

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E
BIOLOGIA

MARINA APARECIDA PIRES

“Caracterização das monocamadas mistas (DPPC+BCD) de Langmuir: efeito da estrutura e concentração do BCD e da força iônica na subfase”

Ribeirão Preto – SP
2008

MARINA APARECIDA PIRES

“Caracterização das monocamadas mistas (DPPC+BCD) de Langmuir: efeito da estrutura e concentração do BCD e da força iônica na subfase”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto – SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA.

Ficha Catalográfica

P746c

Pires, Marina Aparecida.

Caracterização das monocamadas mistas (DPPC+BCD) de Langmuir: efeito da estrutura e concentração do BCD e da força iônica na subfase. Ribeirão Preto, 2008.

74 f. :il.;

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Borissevitch, Iouri E.

1. Monocamadas de Langmuir. 2. Corantes cianicos com dois cromóforos. 3. Modelo de membrana. 4. Fosfolípido DPPC.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARINA APARECIDA PIRES

“Caracterização das monocamadas mistas (DPPC+BCD) de Langmuir: efeito da estrutura e concentração do BCD e da força iônica na subfase.”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia

Banca Examinadora

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Banca Examinadora em __/__/2009.

Esta dissertação é dedicada aos meus pais Germano e Aparecida, que sempre me apoiaram. Ao meu irmão Matheus, que mesmo longe nunca deixou de me incentivar. À minha irmã Marisa, pelos momentos de descontração e ao meu sobrinho Guilherme.

Agradecimentos

À Deus por ter dado ao homem a capacidade de pensar, de criar e de modificar.

Ao prof. Iouri E. Borissevitch pela dedicação na orientação deste trabalho, pela confiança em mim depositada, pelo apoio, pelas discussões e ensinamentos.

À profa. Galina pelo carinho, apoio e discussões.

Ao prof. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. por ceder sua estrutura e recursos para realizar este trabalho e à profa. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli e à Thatyane M. Nobre pelas sugestões e discussões.

Agradecimento especial ao técnico Felipe J. Pavinatto, do Grupo de Polímeros "Prof. Bernhard Gross" – IFSC – USP, pela dedicação para o desenvolvimento deste trabalho, pelo ensinamento da fabricação das monocamadas, pelas sugestões e discussões e pelo companheirismo nos longos dias de trabalho.

Aos amigos do grupo de Fotobiofísica (USP-Ribeirão): Lu Xaxá (Luciana), Moisés, Ernando, Pablo, Wagner, Pudim (Gustavo), Marcelo e Prof. Amando, pela amizade e convivência neste período e, em especial, à Tia Cássia pelos conselhos, motivação e palavra amiga nos momentos difíceis.

Agradecimento especial à amiga Gisele Fantacini pelo apoio, pelas palavras de incentivo, pela paciência e carinho, e, principalmente, pelas “terapias de mesinha”.

À amiga Roberta Squinca que acompanhou e apoiou todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Takeda e Cassiana que me incentivaram na fase final deste trabalho.

À Simone por me ajudar a finalizar a redação deste trabalho.

À José Luiz Bruçó pela ajuda final para concretizar este trabalho.

Ao DFM, a USP e a Capes pela concessão da bolsa e suporte para pesquisa.

*Quem se apaixona pela prática sem ciência é como piloto que
embarca sem leme ou bússola.*
(Leonardo da Vinci)

Resumo

Neste trabalho foram estudadas as interações entre os corantes cianicos com dois cromóforos (BCD) e monocamadas de Langmuir de fosfolípido (DPPC). Devido ao alto coeficiente de absorção molar da luz na região $\lambda > 600$ nm, ao alto rendimento quântico do estado tripleto, à alta fotocitotoxicidade e à alta afinidade com estruturas celulares os BCD são promissores para serem utilizados em terapia fotodinâmica.

Os estudos das características da interação de BCD com a monocamada são importantes tanto para esclarecer os efeitos estruturais na interação de monocamadas com outras moléculas quanto para suas aplicações em terapia fotodinâmica e em outras áreas tecnológicas tais como nanoeletrônica, fotônica etc.

As isotermas de pressão superficial (π -A) obtidas mostram que os BCD e as monocamadas interagem, pois as isotermas (π -A) se expandem conforme é aumentado a porcentagem de BCD. Esta interação é dependente tanto da estrutura do BCD quanto da força iônica da subfase. A partir das isotermas (π -A) foi obtido o módulo de compressibilidade ($C_s^{-1} = -A \frac{\partial \pi}{\partial A}$) das monocamadas, do qual foram analisadas, de maneira mais detalhada, as modificações da monocamada de DPPC devido à presença dos BCD. Estas modificações compreendem o aparecimento da fase líquida expandida (LE) e formação dos domínios antecipada em comparação com a monocamada de DPPC puro. Foi observado que a área mínima por molécula e a elasticidade da monocamada na fase condensada (C) aumentam juntos com a porcentagem dos BCD.

Na presença de BCD 180° as isotermas de potencial superficial (ΔV -A) sofrem uma expansão, no entanto, o valor máximo do potencial permanece inalterado. Isto indica que os BCD estimulam (antecipam) a orientação das moléculas de DPPC na interface ar-água e, conseqüentemente, a co-orientação das cabeças polares do DPPC, mas não contribuem no potencial superficial.

Foi observado que a presença de NaCl na subfase aumenta o efeito dos BCD na formação da monocamada DPPC. Acreditamos que este efeito sinérgico é devido às interações mútuas dos ânions Cl^- com a carga positiva do grupo

trimetilamônio da cabeça polar do DPPC e das cargas positivas do BCD com a carga negativa do grupo fosfato do DPPC.

As imagens obtidas pela microscopia de ângulo de Brewster mostram, em concordância com a análise das isotermas de pressão (π -A) e de potencial (ΔV -A), que a formação dos domínios, e conseqüentemente da monocamada, é antecipada na presença de BCD. Entretanto, a presença do BCD não altera o formato dos domínios, mas diminui seu tamanho.

A análise realizada sobre os espectros de absorção óptica mostrou que os BCD podem formar agregados tipos H na monocamada e não foram observados agregados tipo J.

Baseando-se na análise do efeito da estrutura dos BCD, na interação com a monocamada, e dos espectros de absorção propusemos dois modelos de interação dos BCD com a monocamada e acreditamos que o seguinte modelo é a melhor modelagem do sistema:

- BCD se inseri na monocamada, paralelamente ao eixo da molécula de DPPC, interagindo tanto com a cauda hidrofóbica quanto com a cabeça polar.

Entretanto, os resultados obtidos não permitem excluir completamente o segundo modelo proposto, no qual o BCD se localiza na parte polar da monocamada, perpendicular ao eixo da molécula de DPPC.

Abstract

In this work the interaction of cyanine dyes with two chromophores with the DPPC phospholipid Langmuir monolayers was studied. Due to their high optical absorption in the region $\lambda > 600$ nm, high triplet state quantum yields, high photocytotoxicity and high affinity with cell structures the BCD are promising for application in photodynamic therapy.

The study of the interaction of BCD with monolayers is important to clarify the structural effects on the monolayer interaction with other molecules as well as for application in photodynamic therapy and in other fields of technology, such as nanoelectronics, photonics, etc.

The superficial pressure isotherms (π -A) demonstrate that BCD do interact with monolayers, the (π -A) isotherms being expanded when the BCD relative content increases. This interaction depends on the BCD structure and the subphase ionic strength, as well. The curves of the compressibility module ($C_s^{-1} = -A \frac{\partial \pi}{\partial A}$) of the monolayers were obtained from the (π -A) isotherms, which were used for detailed analysis of the DPPC monolayer formation in the BCD presence. The analysis demonstrated that the monolayer expanded liquid phase and the domain were formed earlier in the BCD presence than for pure DPPC. It was observed that both the minimum area per molecule and the condensed phase elasticity increased when the BCD relative content increased.

In the presence of BCD 180⁰ the superficial potential isotherms (ΔV -A) were expanded, but the maximum potential value was unchanged. This indicates that BCD stimulated the DPPC molecule orientation on the air-water interphase and, consequently, the co-orientation of the DPPC polar heads, but did not contribute itself in the surface potential.

It was observed that NaCl in the subphase increased the BCD effects on the DPPC monolayer formation. We suppose that this synergetic effect is due to the mutual interaction of Cl⁻ anions with positive charges of the trimethylammonium group of the DPPC polar head and that of positive BCD charges with its phosphate group negative charges.

Images obtained with the Brewster microscopy confirmed that BCD stimulated the domain and, consequently, the monolayer formation in accordance with the (π -A) and (ΔV -A) analysis. At the same time the BCD did not change the domain geometry, but reduced their sizes.

The analysis of the BCD optical absorption spectra demonstrate that the BCD molecules in the monolayer form H aggregates and no J aggregates were observed.

Basing on the analysis of the BCD structure effects on the monolayer formation we can propose two models of the BCD – monolayer interaction and we believe that the follow model is better:

- the BCD molecule is inserted in the monolayer interior being parallel with the DPPC molecule axis and interacting with both hydrophobic and polar DPPC parts;

However, our data are not sufficient to exclude completely the possibility for the BCD molecule to be localized just in the polar head monolayer part being perpendicular to the DPPC molecule axis.

Lista de Figuras

Figura 2.1: estrutura geral dos corantes cianicos.....	5
Figura 2.2: estrutura geral dos BCD, sendo α o ângulo entre os cromóforos.....	6
Figura 2.3: espectros de absorção dos corantes cianicos com dois cromóforos com ângulos de 180°, 150° e 90° entre os cromóforos em água.....	7
Figura 2.4: esquema de níveis para os BCD com os efeitos de tunelamento e interação dipolo-dipolo entre os cromóforos (Borissevitch, 1978).....	8
Figura 2.5: esquema dos modelos de membrana lipoid (a) e unit membrane model (b).....	9
Figura 2.6: esquema dos modelos membrana de Sjöstrand (a) e de Green e Benson (b).....	10
Figura 2.7: esquema do modelo de membrana mosaico fluido.....	10
Figura 2.8: Esquema ilustrativo da balança de Langmuir com a placa de Wilhelmy e as barreiras móveis.....	12
Figura 2.9: Esquema do princípio da formação de filmes de Langmuir. Figura adaptada de GIRARD-EGROT et al. 2005.....	12
Figura 3.1: exemplos de isotermas (π -A) de diferentes fosfolipídios em diferentes fases. Adaptada de (Girard-Egrot et al. 2005).....	14
Figura 3.2: representação do capacitor de três camadas do modelo DF.....	16
Figura 3.3: interação da radiação com uma amostra e a relação entre a intensidade da radiação transmitida (I_T) com a incidente (I_0).....	17
Figura 3.4: polarização da luz após incidência sobre superfície separadora de dois meios.....	19
Figura 3.5: refração total de um raio incidente paralelo polarizado ao plano de incidência.....	19
Figura 3.6: esquema do arranjo experimental para a BAM.....	20
Figura 4.1: estrutura molecular dos BCD: (a) 180°, (b) 150° e (c) 90°.....	21
Figura 4.2: Estrutura molecular do fosfolipídio DPPC.....	22
Figura 4.3: esquema da montagem experimental, na cuba de Langmuir, para espectroscopia uv-visível.....	24
Figura 5.1: isoterma de pressão superficial e módulo de compressibilidade do DPPC – subfase aquosa.....	26
Figura 5.2: isotermas (π -A) das monocamadas mista de DPPC+BCD180° - subfase aquosa.....	26
Figura 5.3: isotermas (π -A) das monocamadas mista de DPPC+BCD150° - subfase aquosa.....	27
Figura 5.4: isotermas (π -A) das monocamadas mista de DPPC+BCD90° - subfase aquosa.....	27
Figura 5.5: módulo de compressibilidade em função da área por molécula: DPPC+BCD180° - subfase aquosa.....	28
Figura 5.6: módulo de compressibilidade em função da área por molécula: DPPC+BCD150° - subfase aquosa.....	28
Figura 5.7: módulo de compressibilidade em função da área por molécula: DPPC+BCD90° - subfase aquosa.....	29
Figura 5.8: curvas de energia potencial para interação de partículas.....	31
Figura 5.9: aumento do valor mínimo do Cs^{-1} na transição de fase LE/LC em função da % _{BCD} na monocamada – subfase aquosa.....	33
Figura 5.10: dependência da A_{mm} em função da % _{BCD} - subfase aquosa.....	34
Figura 5.11: dependência do valor máximo do Cs^{-1} na fase C, em função da % _{BCD} na monocamada – subfase aquosa.....	34
Figura 5.12: efeito do NaCl (0,2 M) sobre a isoterma (π -A) do DPPC.....	35
Figura 5.13: isotermas (π -A) das monocamadas mista de DPPC+BCD180° - subfase aquosa+NaCl.....	36
Figura 5.14: isotermas (π -A) das monocamadas mista de DPPC+BCD150° - subfase aquosa+NaCl.....	37
Figura 5.15: isotermas (π -A) das monocamadas mista de DPPC+BCD90° - subfase aquosa+NaCl.....	37
Figura 5.16: Valores de A_{mm} em função da % _{BCD} , em subfase H ₂ O + NaCl.....	38
Figura 5.17: módulo de compressibilidade em função da área por molécula: DPPC+BCD 180° - subfase aquosa+NaCl.....	39
Figura 5.18: módulo de compressibilidade em função da área por molécula: DPPC+BCD 150° - subfase aquosa+NaCl.....	39
Figura 5.19: módulo de compressibilidade em função da área por molécula: DPPC+BCD 90° - subfase aquosa+NaCl.....	40
Figura 5.20: valor máximo do Cs^{-1} , fase C, em função da % _{BCD} na monocamada – subfase aquosa+NaCl.....	40
Figura 5.21: deslocamento do valor máximo do Cs^{-1} em função da % _{BCD} na monocamada - subfase aquosa+NaCl.....	41
Figura 5.22: isoterma de potencial superficial do DPPC.....	42
Figura 5.23: isotermas (ΔV -A) das monocamadas mistas de DPPC+BCD150° - subfase aquosa.....	43
Figura 5.24: isotermas (ΔV -A) das monocamadas mistas de DPPC+BCD90° - subfase aquosa.....	43
Figura 5.25: isotermas (ΔV -A) das monocamadas mistas de DPPC+BCD180° - subfase aquosa.....	44

Figura 5.26: variação do potencial $(PS-PS_0)/PS_0$, em 80 \AA^2 , em função da $\%_{BCD}$ – subfase aquosa.	45
Figura 5.27: isotermas $(\Delta V-A)$ das monocamadas mistas de DPPC+BCD180° - subfase aquosa+NaCl. ...	45
Figura 5.28: visualização por BAM das monocamadas de DPPC (a) e DPPC+BCD180° (b) em 84 \AA^2	47
Figura 5.29: visualização por BAM das monocamadas de DPPC (a) e DPPC+BCD180° (b) em 61 \AA^2	48
Figura 5.30: visualização por BAM das monocamadas de DPPC (a) e DPPC+BCD180° (b) em 53 \AA^2	48
Figura 5.31: visualização por BAM das monocamadas de DPPC (a) e DPPC+BCD180° (b) em 50 \AA^2	49
Figura 5.32: representação esquemática do modelo (1) proposto, BCD inserido na monocamada de DPPC – (a) BCD 180°, (b) BCD 150° ou 90°	50
Figura 5.33: representação esquemática do modelo (2) proposto, BCD na subfase, interagindo somente com a cabeça polar das moléculas de DPPC.	51
Figura 5.34: espectros de absorção de BCD180° incorporado em monocamada de DPPC em função da área por molécula – subfase aquosa.	52
Figura 5.35: espectros normalizados de absorção óptica do BCD180° em solução aquosa em função da concentração.	53
Figura 5.36: espectros normalizados do BCD180° em diferentes solventes	54
Figura 5.37: representação esquemática da geometria de agregados de tipos H, J e HJ	54
Figura 5.38: Espectros demonstrativos de absorção óptica de um monômero (M) e de seus agregados H e J	55

Sumário

Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	ix
Sumário	xi
Capítulo 1: Introdução	1
Capítulo 2 Base Científica	5
2.1 Corantes Orgânicos	5
2.1.1 Corantes Ciânicos.....	5
2.1.2. Corantes Ciânicos com dois Cromóforos	6
2.2 Membranas Biológicas e Monocamadas de Langmuir	8
2.2.1. A evolução dos modelos de membrana	8
2.2.2. Monocamadas de Langmuir.....	11
Capítulo 3 Teoria dos Métodos Experimentais	13
3.1. Introdução	13
3.2. Técnicas de caracterização das monocamadas de Langmuir	13
3.2.1. Pressão Superficial (π).....	13
3.2.1.1 Módulo de Compressibilidade Superficial (C_s^{-1}).....	15
3.2.2 Potencial Superficial (ΔV).....	15
3.2.3 Espectroscopia de absorção na região de ultravioleta e visível	17
3.2.4 Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)	18
Capítulo 4 Materiais e Métodos	21
4.1 Introdução	21
4.2 Objetos de estudo	21
4.3 Fosfolípido DPPC	22
4.4 Preparação das amostras	22
4.5 Fabricação e caracterização das monocamadas de Langmuir	22
Capítulo 5: Resultados e Discussão	25
5.1 Pressão de Superfície (π)	25
5.1.1 Subfase aquosa.....	25
5.1.2 Subfase aquosa + NaCl	35
5.2 Potencial Superficial (V)	41
5.2.1 Subfase aquosa.....	42
5.2.2 Subfase aquosa + NaCl	45
5.3 Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM)	46
5.4 Influência da Estrutura da Molécula de BCD	49
5.5 Espectroscopia de Absorção UV-Visível	52
Capítulo 6 Conclusões	57
Referências Bibliográficas	59

Capítulo 1: Introdução

A neoplasia maligna é comumente denominada de **câncer** ou **cancro**. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO 2006). Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde.

As terapias convencionalmente utilizadas para o tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia.

