., 2002 Dynamic instabilities in the inflating lung. *Nature*. 417, Issue: 6891 Pages: 809-811.
- Archer, R.J., La Mer, V.K., 1955. The rate of evaporation of water through fatty acid monolayers. *The Journal of Physical Chemistry*. 59, 200-208.
- Arold, S.P., Suki, B., Alencar, A.M., Lutchen, K.R., Ingenito, E.P., 2003. Variable ventilation induces endogenous surfactant release in normal guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285, L370–L375.
- Avery, M. E., Mead, J., 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 97, 517.
- Banerjee, R., Bellare, J.R., 2001. Scoring of surface parameters of physiological relevance to surfactant therapy in respiratory distress syndrome. *Journal of Applied Physiology*. 90, 1447-1454.
- Baoukina, S., Tieleman, D. P.. 2011. Lung surfactant protein SP-B promotes formation of bilayer reservoirs from monolayer and lipid transfer between the interface and sub-phase. *Biophysical Journal*, 100, 1678-1687.
- Blanco O, Pérez-Gil J., 2007. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: Role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. *European Journal of Pharmacology*. 568, 1-15.

Brockman J.M., Wang Z., Notter R.H., Dluhy R.A., 2003. Effect of hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C on binary phospholipid monolayers: II. Infrared external reflectance-absorption spectroscopy. *Biophysical Journal*, 84, 326-40.

Casals, C., & Cañadas, O., 2012. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818-11.

Caironi, P., Cressoni, M., Chiumello, D., Ranieri, M., Quintel, M., Russo, S.G., Gattinoni, L., 2010. Lung opening and closing during ventilation of acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 181, 578-586.

Dervichian, D., 1939. A New Technique for the Spreading of Proteins and the Spreading Number. *Nature*, 144, 629-630.

Dushianthan, A., Grocott, M.P.W., Postle, A.D., Cusack, R., 2011. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgraduate Medical Journal*. 87, 612-622.

Dynarowicz-Latka P., Dhanabalan A., Oliveira O.N. Jr., 2001. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91, 221-293.

Fujiwara, T., Maeta, H., Chida, S., Morita, T., Watabe, Y., Abe, T., 1980. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet*. 1, 55-9.

Gaines, G.L., Roberts R.W., 1963. Evaporation of Langmuir–Blodgett Monolayers in Vacuum. *Nature*. 197, 787.

Goerke, J., 1974. Lung surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 344, 241-261.

Hantos, Z., Tonai, J., Asztalos, T., Petak, F., Adamicza, A., Alencar, A.M., Majumdar, A., Suki, B., 2004, Acoustic evidence of airway opening during recruitment in excised dog lungs. *Journal of Applied Physiology*. 97, Pages: 592-598.

Hills, B.A., 1999. An alternative view of the role (s) of surfactant and the alveolar model. *Journal of Applied Physiology*. 8, 1567-1583.

Hollars C.W., Dunn R.C., 1998. Submicron structure in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy. *Biophys J*. 75, 342-53.

Ikegami M, Agata Y, Elkady T, Hallman M, Berry D, Jobe A., 1987. Comparison of four surfactants: in vitro surface properties and responses of preterm lambs to treatment at birth. *Pediatrics*. 79, 38-46.

Kramer A., Wintergalen A., Sieber M., Galla H.J., Amrein M., Guckenberger R., 2000. Distribution of the surfactant-associated protein C within a lung surfactant model film investigated by near-field optical microscopy. *Biophys J*. 78, 458-65.

Nag K., Munro J.G., Inchley K., Schürch S., Petersen N.O., Possmayer F., 1999. SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipid films. *American Journal of Physiology*. 277, L1179-89.

Notter R.H., Holcomb S., Mavis R.D., 1980. Dynamic surface properties of phosphatidylglycerol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixed films. *Chemistry and Physics of Lipids*, 27, 305–319.

Notter, R.H., 2000. Lung surfactants: basic science and clinical applications. 149, 122-126.

Panda A.K., Nag K., Harbottle R.R., Rodriguez-Capote K., Veldhuizen R.A., Petersen N.O., Possmayer F., 2004. Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30, 641-50.

Piknova B., Schief W.R., Vogel V., Discher B.M., Hall S.B., 2001. Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function. *Biophys J.* 81, 2172-80.

Ramanathan, R., Rasmussen, M.R., Gerstmann, D.R., Finer, N., Sekar, K., 2004. A randomized, multicenter masked comparison trial of poractant alfa (Curosurf) versus beractant (Survanta) in the treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants. *American Journal of Perinatology.* 2,109-119.

Ross, G.F., Ikegami, M., Steinhilber, W., Jobe, A.H., 1999. Surfactant protein C in fetal and ventilated preterm rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 277, L1104-L1108

Ross M., Steinem C., Galla H.-J., Janshoff A., 2001. Visualization of Chemical and Physical Properties of Calcium-Induced Domains in DPPC/DPPS Langmuir–Blodgett Layers. *Langmuir*, 17, 2437–2445.

Rüdiger, M., Tölle, A., Meier, W., Rüstow, B., 2005. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288, L379-L383.

Serrano, A.G., Perez-Gil, J., 2006. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chemistry and Physics of Lipids.* 141,105-118.

Seurynck-Servoss SL, Brown NJ, Dohm MT, Wu CW, Barron AE., 2007. Lipid composition greatly affects the in vitro surface activity of lung surfactant protein mimics. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 57, 37-55.

Suki, B., Alencar, A.M., Sujeer, M.K., Lutchen, K.R., Collins, J.J., Andrade, J.S. Jr, Ingenito, E.P., Zapperi, S., Stanley, H.E., 1998. Life-support system benefits from noise. *Nature.* 393, 127-128.

von Nahmen A., Schenk M., Sieber M., Amrein M., 1997. The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy. *Biophys J.* 72, 463-9.

Willson, D.F., Notter, R.H., 2011. The future of exogenous surfactant therapy. *Respiratory care.* 56, 1369-1386.