Atualmente a **cirurgia** é considerada o tratamento mais eficaz do câncer de tumores localizados, mas é ineficaz contra metástases, tumores disseminados ou inoperáveis à sua localização e evolução, e geralmente mutila o paciente. A **radioterapia** é considerada a segunda melhor forma de tratamento do câncer, principalmente contra células que se dividem rapidamente e cânceres não amplamente disseminados, porém apresenta severos efeitos colaterais, tais como a debilitação do estado geral do paciente. A **imunoterapia** utiliza-se de vacinas contra certos tipos de cânceres e sua efetividade tem aumentado quando combinada com técnicas de biologia molecular, mas atualmente somente é efetiva contra um pequeno número de células tumorais. A **quimioterapia** utiliza-se de fármacos, sendo útil principalmente para cânceres disseminados e sua efetividade depende do estágio do tumor; possui pequena efetividade contra metástases ou tumores de crescimento lento, induzindo uma grande toxicidade às células normais vizinhas e, além disto, o câncer pode desenvolver resistência aos medicamentos, diminuindo a efetividade do tratamento (Franks e Teich 1990).

Por causa de limitações e efeitos colaterais não desejáveis, que os métodos convencionais possuem no tratamento, um dos constantes desafios da ciência moderna é a busca de novos caminhos para o tratamento do câncer. Dentre estes caminhos a **terapia fotodinâmica (TFD)** se apresenta como técnica em uso clínico contra diversas enfermidades, inclusive o câncer, com a

vantagem de não possuir efeitos colaterais negativos. A TFD utiliza-se de compostos ativados através da luz (fotossensibilizador) e está em desenvolvimento em diversos países, inclusive no Brasil, onde sua aplicação clínica já apresenta sucessos no tratamento. A eficiência da TFD está diretamente relacionada aos fotossensibilizadores (FS) utilizados. Tais compostos devem possuir algumas características específicas (Bonnett 2001):

- a₁) baixa ou nenhuma toxicidade no escuro;
- a₂) bom comportamento farmacocinético, isto é, seletividade pelo tecido tumoral;
- a₃) fácil excreção do corpo do paciente;
- a₄) absorção intensa na região espectral visível, preferencialmente na região $\lambda > 600$ nm, onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes.

Os corantes cianicos com dois cromóforos (BCD) são compostos fotoativos promissores para serem utilizados em TFD por apresentarem:

- b₁) absorção óptica intensa ($\epsilon \approx 10^5$) em $\lambda > 580$ nm;
- b₂) rendimento quântico do estado tripleto relativamente alto ($> 40\%$) já em soluções homogêneas (Ochsner 1997; Kuzmin et al. 1976);
- b₃) alta afinidade com moléculas de DNA (Schaberle 2002) e tensoativos;
- b₄) alta fotocitotoxicidade contra várias linhagens de células malignas mostrada recentemente por nosso grupo de pesquisa.

A ação de muitas drogas é mediada pela membrana biológica. Esta mediação (interação) pode modificar as características físico-químicas da droga, afetando sua efetividade nas aplicações. Por isto, o estudo das interações de drogas com membranas é necessário. Analisando os efeitos da interação nas características das drogas podem-se determinar suas constantes de ligação e a localização na estrutura da célula. Por outro lado, a interação com drogas, em nosso caso com BCD, pode afetar as características da membrana, tais como sua rigidez mecânica (flexibilidade) ou potencial elétrico de sua superfície. Devido à complexidade das membranas biológicas, estes estudos são realizados utilizando modelos de membranas simplificados denominados sistemas modelos biomiméticos. Estes sistemas modelos podem ser agrupados em monocamadas, bicamadas planas, lipossomos ou vesículas (Gennis) e micelas, sendo que, cada modelo apresenta vantagens e desvantagens.

As monocamadas de Langmuir são consideradas um modelo simples, mas muito eficiente (Phillips e Chapman 1968) que pode mimetizar as principais características de uma membrana biológica. A vantagem de se utilizar monocamadas de Langmuir é o controle sobre suas características mecânicas e elétricas. Isto é possível porque se controla o empacotamento dos fosfolipídios, que pode assim mimetizar vários estágios da estrutura da membrana (Pavinatto et al. 2007), além disto, as monocamadas permitem investigar interações entre moléculas em um arranjo com estrutura bem definida (Miñoes et al. 2002).

Filmes fabricados a partir do processo de deposição Langmuir-Blodgett (LB) possuem diversas aplicações tecnológicas tais como memórias, sensores, litografia, dispositivos óticos não lineares, dispositivos eletrônicos (eletrônica molecular), etc (Oliveira Jr 1990, Yang et al. 1994). A técnica LB consiste na transferência das monocamadas formadas na interface ar-água para substratos sólidos (Blodgett 1935; Blodgett e Langmuir 1937). Defeitos como pinholes, fissuras (cracks) e dobras (folds) da estrutura (Yang et al. 1994), na monocamada formada na interface ar-água, podem limitar as aplicações dos filmes LB. Por isto é fundamental conhecer e controlar as propriedades destas monocamadas.

Os corantes orgânicos, em particular, da classe das cianinas, possuem alta afinidade com estruturas celulares, principalmente com ácidos nucléicos (Yarmoluc et al. 2000; Ogulchansky et al. 2000) e por isso são amplamente utilizadas como agentes de contraste em biologia celular. Além de seu potencial em aplicações médicas, também são amplamente usados em vários campos tecnológicos: discos óticos (Tani et al. 2008), fotossensibilizadores em fotografias (James 1977), ótica não linear (Grishina et al. 2008, Owen et al. 1998) etc.

Devido às vantagens acima listadas, neste trabalho utilizaram-se as monocamadas como sistema mimético da membrana biológica e como estruturas importantes da nanotecnologia. O objetivo do estudo é compreender como a incorporação dos BCD na monocamada formada de um fosfolipídio (DPPC), afeta o processo da formação da monocamada, como se modificam as características estruturais e elétricas da monocamada devido à presença de BCD e determinar a localização dos BCD na monocamada. Os estudos foram realizados em função da

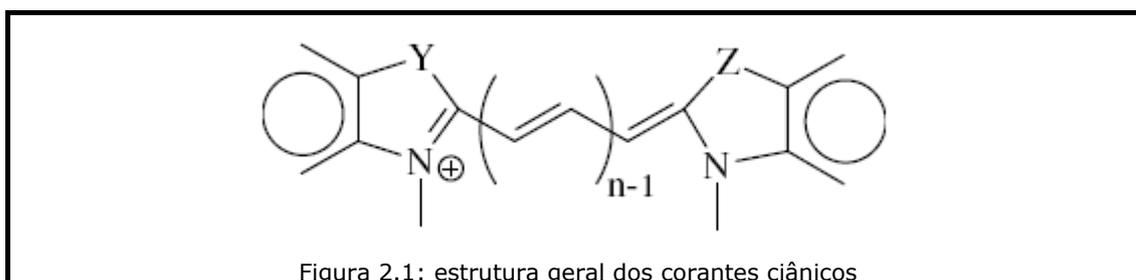
estrutura espacial dos BCD, de sua concentração na monocamada e da influência da força iônica na subfase (0,2 M de NaCl).

Capítulo 2 Base Científica

2.1 Corantes Orgânicos

2.1.1 Corantes Ciânicos

Estruturalmente, os corantes ciânicos (CC), ou simplesmente cianinas, são corantes polimetínicos que podem ser definidos como sais monoácidos em que dois núcleos heterocíclicos, possuindo pelo menos um átomo de nitrogênio, estão ligados por uma cadeia de ligações duplas conjugadas (conjugação- π , figura 2.1). Embora um átomo de nitrogênio seja terciário e o outro quaternário, o grupo ácido não pode ser visto como ligado mais a um do que ao outro nitrogênio. Desta forma, uma cianina é vista como um híbrido de ressonância de duas estruturas canônicas, pois nenhuma fórmula simples fornece uma representação completa do composto (Almeida; Armitage 2005).



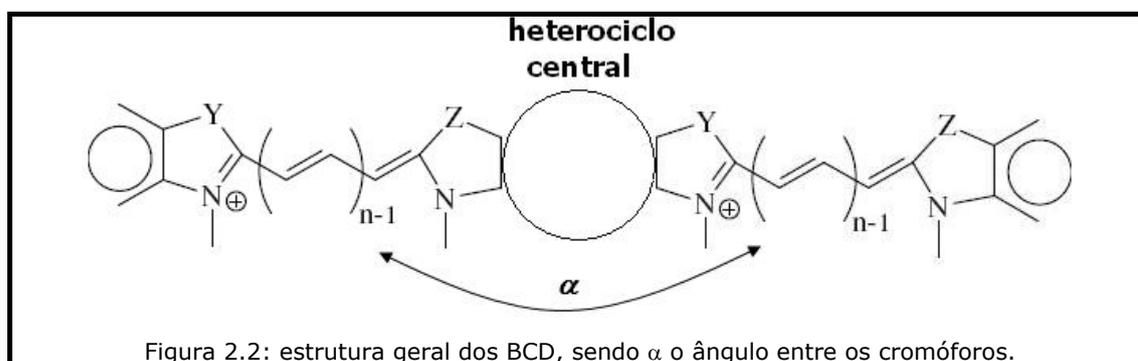
A cor intensa apresentada pelas cianinas está associada à interação de ressonância entre os átomos de nitrogênio nos dois extremos da cadeia conjugada, envolvendo o "movimento" da carga negativa (Almeida). As cianinas podem absorver em um intervalo muito extenso do espectro eletromagnético, desde os 340 nm aos 800 nm, ou seja, desde o ultravioleta até ao infravermelho próximo, devido às diversas variações estruturais. O comprimento de onda de absorção é influenciado, em primeiro lugar e, com efeito, mais significativo, pelo tipo de anel heterocíclico e pelo número de ligações duplas conjugadas entre os dois nitrogênios, ou seja, pelo comprimento da cadeia metínica. Em segundo lugar, pela simetria, ou não, dos anéis heterocíclicos presentes, pela natureza do grupo alquila, pelos substituintes presentes tanto na cadeia metínica, como nos anéis, etc. Outras variações igualmente importantes são a natureza do contra-

íon, que vai condicionar a solubilidade e o grau de cristalização das cianinas, e a rigidez do sistema conjugado que aumenta drasticamente a fluorescência destes.

Os espectros de absorção das cianinas apresentam tipicamente curvas de absorção estreitas (~ 80 nm na base) e afiladas, o que lhes confere cores límpidas e brilhantes, com absortividades molares máximas elevadas, desde $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nas monometinocianinas até $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nas cianinas de maior cadeia (tri- e pentametinocianinas). No entanto, verifica-se que para maiores cadeias, a partir das heptametinocianinas, estes valores começam a diminuir.

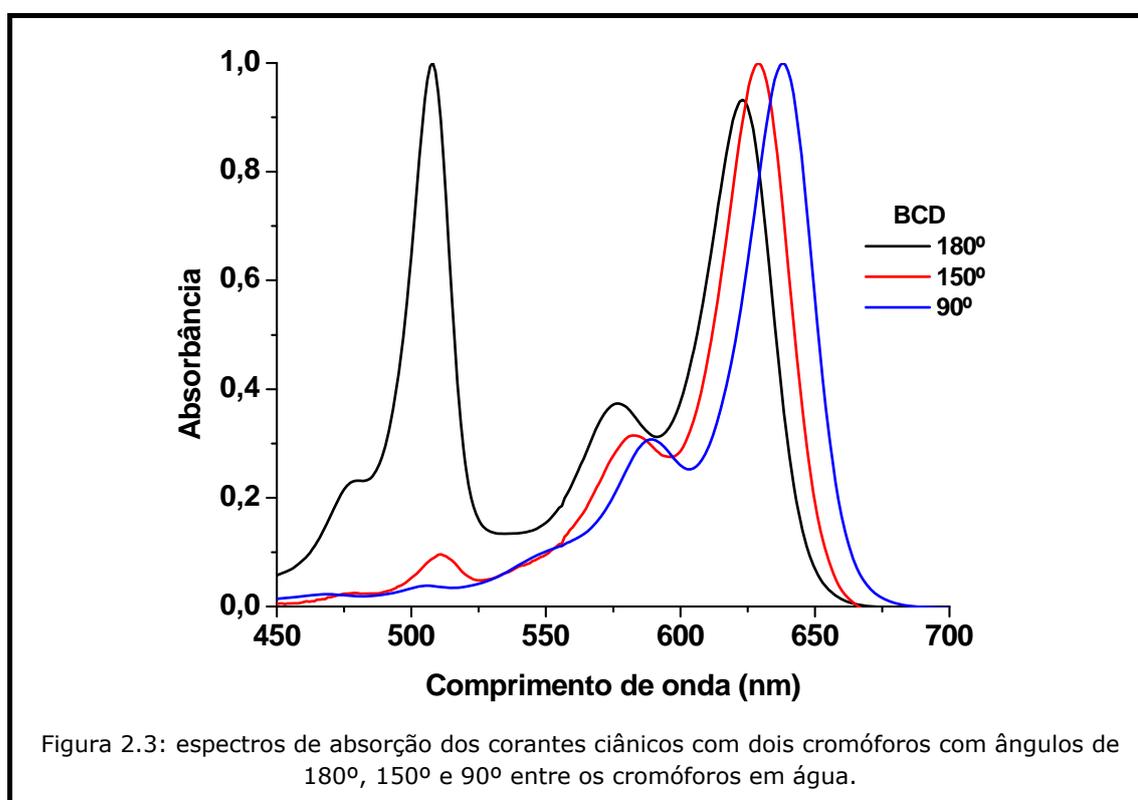
2.1.2. Corantes Ciânicos com dois Cromóforos

Para deslocar o espectro de absorção do corante ciânico para região de maiores comprimentos de onda e aumentar suas absortividades molares é necessário aumentar o comprimento de sua cadeia polimetínea. Isto torna a estrutura do corante mais flexível e menos estável, diminuindo os tempos de vida e rendimentos quânticos dos seus estados excitados e sua estabilidade química. Outro fator negativo dos CC é o processo de fotoisomerização da sua cadeia polimetínea, que também diminui os tempos de vida e rendimentos quânticos dos seus estados excitados, diminuindo assim sua fotoatividade. Os corantes ciânicos com dois cromóforos (bichromophoric cyanine dye, BCD) pertence à classe dos CC, sendo uma combinação de dois monômeros de CC (figura 2.2) que se diferenciam pelo ângulo entre os cromóforos (Kuzmin et al. 1976). A combinação de dois monômeros reduz o tamanho da cadeia polimetínea, diminuindo assim, os fatores negativos acima listados. A estrutura do heterociclo central determina o ângulo entre os cromóforos e a interação entre eles.

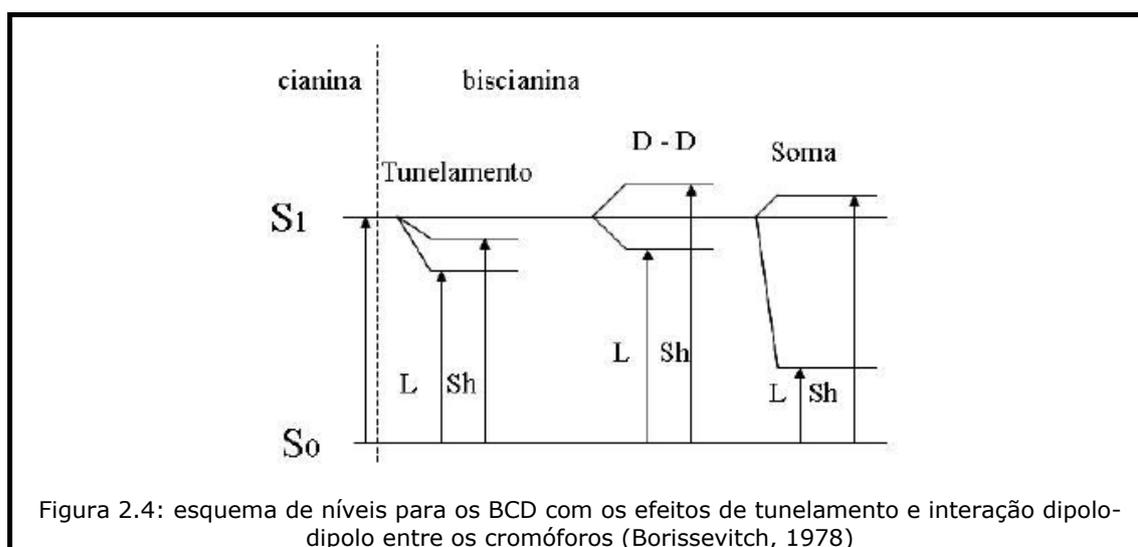


Os BCD possuem alta absorção ótica na região visível com ϵ maior que o dos CC, e tem rendimento quântico do estado tripleto (ϕ_T) relativamente alto (> 20%) já em soluções homogêneas (Borisevitch et al. 1976). Além disto, diferentemente dos CC, os BCD não sofrem fotoisomerização e o deslocamento dos comprimentos de onda da sua banda de absorção pode ser realizado não pelo aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π , mas pela variação da interação entre os seus cromóforos (Schaberle 2007).

Uma propriedade particular dos BCD é a presença de duas bandas de absorção (figura 2.3) na região espectral visível, cujas intensidades relativas dependem do ângulo entre os cromóforos. O aparecimento destas duas bandas ocorre pela interação entre os cromóforos dos BCD por dois mecanismos: interação dipolo-dipolo entre os cromóforos e o tunelamento do elétron de um cromóforo para outro através do heterociclo central (Cantor e Schimmel 1980, Borissevitch 1978).



As interações, acima citadas, dependem do ângulo entre os cromóforos, da estrutura do heterociclo central e do comprimento das cadeias polimetíneas. Os cálculos mostram que para um corante cianico com um cromóforo é esperada apenas uma transição eletrônica S_0-S_1 , no entanto, para os BCD ocorre o desdobramento (*splitting*) deste nível, dando origem a duas transições eletrônicas. Este desdobramento ocorre pela soma dos efeitos de tunelamento e de interação dipolo-dipolo (figura 2.4) (Borissevitch 1978).



2.2 Membranas Biológicas e Monocamadas de Langmuir

2.2.1. A evolução dos modelos de membrana

As primeiras idéias sobre a existência de algum tipo de membrana foram apresentadas por Schleiden e Schwann em 1839. Após este fato, inúmeros estudos/experimentos se seguiram. É interessante observar que a maioria destes estudos indicava ou determinava características elétricas das membranas como diferença de potencial, resistência e capacitância. A partir das medidas de capacitância, realizadas por Fricke em 1923, foi sugerido que as membranas teriam dimensões moleculares (Robertson 1981). A hipótese de que a bicamada lipídica seria uma característica fundamental das membranas foi sugerida pela primeira vez por Gorter e Grendel em seu trabalho com células vermelhas de sangue em 1925 (Gorter e Grendel 1925).

Em 1935, Danielli e Davson apresentaram um modelo da estrutura celular que posteriormente eles generalizaram na teoria "*pauci-molecular*", a qual dizia que todas as membranas biológicas tinham um núcleo, denominado "*lipoid*", limitado por monocamadas de lipídios com as cabeças polares dos lipídios apontados para fora e cobertos por monocamadas de proteínas (figura 2.5 a). Na década de 50, com o advento do microscópio de elétron, um novo modelo de membrana foi proposto: "*unit membrane model*" (figura 2.5 b). Neste modelo, as membranas seriam constituídas de uma bicamada lipídica com as cabeças polares dos lipídios apontadas para fora e cobertas por monocamadas de moléculas não lipídicas com uma preponderância de carboidratos na superfície externa (Robertson 1981). Este modelo foi construído tendo como base o modelo de Danielli e Davson, diversos trabalhos (Robertson 1957, Robertson 1958) de Robertson e na teoria da "*unit-membrane*" também desenvolvida por ele (Robertson 1960, Robertson 1963). Por estes fatos, o "*unit membrane model*", às vezes é denominado de modelo Danielli-Davson-Robertson (DDR).

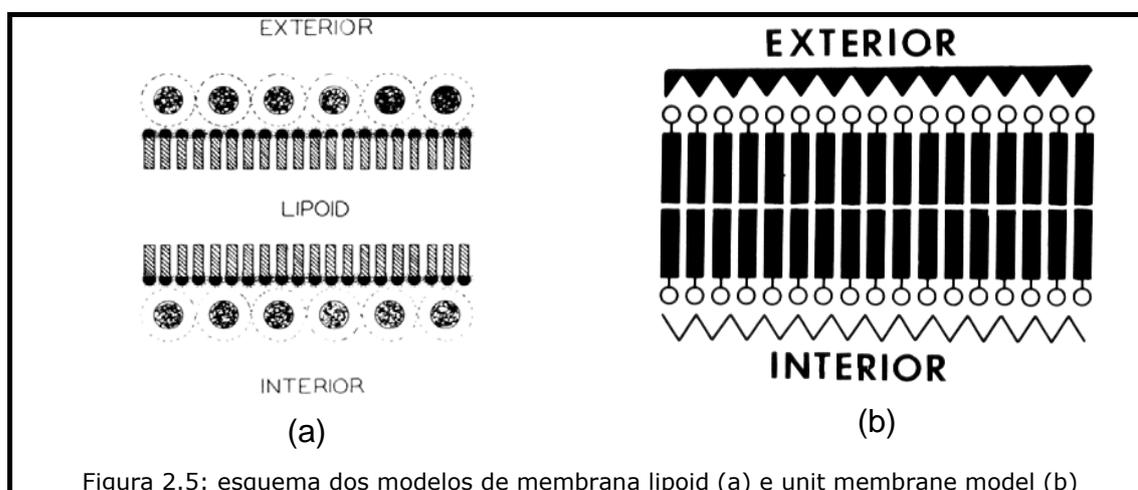
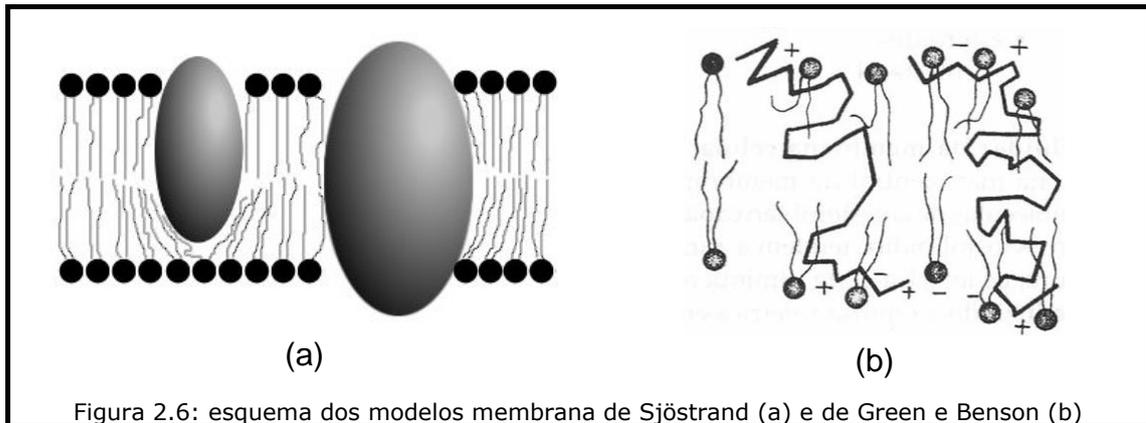
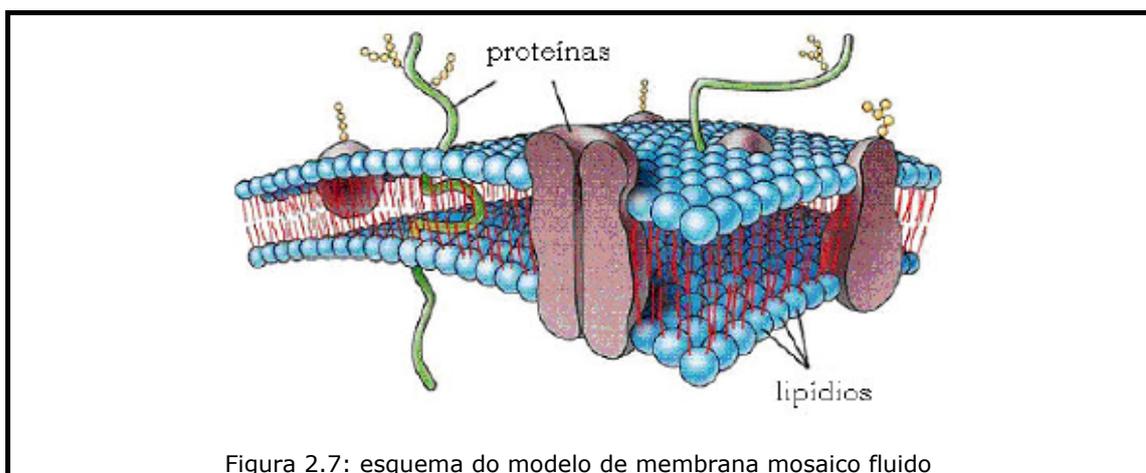


Figura 2.5: esquema dos modelos de membrana lipoid (a) e unit membrane model (b)

Na década seguinte, modelos alternativos ao modelo da "*unit-membrane*" foram propostos. Dentre estes, pode-se citar os modelos de Sjöstrand, Lenard e Singer (Figura 2.6 a), Green e Benson (Figura 2.6 b). A base destes modelos era que a bicamada não era a estrutura dominante, mas que as moléculas de lipídios estavam arranjadas em vários padrões na membrana (Robertson 1981).



O modelo de membrana aceite atualmente e que já passou por algumas modificações, foi proposto primeiramente em 1972 por Singer e Nicholson e é denominado **modelo mosaico fluido** (figura 2.7) (Singer e Nicholson 1972). Neste modelo, a bicamada é retomada, e as proteínas adquirem uma nova distribuição. As proteínas encontram-se parcial ou totalmente embebidas na bicamada, flutuando neste “mar” de moléculas de lipídios (Robertson 1981, Singer e Nicholson 1972), além de poder se difundir lateral e rotacionalmente (Jones e Chapman 1995). De acordo com este modelo, os lipídios são responsáveis pelo isolamento do interior celular e servem como matriz para as proteínas que regulam as trocas de substâncias e a comunicação entre o meio intra e extracelular (Wisniewska et al. 2003).



Os lipídios da membrana são moléculas com carácter anfifílico, ou seja, possuem um grupo apolar (hidrofóbico) e outro polar (hidrofílico) que pode ou

não conter cargas. Assim pode-se dizer que a estrutura da membrana é composta por três regiões distintas, caracterizadas por diferentes constantes dielétricas (ϵ) (Tanford 1980):

- a₁) região interna hidrofóbica: formada pela parte apolar das moléculas de fosfolípidios. Esta região não contém água e é caracterizada por uma baixa constante dielétrica.
- a₂) região superficial: formada pela parte polar do fosfolípido.
- a₃) região intermediária: compreendida entre a parte polar da membrana e o meio aquoso e é caracterizada pelo alto gradiente de constante dielétrica numa distância que varia de acordo com a força iônica do meio.

Entre os modelos de membrana biológica as monocamadas de Langmuir apresentam algumas vantagens com relação aos outros modelos: são planas, homogêneas e estáveis (Eeman et al. 2006).

2.2.2. Monocamadas de Langmuir

As monocamadas são películas monomoleculares formadas na interface ar-água, podendo ter composição e grau de compactação variável (Caseli 2005). Algumas vantagens das monocamadas de Langmuir são: ausência do efeito de curvatura, como ocorre com as vesículas, e o controle preciso do empacotamento (Brockman 1999).

A denominação monocamada de Langmuir deve-se a técnica mais antiga empregada para se caracterizar uma monocamada: a balança (cuba) de Langmuir (Jones e Chapman 1995), mostrada na figura 2.8. A balança de Langmuir permite controlar a densidade de moléculas na interface através do controle da área por molécula, ou seja, pelo posicionamento das barreiras. Desta forma, as propriedades da monocamada são controladas, por isto, a monocamadas é um modelo de membrana muito útil.

A técnica de Langmuir é baseada no espalhamento de uma substância anfifílica na interface ar-água, sendo que essa substância deve apresentar características de insolubilidade e apresentar um coeficiente de espalhamento favorável à ocorrência desse processo, ou seja, deve se orientar na interface de forma a minimizar sua energia livre (Langmuir 1917). Na figura 2.9 é mostrado um esquema da formação de monocamada de Langmuir dividida em três partes:

- b₁) espalhamento das moléculas na interface ar-água;
- b₂) etapa de compressão;
- b₃) monocamada no estado condensado.

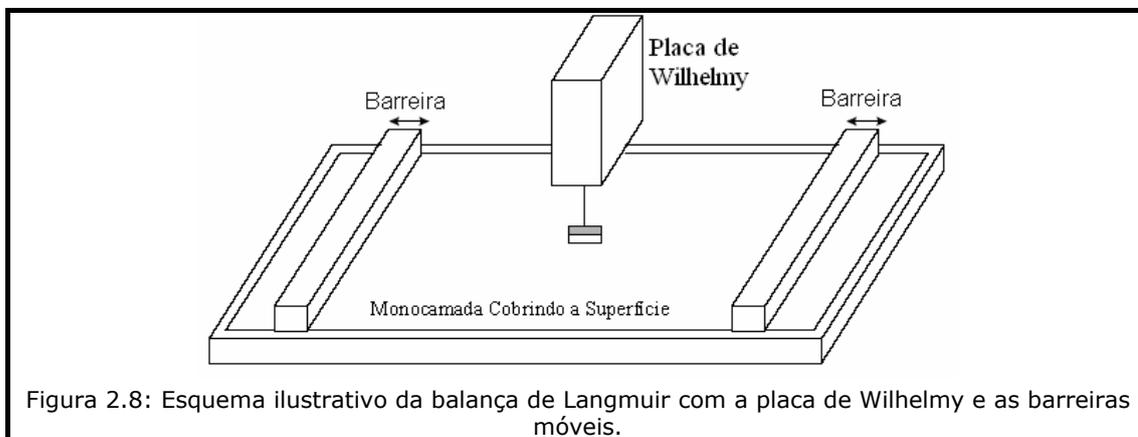


Figura 2.8: Esquema ilustrativo da balança de Langmuir com a placa de Wilhelmy e as barreiras móveis.

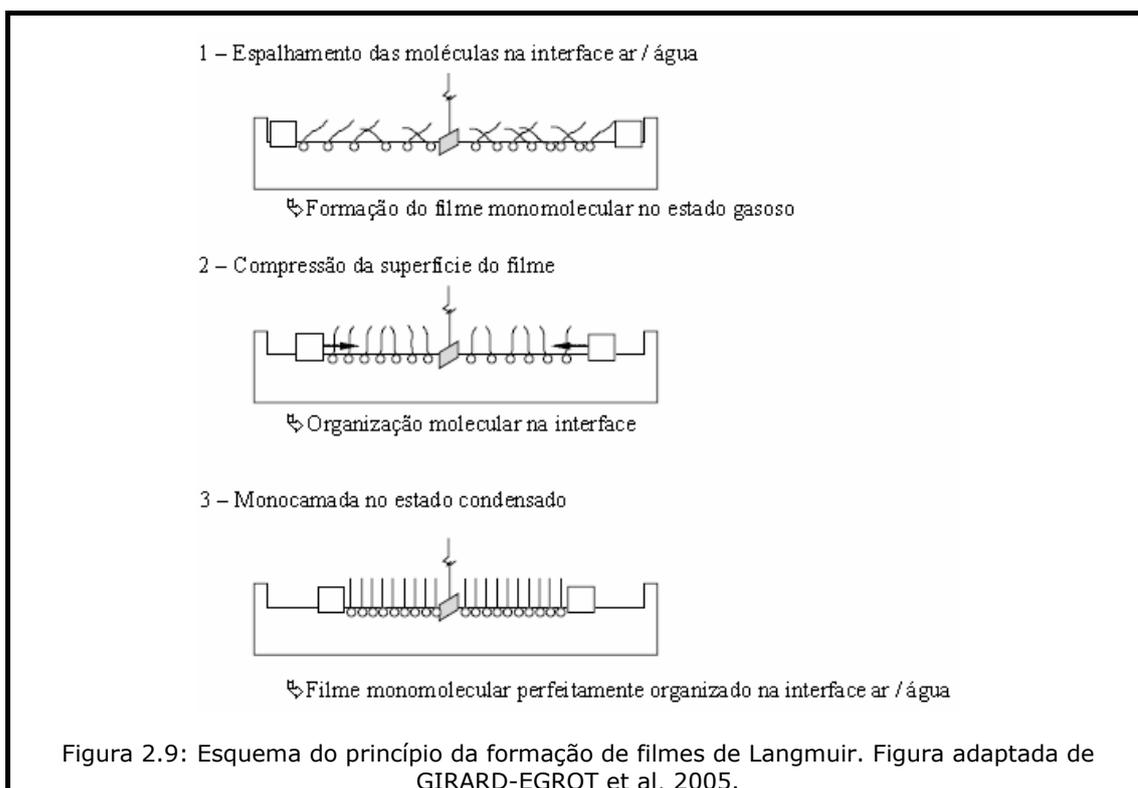


Figura 2.9: Esquema do princípio da formação de filmes de Langmuir. Figura adaptada de GIRARD-EGROT et al. 2005.

O processo de formação e as técnicas de estudo das monocamadas Langmuir e suas características, são mais detalhadamente discutidas no Capítulo 3.

Capítulo 3 Teoria dos Métodos Experimentais

3.1. Introdução

Neste capítulo são descritos os métodos e técnicas utilizadas para a caracterização das monocamadas de Langmuir. Para a realização do presente trabalho foram utilizados equipamentos disponíveis no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), no Departamento de Física e Matemática (DFM) e no Departamento de Química (DQ) ambos da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP).

3.2. Técnicas de caracterização das monocamadas de Langmuir

Há várias técnicas que são utilizadas para a caracterização das monocamadas. Neste trabalho foram utilizadas as técnicas, ditas convencionais, pressão superficial e potencial superficial, além de microscopia de ângulo Brewster e absorção ótica. Nesta seção, tais técnicas são descritas de maneira sucinta.

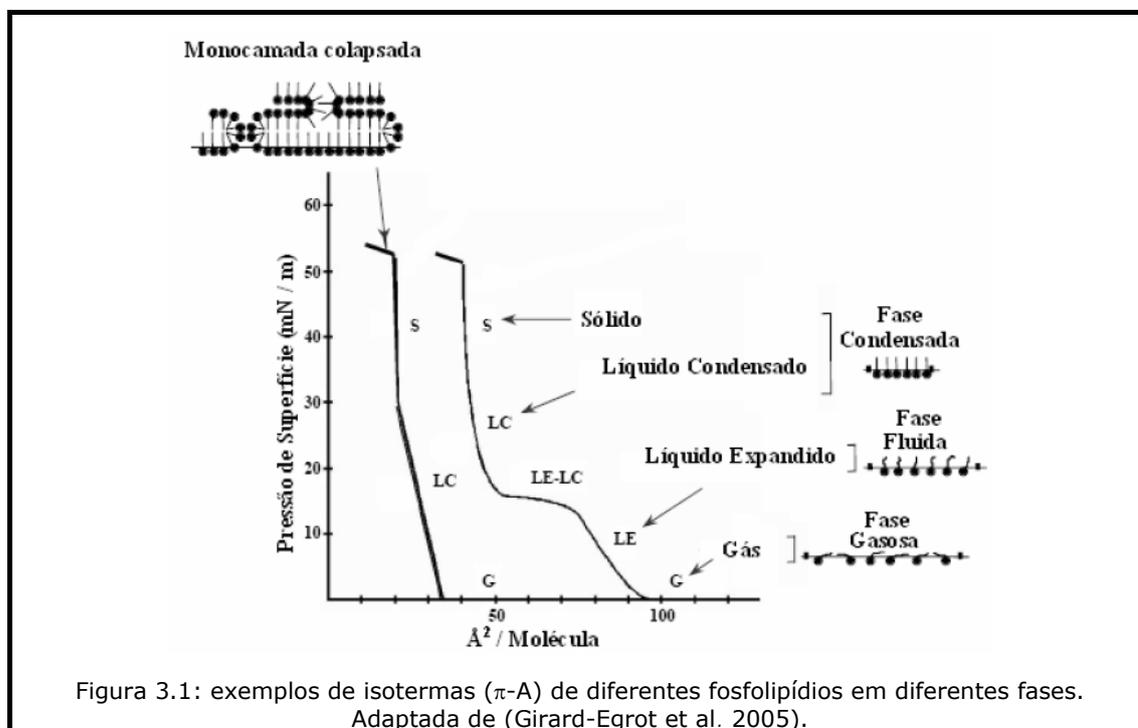
3.2.1. Pressão Superficial (π)

As moléculas anfifílicas na superfície de uma solução aquosa reduzem sua tensão superficial de um valor γ_0 , característico a essa solução, para outro valor γ . A diferença entre a tensão superficial na ausência e na presença das moléculas anfifílicas é definida como pressão superficial (π):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.1)$$

Ao comprimir a monocamada através das barreiras móveis (vide figura 2.9), a área média ocupada por uma molécula anfifílica na superfície diminui, e como conseqüência, aumenta a densidade superficial de moléculas, diminui a distância e aumenta a interação entre elas. Isto, por sua vez, provoca o aumento da pressão superficial. Desta forma obtém-se uma curva de pressão superficial em função da área média por molécula (normalmente na ordem de ângströms

quadrados (\AA^2), figura 3.1). Esta curva é denominada isoterma de pressão superficial (π -A) e através dela podem ser identificadas várias fases da monocamada e transições entre estas fases.



Na figura 3.1 estão indicadas regiões distintas que representam as possíveis fases que uma monocamada pode adquirir. Abaixo segue a denominação e descrição de cada fase (Ferreira et al. 2005):

- a₁) fase gasosa (G): as moléculas estão muito distantes umas das outras, não há interação entre elas e a orientação das caudas hidrofóbicas no espaço é aleatória (podem até estar "deitadas" na superfície). A pressão superficial nesta fase é aproximadamente zero;
- a₂) fase líquida-expandida (LE): quando as moléculas se aproximam, de tal modo que uma pode sentir sua vizinha mais próxima, e as caudas ainda orientadas aleatoriamente possuem menor inclinação em relação à vertical. No fim desta fase começam aparecer os primeiros domínios da monocamada;
- a₃) transição de fase líquida expandida/líquida condensada (LE/LC): coexistência das fases LE e LC. O número de domínios aumenta e ocorre a aproximação destes;

- a₄) fase líquida condensada (LC): as moléculas estão mais próximas, podendo ocorrer o contato físico entre elas (aproximação dos domínios);
- a₅) fase condensada (C) ou sólida (S): o empacotamento das moléculas é tal que todas as caudas estão orientadas verticalmente. Uma maior compressão da monocamada provoca o colapso;
- a₆) colapso da monocamada: desorganização da estrutura monomolecular, podendo formar bicamadas e multicamadas, e também a dissolução do anfifílico na subfase.

3.2.1.1 Módulo de Compressibilidade Superficial (C_s^{-1})

O módulo de compressibilidade superficial é definido matematicamente como:

$$C_s^{-1} = -A \frac{\partial \pi}{\partial A} \quad (3.2)$$

em que π é a pressão superficial e A é a área considerada.

A magnitude de C_s^{-1} está relacionada ao estado da formação do filme, sendo tanto maior quanto mais condensada for a monocamada. De acordo com (Davies e Rideal 1963) existe uma correlação entre os estados da monocamada e os valores de C_s^{-1} .

3.2.2 Potencial Superficial (ΔV)

Medidas de potencial superficial (ΔV) é outra possibilidade de controlar o estado da monocamada no nível microscópico monitorando as variações das características elétricas do filme devidas à orientação das moléculas anfifílicas na superfície. No entanto, é muito difícil discriminar diretamente quais são os processos microscópicos que contribuem na voltagem macroscópica medida (Taylor et al. 1990). Devido a estas dificuldades, os modelos encontrados na literatura ainda são considerados incompletos.

Os modelos mais conhecidos são (Taylor et al. 1990, Demchak e Fort 1974, Vogel e Möbius 1988):

- b₁) de Helmholtz: relaciona as variações de potencial superficial com as variações do momento de dipolo médio das moléculas que formam a monocamada;
- b₂) de Demchak e Fort (DF): considera a monocamada como um capacitor de três camadas;
- b₃) de Vogel e Möbius (VM): este modelo se difere do anterior por considerar a monocamada como um capacitor de somente duas camadas.

Neste trabalho utilizou-se o modelo de Demchak e Fort (figura 3.2), pois até o momento, este modelo tem sido a melhor aproximação para análises quantitativas de dados do potencial superficial (Taylor et al. 1990). Cada camada do capacitor é caracterizada por um momento de dipolo (μ_i) e pela permissividade relativa (ε_i), conforme mostra figura 3.2.

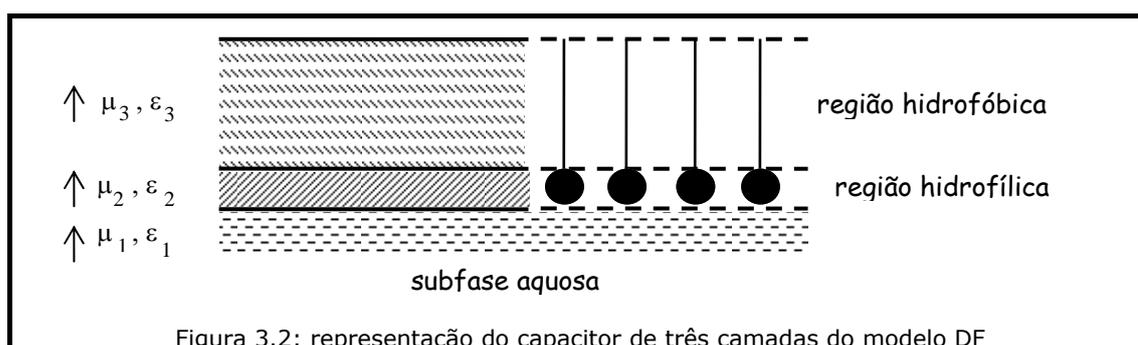


Figura 3.2: representação do capacitor de três camadas do modelo DF

Matematicamente, o potencial superficial no modelo DF é definido:

$$\Delta V = \Delta V_1 + \Delta V_2 + \Delta V_3 = \left(\frac{\mu_1}{\varepsilon_1} + \frac{\mu_2}{\varepsilon_2} + \frac{\mu_3}{\varepsilon_3} \right) \times \frac{1}{A \varepsilon_0} \quad (3.3)$$

em que A é a área média ocupada por molécula; μ_1 é o momento de dipolo das moléculas de água reorientadas na interface devido à presença da monocamada; μ_2 é o momento de dipolo da cabeça polar do fosfolipídio; μ_3 é o momento de dipolo da cauda hidrofóbica do fosfolipídio.

Se a monocamada for ionizada, deve-se somar a contribuição dos momentos de dipolos das três camadas e o potencial ψ , expresso pela teoria de

Gouy-Chapman (Davies e Rideal 1961, Cevc e Marsh 1987). O potencial ψ é dado pela seguinte equação:

$$\Psi = \frac{2kT}{e} \operatorname{senh}^{-1} \frac{e\alpha}{A(5.88 \cdot 10^{-7} c \varepsilon T)^{1/2}} \quad (3.4)$$

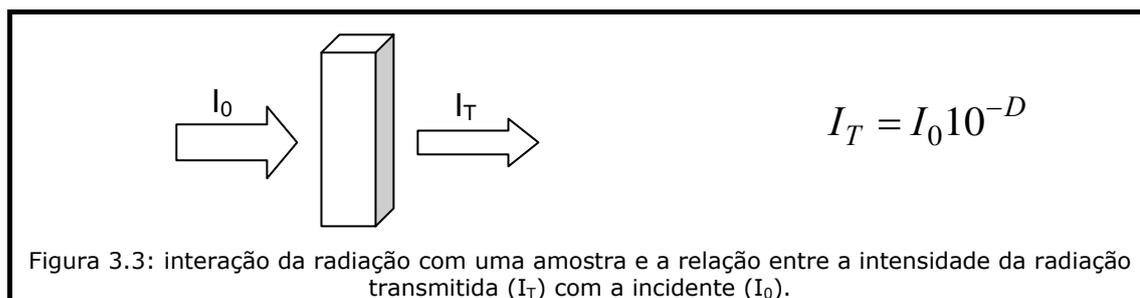
em que e é a carga elementar, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, α é o grau de ionização, A é a área média por molécula, c é a força iônica na subfase em mol/L e ε é a constante dielétrica do meio.

3.2.3 Espectroscopia de absorção na região de ultravioleta e visível

Informações sobre a estrutura molecular e sobre a interação de moléculas com seus vizinhos podem ser obtidas de diversos modos a partir dos espectros de emissão e/ou de absorção, gerados quando a radiação interage com os átomos e/ou moléculas da matéria (Alcântara Jr. 2002). A interação da radiação, que compreende a região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, promove transições eletrônicas entre os diferentes níveis de energia da molécula. Estas transições eletrônicas ocorrem quando um átomo ou molécula absorve um fóton de energia $h\nu$. Desta forma, o átomo ou molécula em um estado inicial i com energia E_i pode mudar para um estado final f com energia E_f pela absorção da radiação de frequência ν , então:

$$E_f - E_i = h\nu \quad (3.5)$$

A absorção da radiação é caracterizada pela absorbância da amostra, determinada pela lei de Lambert-Beer. Essa lei descreve a intensidade de radiação transmitida I_T através de uma amostra absorvente a partir da intensidade de radiação incidente I_0 (figura 3.3).



em que D é a absorvância da amostra. A absorvância D equivale a εCl , em que C é a concentração do composto na amostra, l é a extensão do caminho óptico e ε é o coeficiente de absorção molar. O perfil de ε em função de comprimento de onda, $\varepsilon(\lambda)$ é uma característica intrínseca de cada composto. A unidade do ε é $M^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Como a intensidade de luz absorvida é $I_A = I_0 - I_T$,

$$I_A = I_0(1 - 10^{-D}) \quad (3.6)$$

Se a amostra contiver mais de uma espécie absorvedora, a absorvância de cada composto contribui separadamente com a diminuição da intensidade transmitida I_T , resultando na forma mais geral da lei de Lambert-Beer:

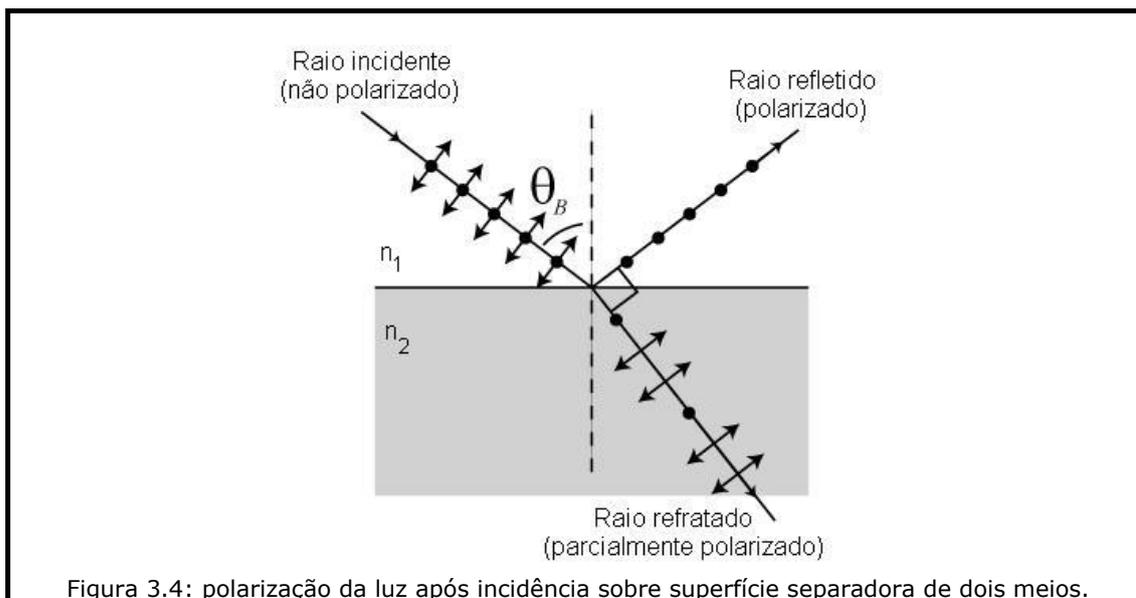
$$I_T = I_0 10^{-(\varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2 + \dots + \varepsilon_n C_n)l} \quad (3.6)$$

na qual, a absorvância de uma amostra é a soma de cada absorvância das espécies individuais. Isso possibilita analisar a presença e o conteúdo de diversas espécies em equilíbrio dentro de uma amostra.

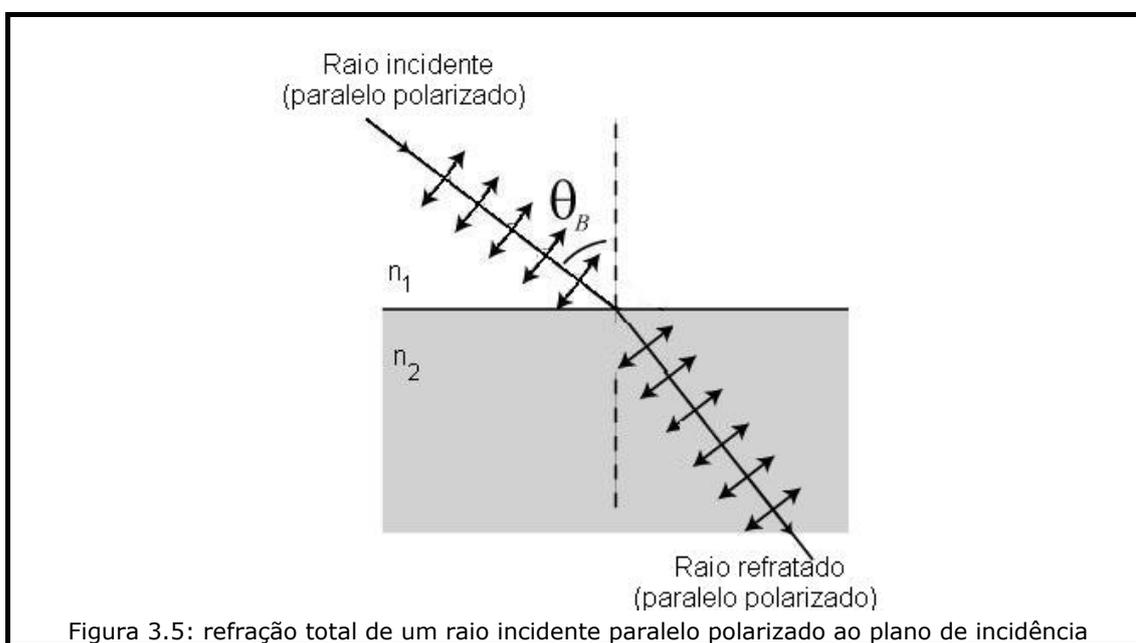
3.2.4 Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)

O grande interesse em se caracterizar/conhecer morfologicamente monocamadas formadas na interface ar-água, ou seja, identificar os domínios característicos das fases da monocamada (Miñones Jr. et al. 2002, Patino et al. 1999) conduziram ao desenvolvimento da técnica de microscopia no ângulo de Brewster (BAM) (Héron e Meunier 1991).

O princípio do método se baseia no fenômeno de Brewster. Quando sobre uma superfície, que separa dois meios com índices de refração distintos $n_1 < n_2$, é incidida luz sob ângulo de incidência θ_B , sendo $\text{tg}(\theta_B) = \frac{n_2}{n_1}$, a luz refletida se torna totalmente polarizada perpendicularmente ao plano de incidência, conforme ilustra figura 3.4.



Então, se sobre esta superfície for incidida luz polarizada paralela ao plano de incidência com o mesmo ângulo de incidência θ_B , a intensidade da luz refletida torna-se zero, conforme mostra figura 3.5



Então, ao incidir uma luz polarizada paralela a interface ar-água, na ausência da monocamada, não haverá luz refletida. A monocamada possui índice de refração, distinto em cada fase, devido à formação dos domínios. Então, na presença da monocamada haverá luz refletida. Em geral, a intensidade da luz

refletida depende da espessura, rugosidade e anisotropia da monocamada que permite a obtenção de imagens da estrutura dos domínios que formam a monocamada e alteram o contraste das imagens.

Na figura 3.6 é mostrado, esquematicamente, o arranjo experimental utilizado para a obtenção das imagens pela BAM.

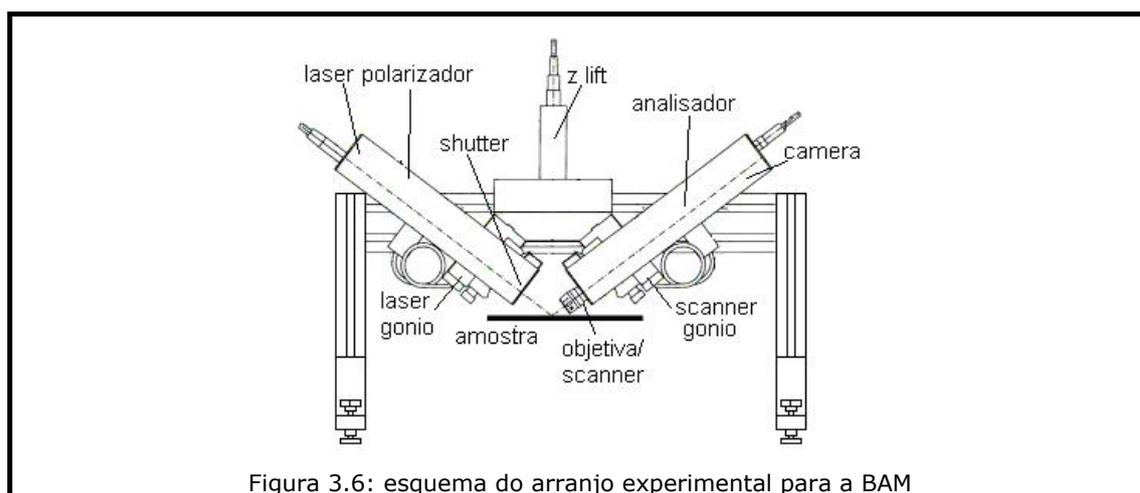


Figura 3.6: esquema do arranjo experimental para a BAM

Dentre as informações que a técnica de BAM permite obter, pode-se citar:

- c₁) a morfologia de monocamadas formadas por moléculas anfifílicas (Gehlert et al. 1998, Deschenaux et al. 1997, Vollhardt 1996);
- c₂) a orientação dos domínios na monocamada (Brezesinskin et al. 1995, Overberck et al. 1994);
- c₃) estimativa da espessura relativa da monocamada (Patino et al. 1999, Miñones Jr. et al. 2002).

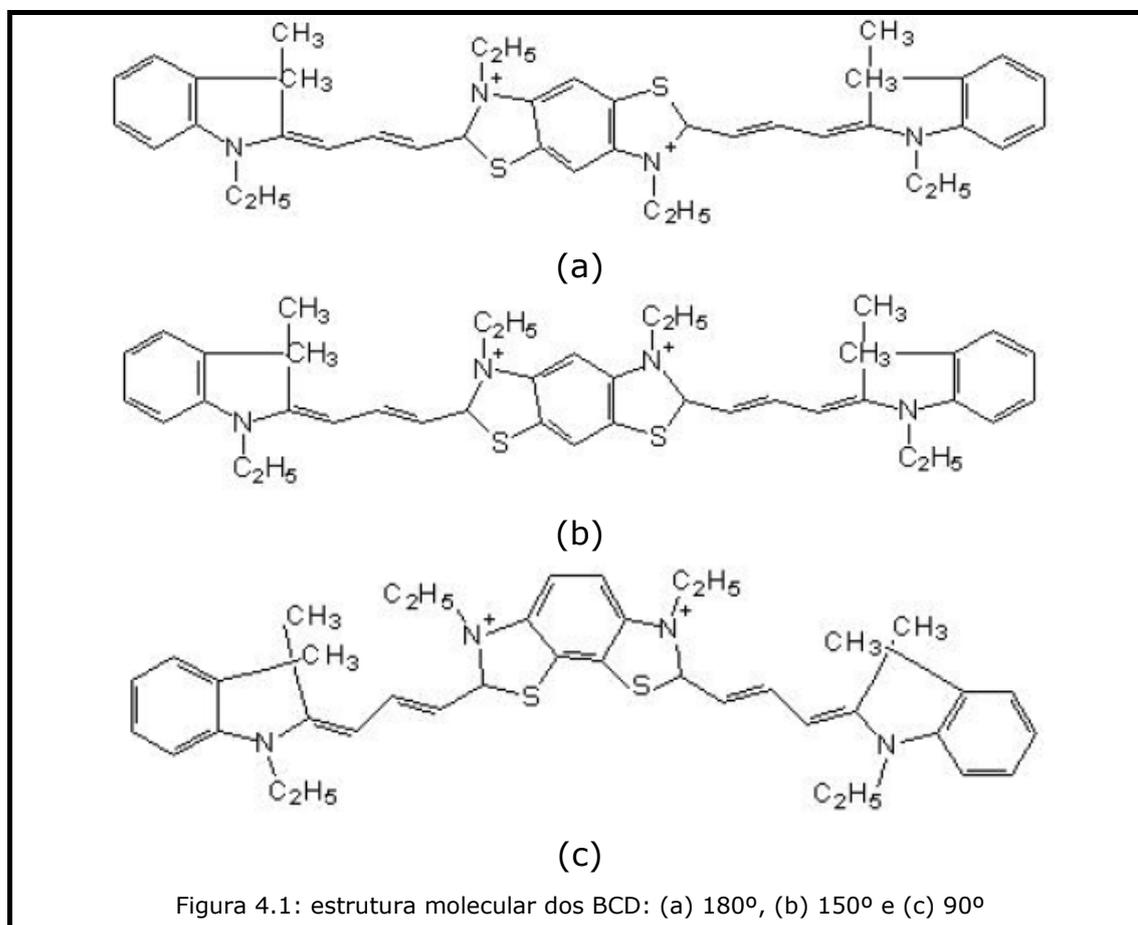
Capítulo 4 Materiais e Métodos

4.1 Introdução

Neste capítulo é apresentada a descrição das técnicas utilizadas na fabricação e caracterização das monocamadas de Langmuir, assim como, o fosfolipídio utilizado para formar as monocamadas e o objeto de estudo: corantes cianicos com dois cromóforos.

4.2 Objetos de estudo

Os corantes cianicos com dois cromóforos, BCD, utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciências da Ucrânia na forma de sais de cloreto [*Corante*⁺⁺*Cl*₂]. Estes corantes possuem peso molecular de 653 g/mol e são estruturalmente distintos devido ao ângulo existente entre os cromóforos: 180°, 150° e 90°, conforme mostra figura 4.1.



4.3 Fosfolipídio DPPC

Para a formação das monocamadas de Langmuir foi utilizado o fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, figura 4.2), obtido da "Sigma Chemical Co". O DPPC é um fosfolipídio zwitteriônico e é um dos principais constituintes da membrana celular. Devido à grande quantidade de estudos realizados com monocamadas de DPPC, estas podem ser consideradas bem caracterizadas (Klopfer e Vanderlick 1996), auxiliando assim o entendimento das interações DPPC-BCD observadas neste trabalho.

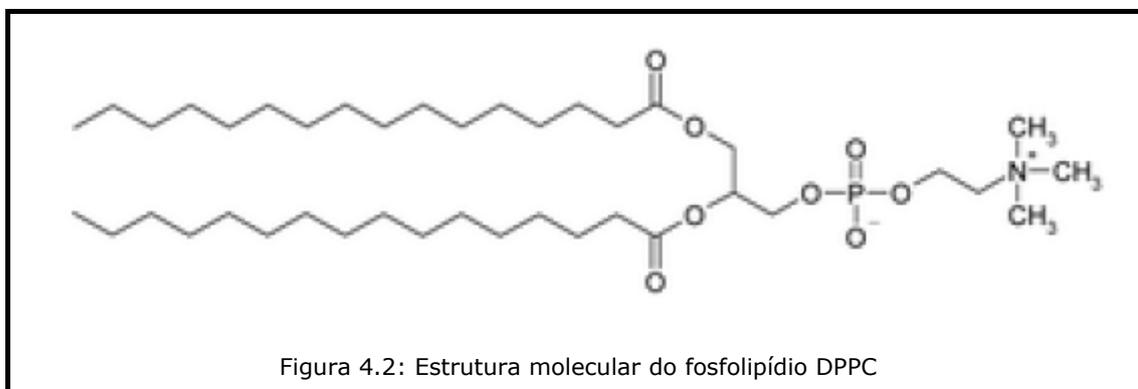


Figura 4.2: Estrutura molecular do fosfolipídio DPPC

4.4 Preparação das amostras

As soluções estoques de DPPC e de BCD foram, ambas, preparadas em clorofórmio obtido da Merk de grade HPLC. Estas soluções estoque foram preparadas com concentração de aproximadamente 0,7 mg/ml. Para determinar a concentração dos BCD foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis "Beckman Coulter – DU 640"

4.5 Fabricação e caracterização das monocamadas de Langmuir

As monocamadas foram fabricadas utilizando uma cuba de Langmuir, modelo KSV 5000, de dimensões 530 mm x 150 mm, com duas barreiras móveis e aparatos para caracterização da monocamada (sensores de pressão e potencial). Este equipamento estava montado em uma sala limpa, no laboratório

de Polímeros Prof. Bernhard Gross no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), com temperatura de $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$. Como subfase utilizou-se água ultrapura (Milli-Q) caracterizada por resistividade $18,2 \text{ M}\Omega$ e pH 5,9 adquirida do sistema Milli-Q, acoplado a unidade Milli-RO de osmose reversa (Millipore) e água Milli-Q+NaCl (0,2M).

Foram espalhados $100 \mu\text{L}$ de soluções mistas de DPPC+%BCD a subfase aquosa. A quantidade de solução de BCD misturada à solução de DPPC foi calculada a partir da porcentagem de mols de BCD ($\%_{BCD}$), conforme expressão (4.1):

$$\left(\frac{n_{BCD}}{n_{DPPC}} \right) \times 100 = \%_{BCD} \quad (4.1)$$

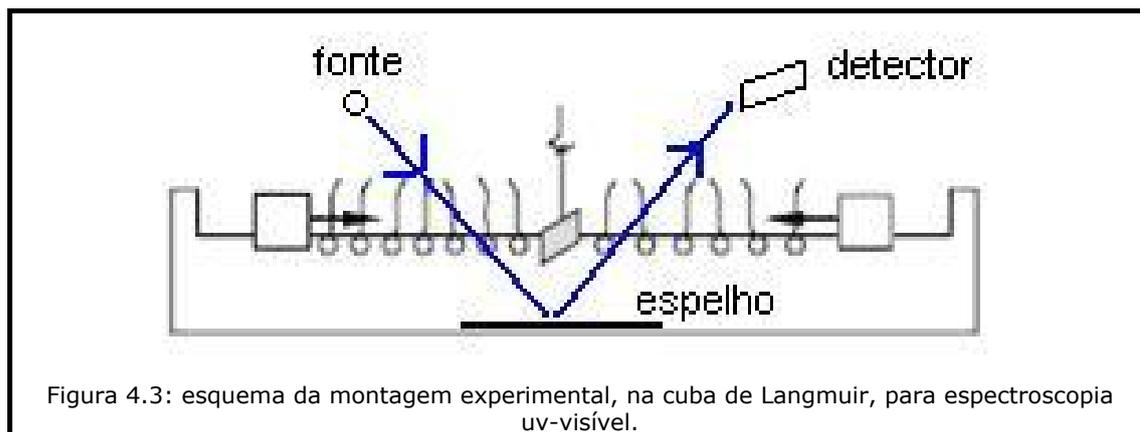
em que n_{BCD} e n_{DPPC} são respectivamente, o número de mols de BCD e de DPPC. Foram fabricadas monocamadas com as seguintes porcentagens de BCD: 0, 3, 7, 12, 17, 23.

As isotermas de pressão superficial (π -A) e potencial superficial (ΔV -A) são registrados enquanto as barreiras móveis comprimem a monocamada com velocidade constante de 20 mm/min. A pressão superficial foi medida com acurácia de 0,1 mN/m utilizando uma placa de Wilhelmy, tendo como sensor um filtro de papel de alta qualidade de dimensões 1 cm x 2 cm, conectada a uma eletrobalaça. Para as medidas de potencial superficial foram utilizadas uma placa vibrante (frequência 144,3 Hz), método de Kelvin ou do capacitor vibrante, posicionada aproximadamente a 2 mm acima da superfície da água. Tanto a placa vibrante quanto o eletrodo de referência imerso na subfase são de platina. Para cada monocamada fabricada, foram obtidas no mínimo três isotermas (π -A) e (ΔV -A), portanto, os resultados apresentados neste trabalho são as isotermas médias.

A técnica de absorção ótica foi realizada *in situ*, ou seja, na própria cuba de Langmuir (figura 4.3). Para tanto, utilizou-se:

- a₁) um diodo emissor de luz branca (LED), como fonte de radiação, que era incidida sobre a monocamada;
- a₂) um espelho plano, localizado no fundo da cuba de Langmuir, que tinha por função refletir a luz do LED;

- a₃) uma fibra ótica para capturar a luz refletida pelo espelho plano;
- a₄) um espectrômetro ao qual a fibra ótica foi acoplada. O espectrômetro utilizado é da Ocean Optics, modelo USB2000, que possui 2048 detectores do tipo CCD dispostos em linha num arranjo que permite uma medição numa única varredura de todo o espectro visível (~350 nm a 950 nm). A luz capturada é analisada por meio de um software desenvolvido em LabView.



As medidas de microscopia de Brewster foram feitas em uma cuba NIMA modelo 702BAM montada na mesma sala limpa mencionada acima. A interface ar-monocamada-água foi irradiada com um ângulo de 52.8°. Para a formação da monocamada nesta cuba foram espalhados 80 μ L das soluções mistas de DPPC+%BCD. A velocidade de deslocamento das barreiras foi de 40 mm/min.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

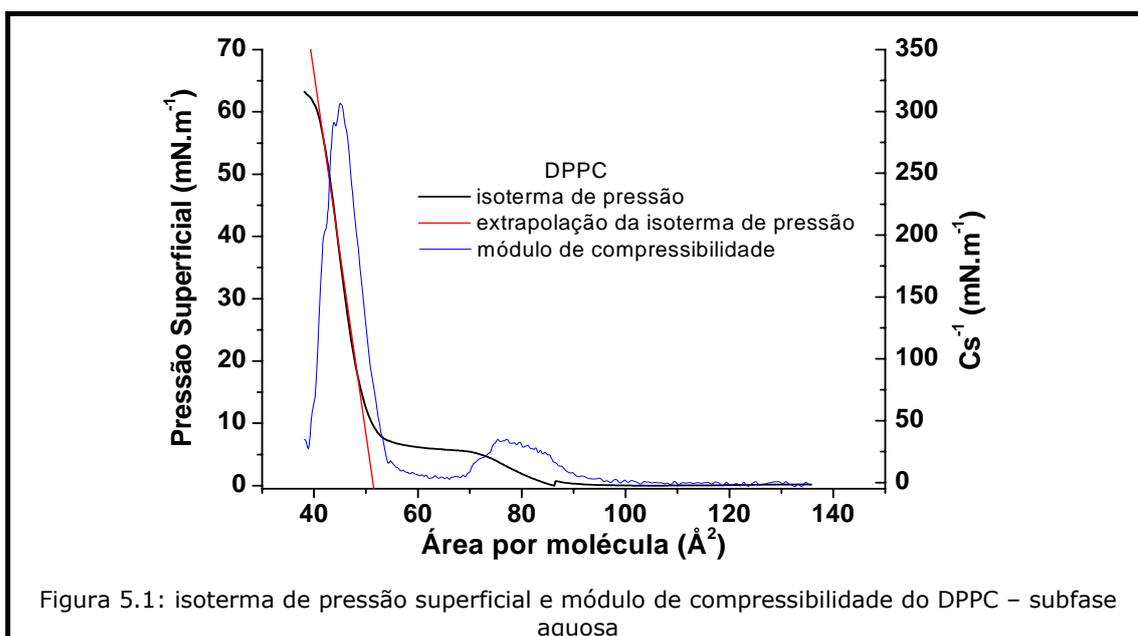
5.1 Pressão de Superfície (π)

Nesta seção são apresentadas as isotermas de pressão superficial (π -A) das monocamadas mistas (DPPC+BCD) em função da porcentagem de BCD ($\%_{BCD}$). Estas isotermas foram comparadas com a isoterma de pressão superficial típica do fosfolipídio DPPC puro.

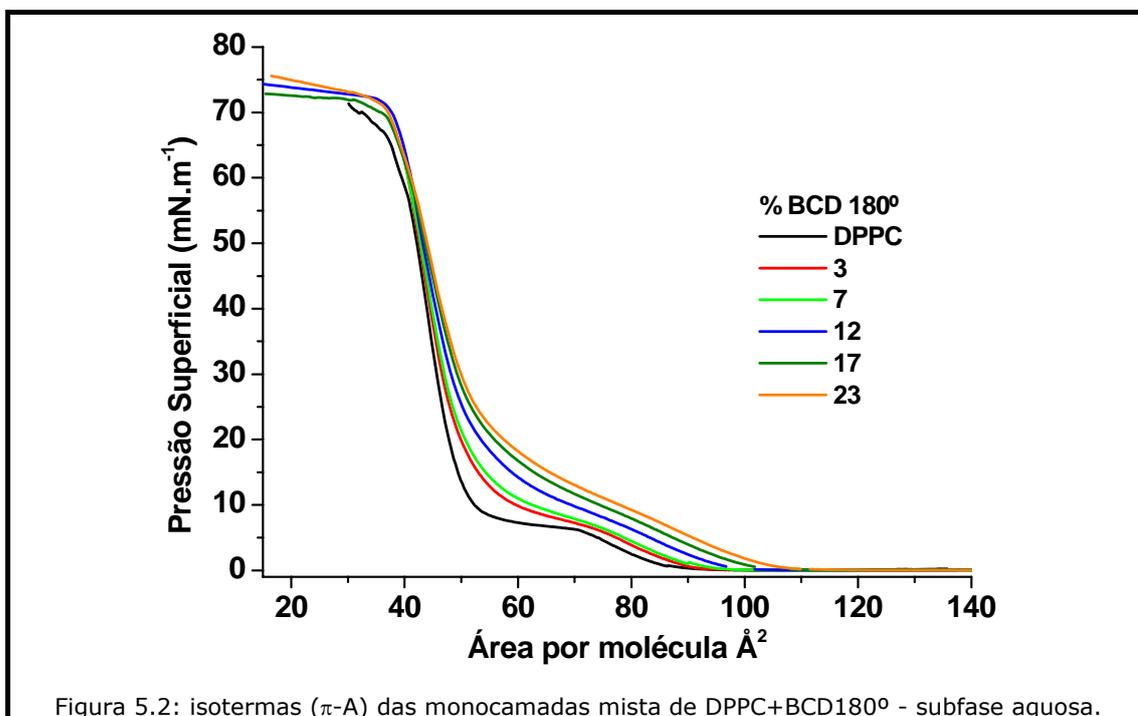
5.1.1 Subfase aquosa

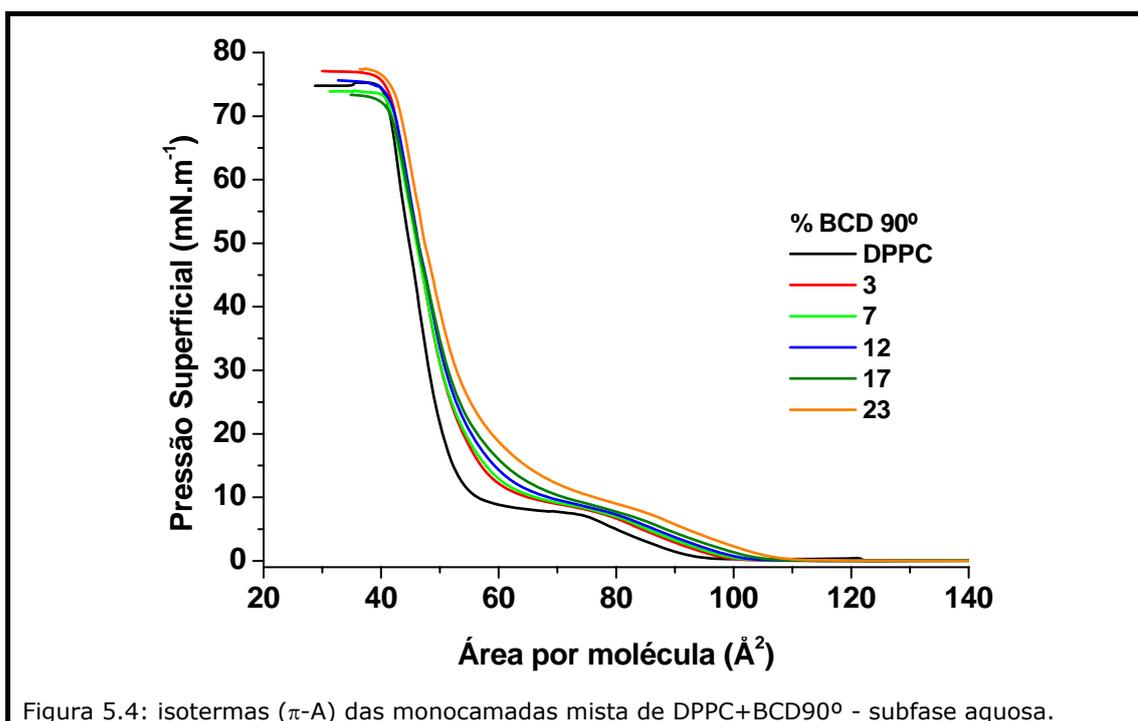
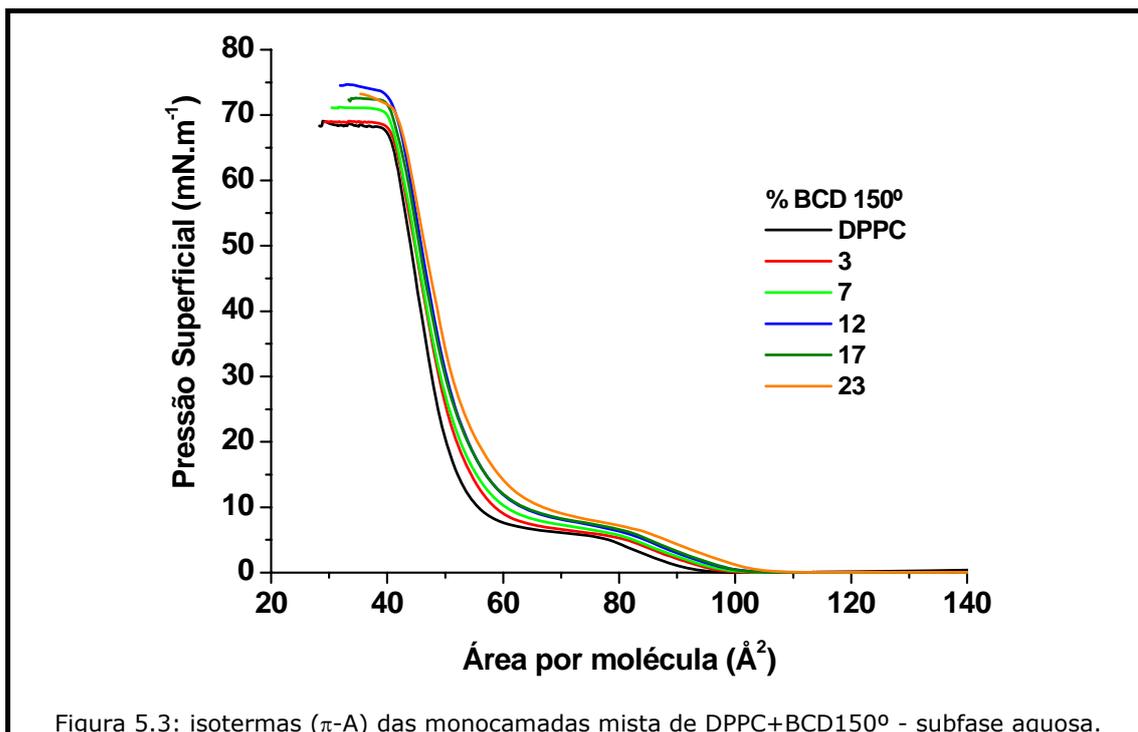
A isoterma (π -A) do DPPC, mostrada na figura 5.1, apresenta pressão superficial próxima de zero para fase gasosa (G), até atingir a área por molécula de $(87\pm 3) \text{ \AA}^2$. Entre (87 ± 3) e $(70\pm 2) \text{ \AA}^2$ há um aumento de pressão até atingir o valor de $(6,4\pm 0,9) \text{ mN.m}^{-1}$, que corresponde a fase líquido expandido (LE). Esta pressão se mantém no intervalo de (70 ± 2) a $(55\pm 2) \text{ \AA}^2$ (platô) correspondente à transição de fase líquida expandida/líquida condensada (LE/LC). Em seguida há um acréscimo da pressão (π) que corresponde à formação da fase líquida condensada (LC). A pressão aumenta rapidamente, indicando que a monocamada atingiu seu estado mais condensado (fase condensada - C), que antecede o colapso. A área mínima média por molécula (A_{mm}) é obtida através da extrapolação da isoterma (π -A), na região da fase C, até o valor zero de pressão superficial (figura 5.1) (Yang et al 1994, Klopfer e Vanderlick 1996, Shapovalov 1998, Pavinatto et al. 2007). A A_{mm} obtida para o DPPC foi $(52\pm 2) \text{ \AA}^2$ que concorda com os dados da literatura (Pavinatto et al. 2007, Caseli et al. 2006, Xia et al. 2004).

A transição entre as fases da monocamada é claramente observada na dependência do módulo de compressibilidade (Cs^{-1}) em função da área por molécula (figura 5.1). Na fase G o valor do Cs^{-1} é próximo de zero e começa a sofrer uma variação a partir de $(100\pm 1) \text{ \AA}^2$ até $(87\pm 3) \text{ \AA}^2$ onde atinge o valor de $(29\pm 5) \text{ mN.m}^{-1}$. Este valor permanece quase constante (platô) e caracteriza a fase LE da monocamada. No intervalo de (77 ± 2) a $(70\pm 2) \text{ \AA}^2$, o valor do Cs^{-1} diminui até $(7\pm 3) \text{ mN.m}^{-1}$. Este valor permanece constante até $(55\pm 2) \text{ \AA}^2$ ("vale" da curva de Cs^{-1}) e caracteriza a transição de fase LE/LC. Na fase C o Cs^{-1} atinge seu valor máximo $(300\pm 20) \text{ mN.m}^{-1}$ em $(45,6\pm 0,8) \text{ \AA}^2$.



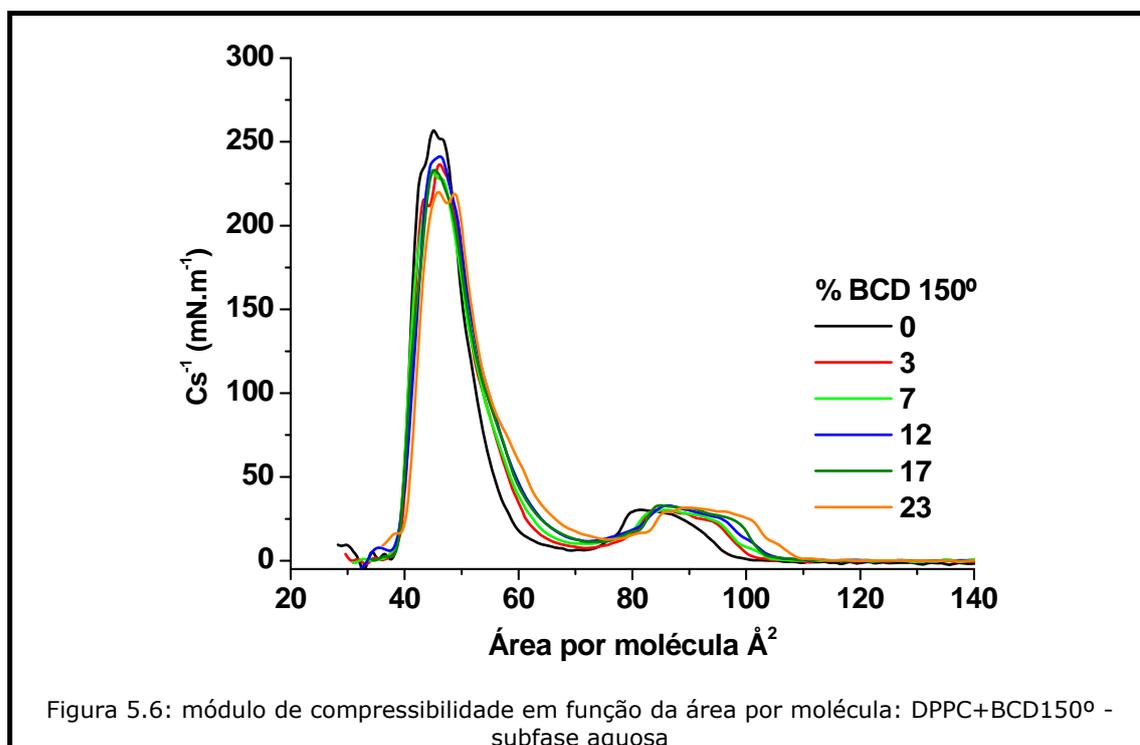
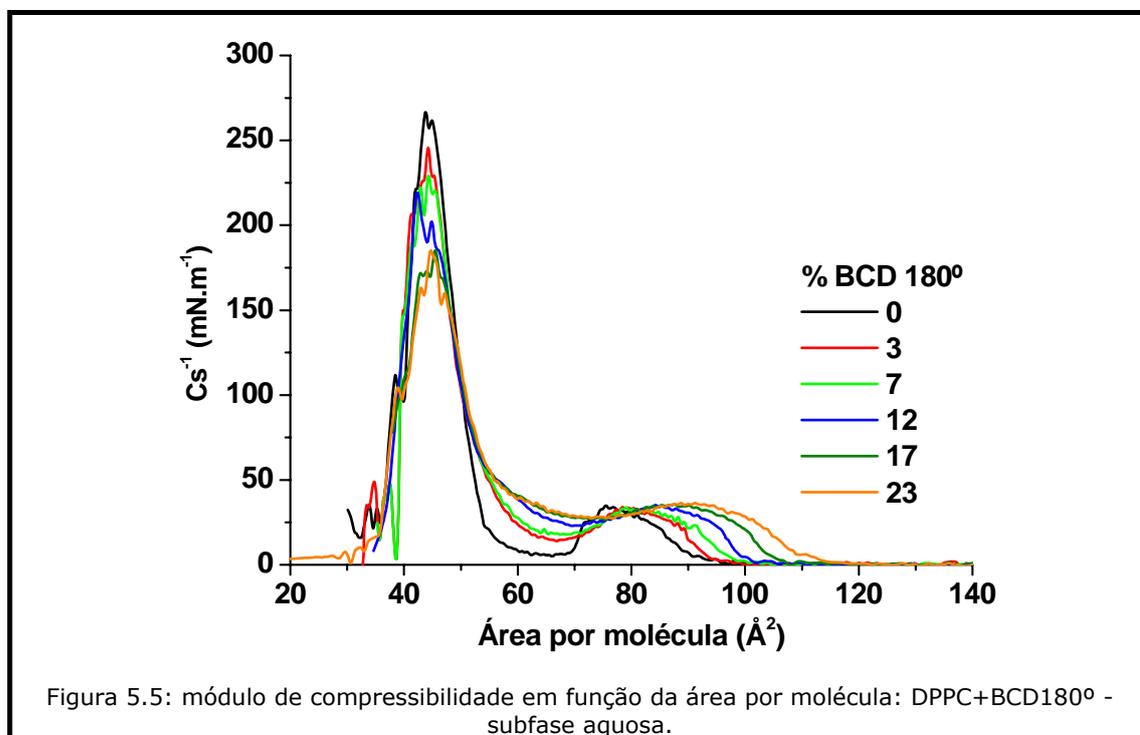
A presença de BCD, independentemente de sua estrutura, manifesta mudanças em todas as fases da isoterma (π -A) do DPPC puro, sendo os efeitos observados maiores para o BCD 180⁰. Estas mudanças são proporcionais à %_{BCD}, conforme isotermas (π -A) das monocamadas mistas mostradas nas figuras 5.2 a 5.4.

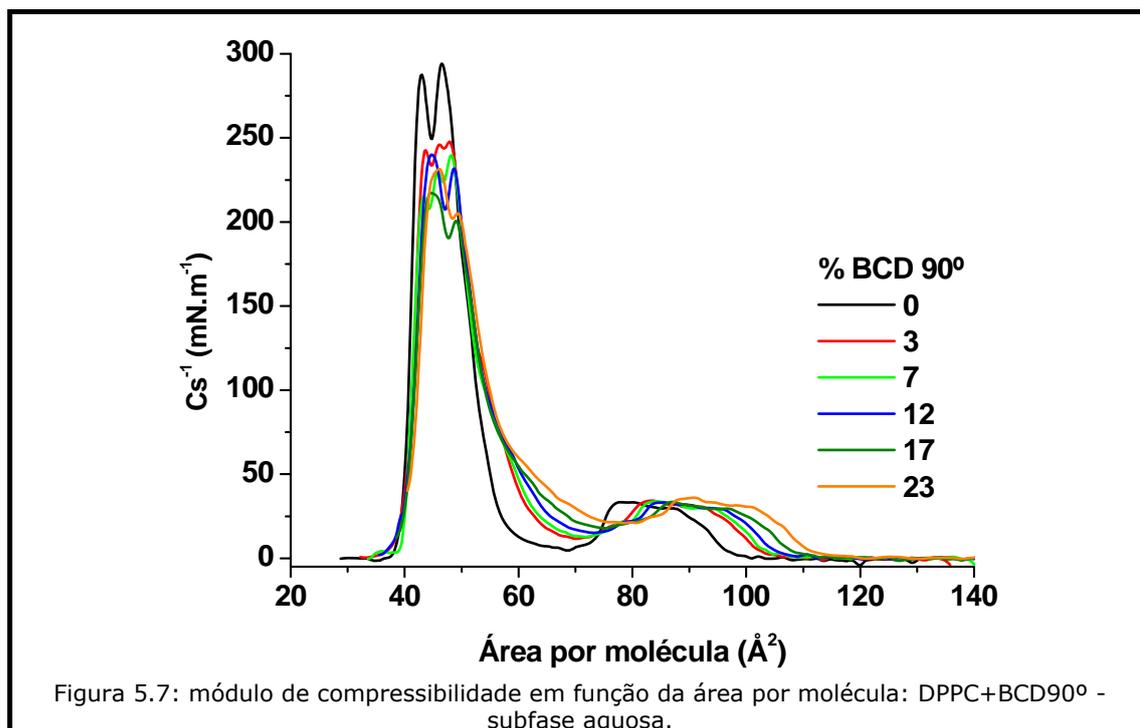




A transformação do platô da isoterma (π -A) em uma rampa dificulta identificar em qual fase a monocamada se encontra. Como mencionado anteriormente, a dependência do C_s^{-1} com a área por molécula permite

identificar estas fases. Nas figuras 5.5 a 5.7, estão mostradas as curvas do Cs^{-1} das monocamadas mistas (DPPC+BCD).





A partir das curvas de isoterma (π -A) e de Cs^{-1} mostradas nas figuras 5.2 a 5.4 e figuras 5.5 a 5.7, respectivamente, pode-se observar:

- a₁) a fase LE é deslocada para maiores áreas por molécula;
- a₂) o valor do Cs^{-1} na região de platô não é alterado, no entanto, compreende um intervalo maior de área quanto maior é a $\%_{BCD}$ na monocamada;
- a₃) o valor da pressão superficial e do Cs^{-1} aumentam na região correspondente a transição de fase LE/LC da monocamada de DPPC;
- a₄) o valor máximo do Cs^{-1} (fase C) diminui quando aumenta a $\%_{BCD}$;
- a₅) a área por molécula aumenta com o aumento da $\%_{BCD}$ na monocamada.

Para analisar os efeitos do BCD sobre as monocamadas podemos utilizar a teoria de agregação, haja visto que as monocamadas são agregados de moléculas anfifílicas.

As interações responsáveis pela formação dos agregados das moléculas são:

1 - INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA

Moléculas, que possuem carga de mesmo sinal, sofrem repulsão cuja energia é a energia Coulombiana:

$$W_Q = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (5.1)$$

em que Q é a carga do monômero, ϵ_0 é a constante dielétrica do meio e r é a distância entre os monômeros.

Quando as moléculas possuem momentos de dipolos permanentes a força entre eles depende da orientação relativa de dipolos. Para dois dipolos iguais com orientação paralela fixa a força resultante é repulsiva. A energia dessa interação é:

$$W = \frac{\mu^2}{4\pi\epsilon_0 r^3} \quad (5.2)$$

em que μ é o momento dipolo do monômero e r é a distância entre os centros de dipolos.

Para os dipolos distribuídos caoticamente a energia da interação é:

$$W = -\frac{\mu^4}{(4\pi\epsilon_0)^2 3kTr^6} \quad (5.2a)$$

em que k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

A energia da interação entre uma molécula com dipolo permanente e uma molécula carregada é

$$W = -\frac{Q\mu \cos\theta}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (5.2b)$$

em que θ é o ângulo do eixo do dipolo com a linha que liga o centro do dipolo com a carga. Assim esta interação pode ser repulsiva ou atrativa, dependendo da orientação do dipolo.

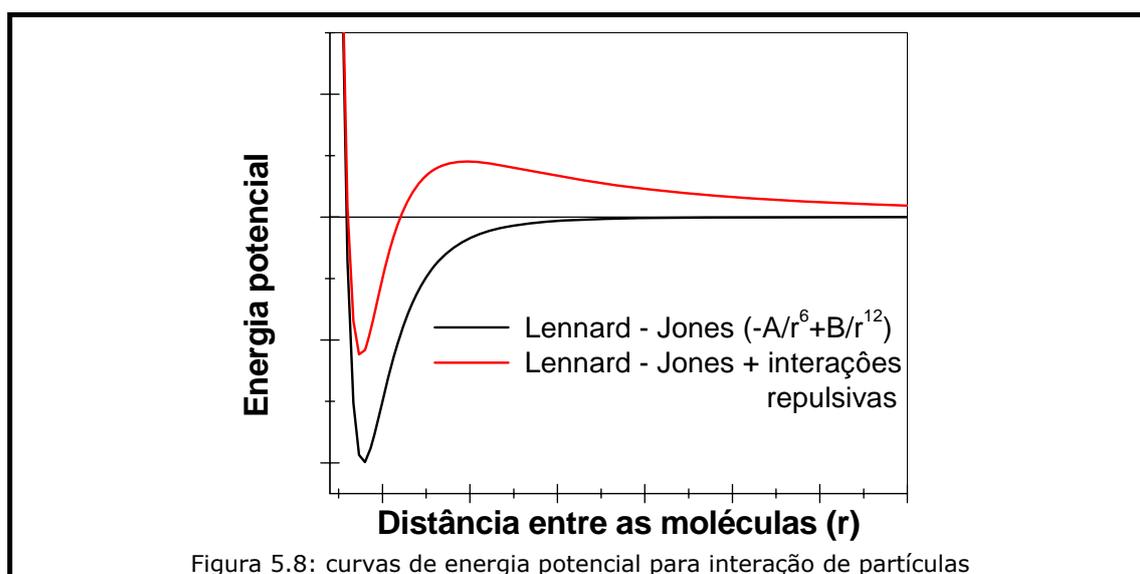
Além dessas interações, entre duas moléculas sempre existe uma força atrativa conhecida como "força de London" ou "força de dispersão" ou "força de dispersão de van der Waals". A origem dessa força é a interação entre dois dipolos, que cada partícula induz uma na outra. A energia dessa interação (energia de dispersão de London) é:

$$W_L = -\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (5.3)$$

em que h é a constante de Planck, ν é a freqüência de absorção eletrônica e α é a polarizabilidade elétrica da molécula.

Em distâncias muito pequenas entre as moléculas, mais uma interação repulsiva se destaca devido, principalmente, à repulsão eletrostática entre os núcleos dos átomos que compõem as moléculas. Essa interação repulsiva é proporcional a $1/r^{12}$.

A energia potencial de interação total pode ser apresentada pelo potencial de Lennard-Jones mais a energia da repulsão eletrostática, conforme ilustra a figura 5.8.



2 – FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÊNIO

Essa ligação se forma entre os átomos eletronegativos de uma molécula e o átomo de hidrogênio de outra. Para que ocorra a ligação, os monômeros devem se aproximar para que as nuvens de elétrons dos átomos, que formam essa ligação, se sobreponham. Essa interação é eficiente em distâncias curtas e pode aumentar a profundidade do “poço” da energia potencial, favorecendo assim, a estabilização do agregado.

3 – INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

Moléculas hidrofóbicas, quando em solução aquosa, quebram as pontes de hidrogênio entre as moléculas de água, modificando o arranjo das moléculas de água. Esse processo é acompanhado pelo aumento da energia livre da solução. Quando duas moléculas hidrofóbicas se juntam em solução, o número de pontes quebradas diminui e, conseqüentemente, o aumento da energia livre se torna

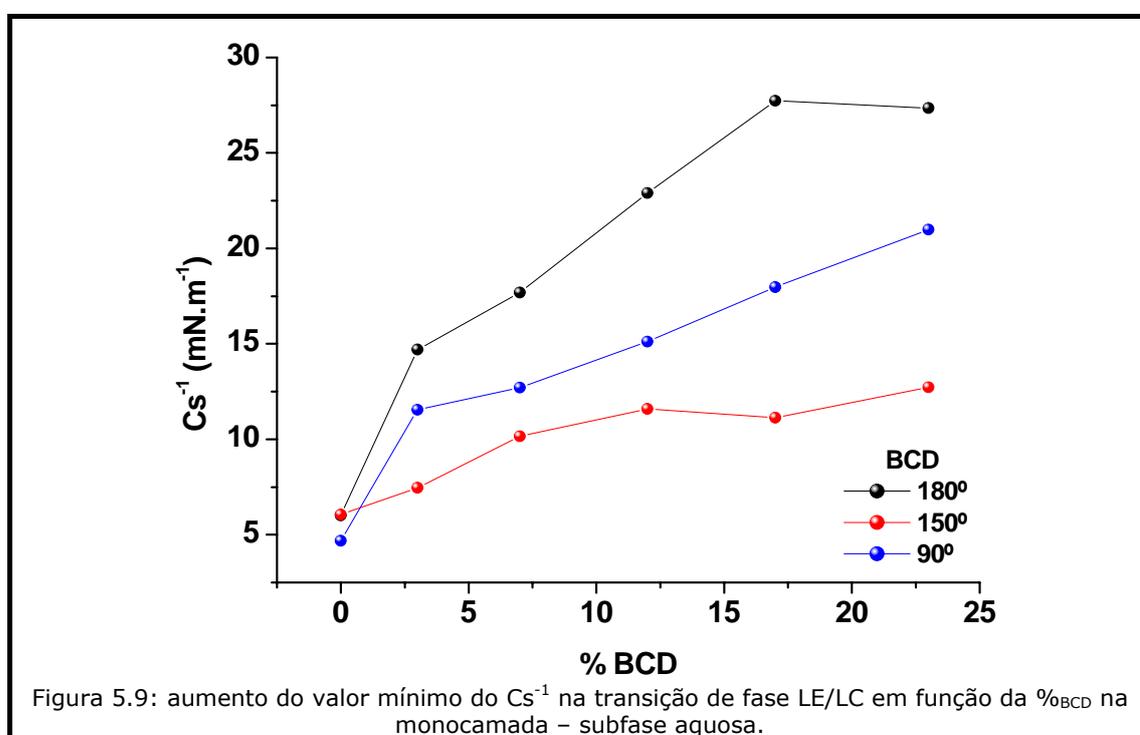
relativamente menor. Esta descrição é uma maneira simplificada de explicar o efeito hidrofóbico (interação hidrofóbica). Essa interação é atrativa e é a principal interação responsável pela formação de membranas biológicas, micelas, vesículas, etc. Dependendo do tamanho e da hidrofobicidade das moléculas, essa interação pode ser considerada tanto de longo quanto de curto alcance. Entretanto, a noção de "hidrofobicidade" não está, ainda, bem determinada.

Para a formação das monocamadas de DPPC pode-se dizer que há três interações, principais, que favorecem a formação: efeito hidrofóbico, interação de van der Waals e formação de pontes de hidrogênio (Paterno et al. 2001). A interação dipolo-dipolo pode tanto favorecer quanto não favorecer a formação da monocamada, sendo dependente da orientação relativa da cabeça polar das moléculas. Muitos autores postulam que o grupo fosforilcolina do DPPC está orientado horizontalmente na interface ar-água (Seelig 1977, Vilallonga et al. 1972, Shah e Schulman 1967). No entanto, Vilallonga (Vilallonga et al. 1972) sugere três diferentes orientações:

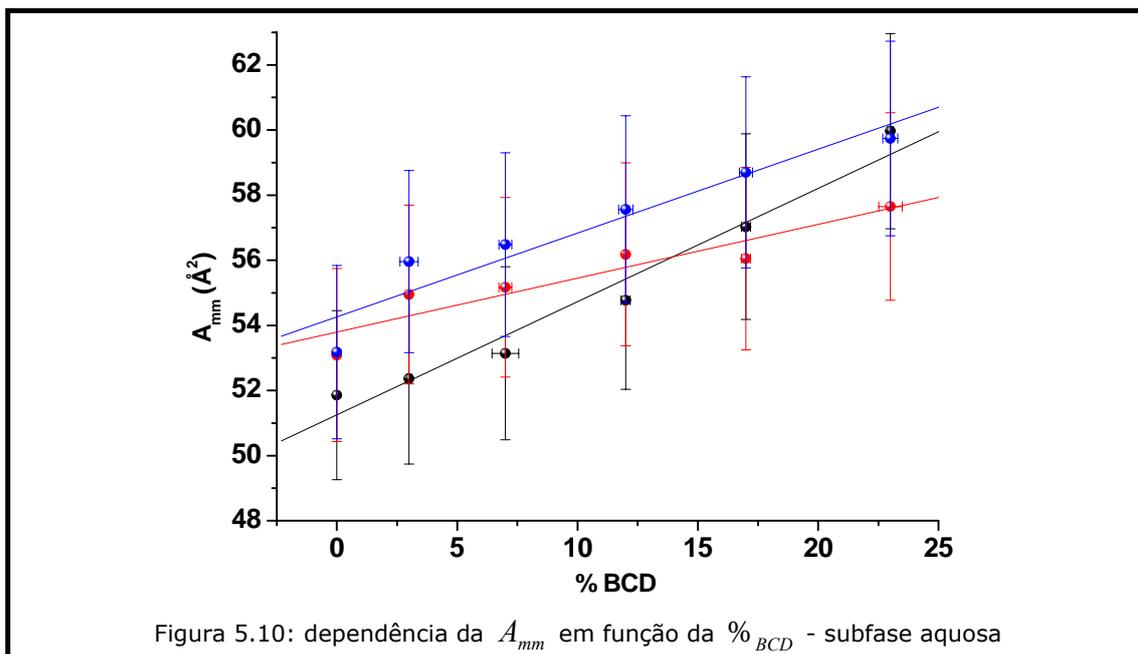
- 1 – grupo trimetilamônio orientado para a subfase aquosa, abaixo grupo do fosfato;
- 2 – grupo trimetilamônio orientado para o ar, acima do grupo fosfato;
- 3 – ambos os grupos em um plano horizontal à interface ar-água e perpendicular ao eixo da molécula.

Os resultados obtidos, isotermas (π -A) e C_s^{-1} , demonstram uma efetiva interação entre os BCD e as moléculas de DPPC na interface ar-água. Esta interação pode ter caráter de interação hidrofóbica, de formação de pontes de hidrogênio entre os átomos de nitrogênio do BCD e hidrogênio do DPPC e os átomos de oxigênio do DPPC com o hidrogênio do BCD. Além disso, os BCD podem diminuir a repulsão entre os dipolos das cabeças polares do DPPC devido à interação da sua carga com os dipolos das cabeças do DPPC. Neste caso a carga positiva do BCD deve estar localizada mais perto da carga negativa do grupo fosfato do DPPC, que significa que o BCD deve se localizar entre a cabeça polar e a região hidrofóbica do DPPC. Esta interação eletrostática estimula a expansão da isoterma (π -A) (Jones e Chapman 1995), que está associado à

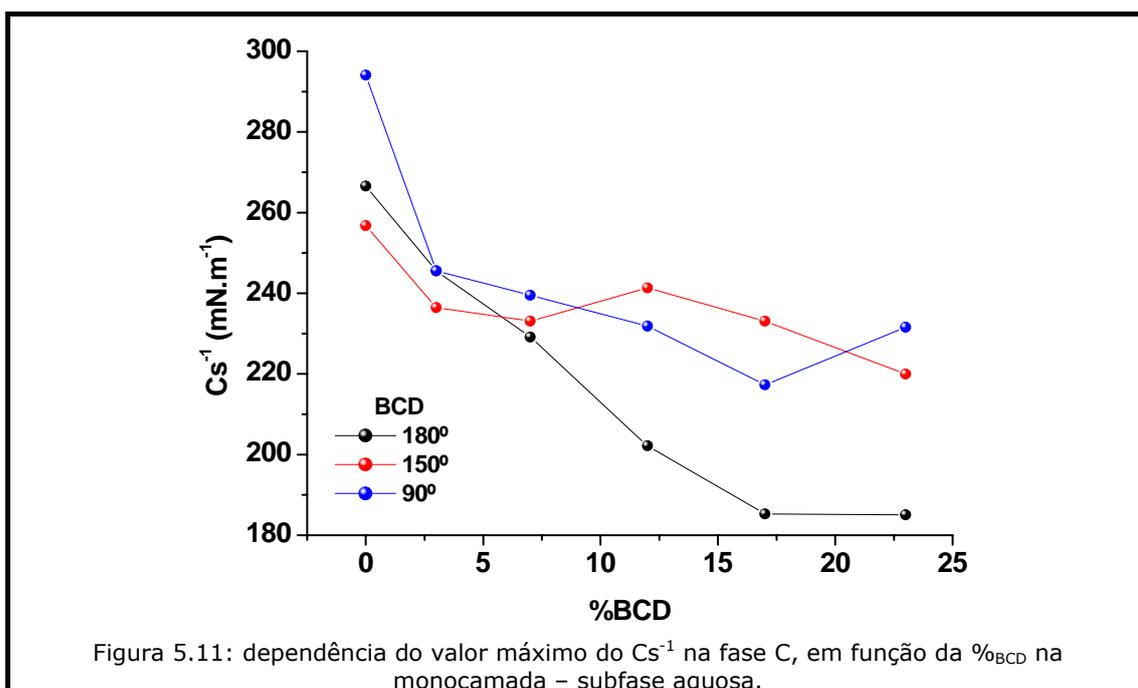
formação da fase LE e dos domínios (aumento do intervalo compreendido pelo platô da curva Cs^{-1}) em maiores áreas por molécula, quando comparado com a monocamada de DPPC puro. A presença de BCD nos domínios formados lhes confere uma carga líquida que é responsável pelo aumento da repulsão entre os domínios. Esta repulsão é verificada pela transformação do platô da isoterma (π -A) em uma rampa e, conseqüentemente, no aumento do valor mínimo do Cs^{-1} (vale da curva de Cs^{-1}). Este aumento do valor mínimo do Cs^{-1} (transição de fase LE/LC) se aproxima do valor do Cs^{-1} da fase LE (figura 5.9) o que nos permite dizer que os BCD possuem uma tendência de nivelar a diferença entre fases LE e LC.



Outra indicação da repulsão entre os domínios é o aumento da A_{mm} . Os valores de A_{mm} crescem linearmente com o aumento da %_{BCD}, conforme mostra figura 5.10. Este crescimento é maior para o BCD 180°, que apresenta um coeficiente angular de $a_{180} = \frac{A_{mm}}{\%_{BCD}} = (0,35 \pm 0,03)$, enquanto os BCD 150° e 90° apresentam valores de coeficiente angular de $a_{150} = (0,17 \pm 0,04)$ e de $a_{90} = (0,25 \pm 0,04)$, respectivamente.

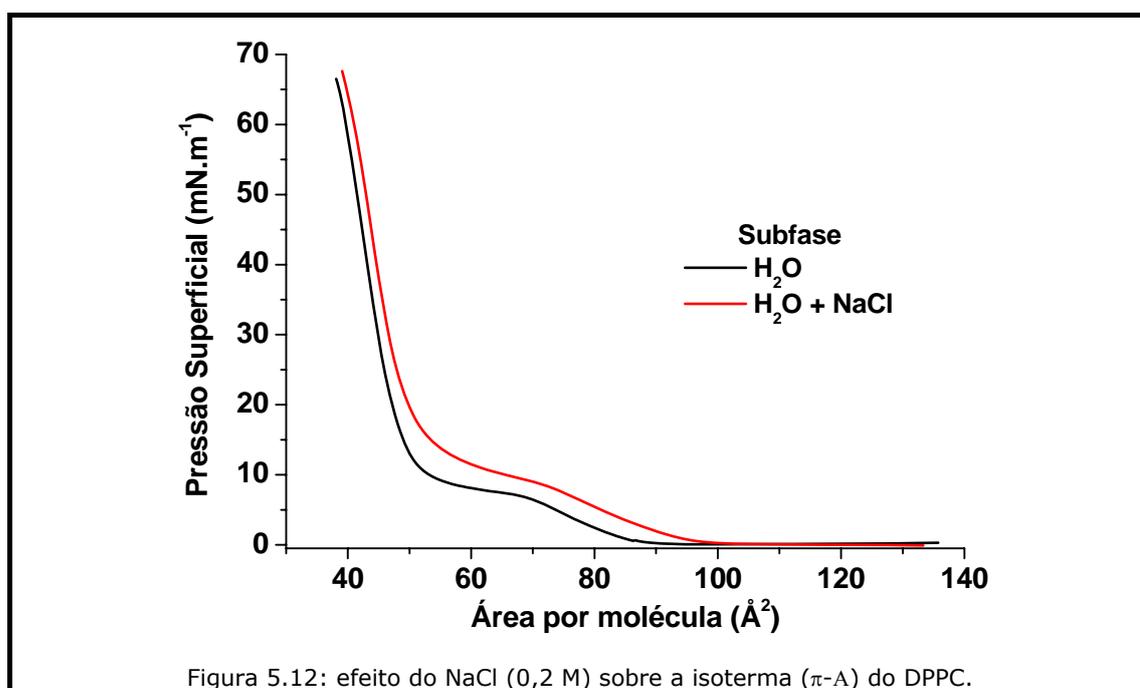


Na fase C a presença de BCD na monocamada promove uma diminuição do valor máximo do Cs^{-1} , conforme mostram as curvas de Cs^{-1} em função da $\%_{BCD}$ da figura 5.11, sendo sua posição na escala de áreas por molécula praticamente inalterada. Esta diminuição no valor do Cs^{-1} indica que a presença de BCD na monocamada, torna-a mais flexível (elástica).



5.1.2 Subfase aquosa + NaCl

A adição de 0,2 M de NaCl na subfase produz na isoterma (π -A) do DPPC puro mudanças semelhantes àsquelas produzidas pelos BCD, conforme curvas mostradas na figura 5.12:

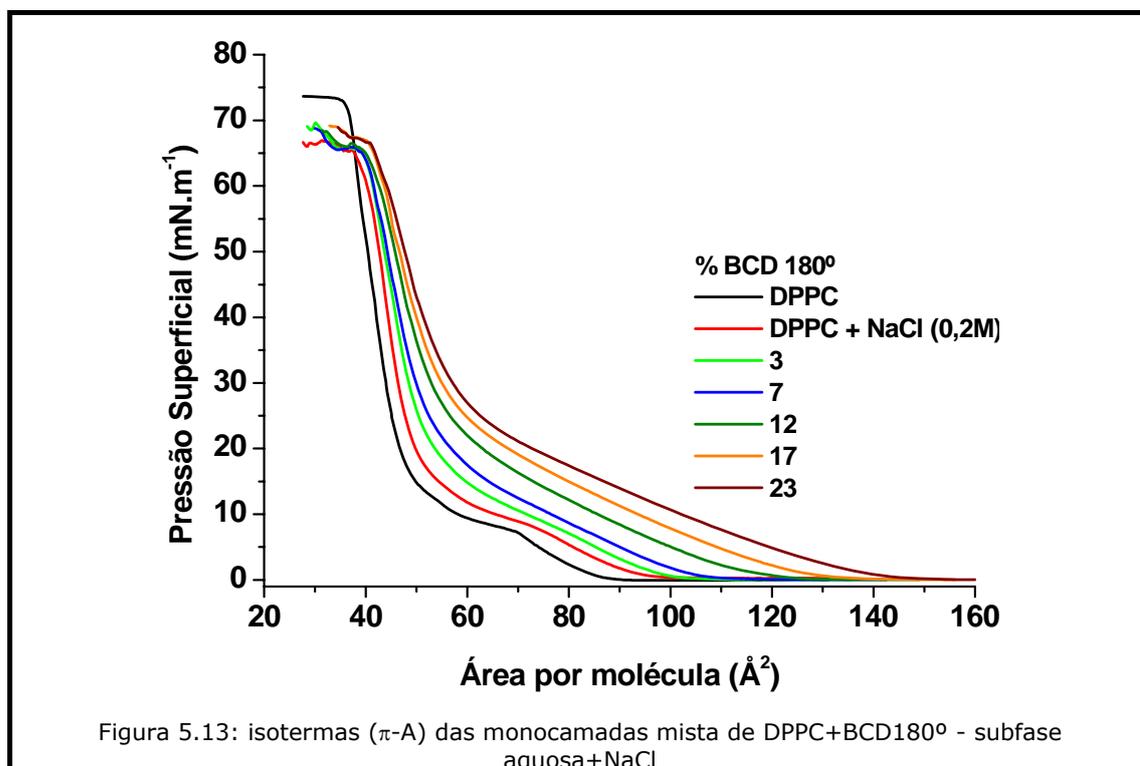


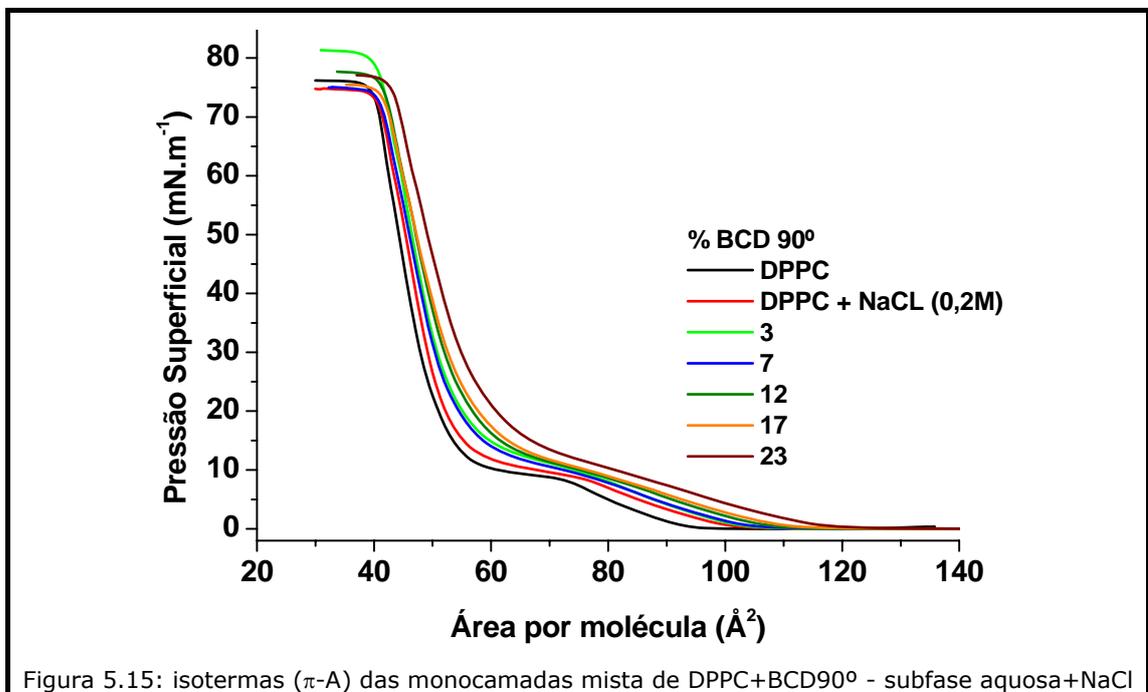
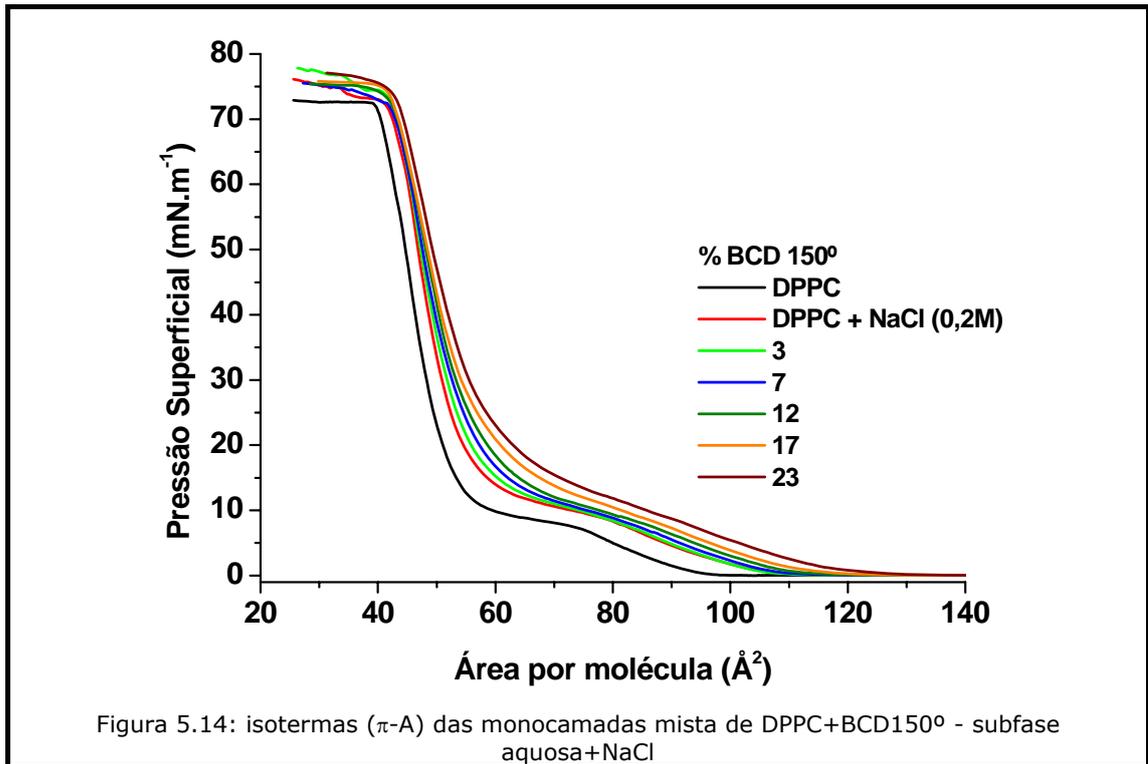
- b₁) expansão da monocamada, ou seja, aparecimento da fase LE em áreas por molécula maiores: pressão superficial começa a aumentar em $(96\pm 2) \text{\AA}^2$ ao invés de $(90\pm 2) \text{\AA}^2$ como ocorre na monocamada de DPPC formada sobre subfase aquosa;
- b₂) transformação do platô, que caracteriza a transição de fase LE/LC do DPPC puro, em uma rampa: pressão superficial em $(68\pm 2) \text{\AA}^2$ é $(9,3\pm 0,8) \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ e atinge $(13,8\pm 0,5) \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em $(55\pm 2) \text{\AA}^2$;
- b₃) aumento da A_{mm} : o valor desta área se desloca para $(53\pm 2) \text{\AA}^2$.

Entretanto, o efeito do NaCl é muito mais fraco do que o provocado pelos BCD. A única interação que pode ser responsável pelo o efeito do NaCl é a interação eletrostática entre os cátions sódio (Na^+) ou os ânions cloreto (Cl^-) e dipolos das cabeças polares das moléculas de DPPC. O efeito do sal, que observamos, é semelhante ao estudo realizado por Aroti com colaboradores (Aroti et al. 2004). Além disso, os estudos realizados por (Collins 1995, Collins

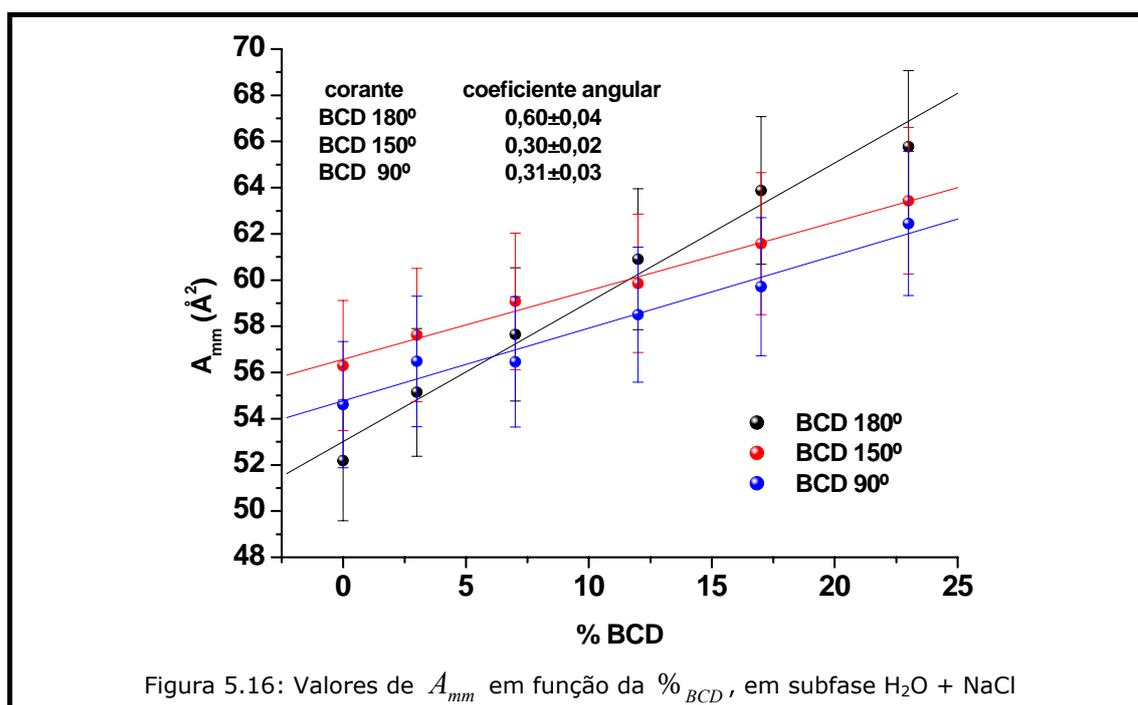
1997) mostram que o cátion Na^+ é indiferente na série liotrópica, confirmando que devem ser os ânions Cl^- os responsáveis pelo efeito observado na monocamada de DPPC. Aroti também obteve, por meio de BAM, que os ânions Cl^- não afetam significativamente a morfologia dos domínios da monocamada de DPPC. Para que a interação atrativa entre os ânions Cl^- e a cabeça polar do DPPC seja mais eficiente é necessário que o grupo trimetilamônio (positivo), da cabeça polar do DPPC, esteja orientado para a subfase aquosa. Pois os ânions Cl^- chegam na monocamada da subfase. Este é um argumento para esperar que o grupo de trimetilamônio penetre mais na subfase em concordância com modelo (1) de (Vilallonga et al. 1972).

A presença de NaCl na subfase intensifica a interação entre as moléculas de DPPC e de BCD. As isotermas (π -A) das monocamadas mistas obtidas na presença de NaCl, mostradas nas figuras 5.13 a 5.15, são mais expandidas e a transformação do platô em rampa é mais acentuada do que as obtidas na ausência de NaCl (figuras 5.2 a 5.4).

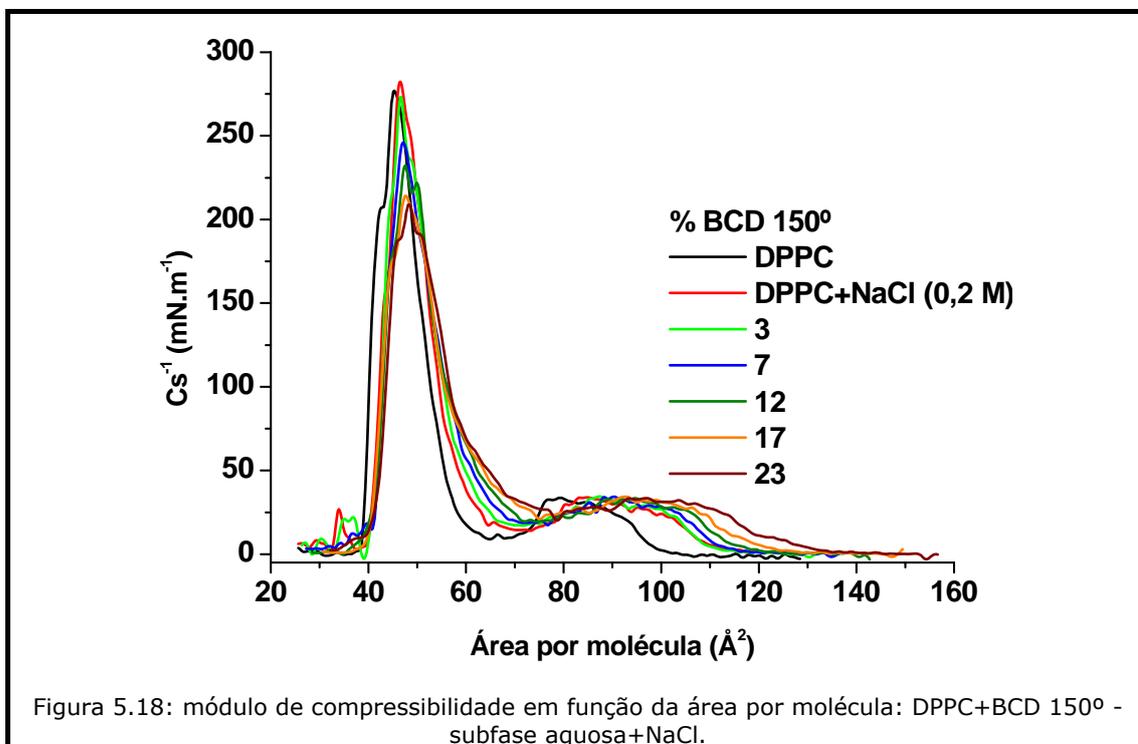
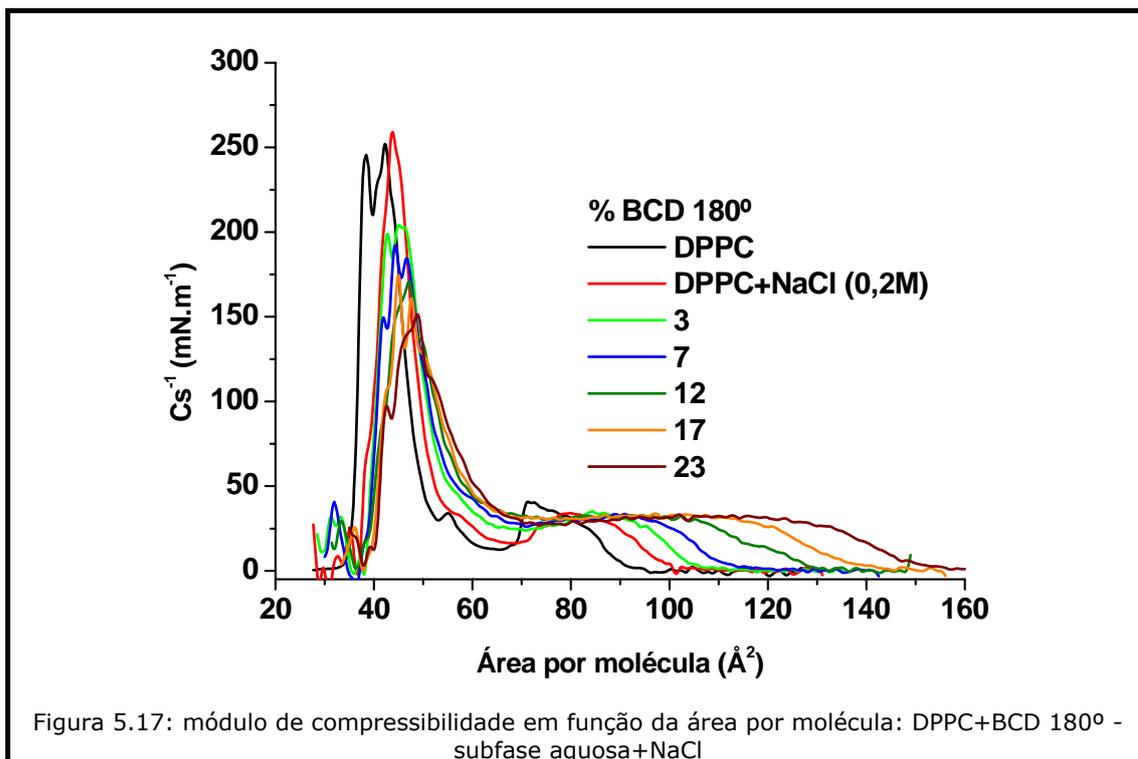


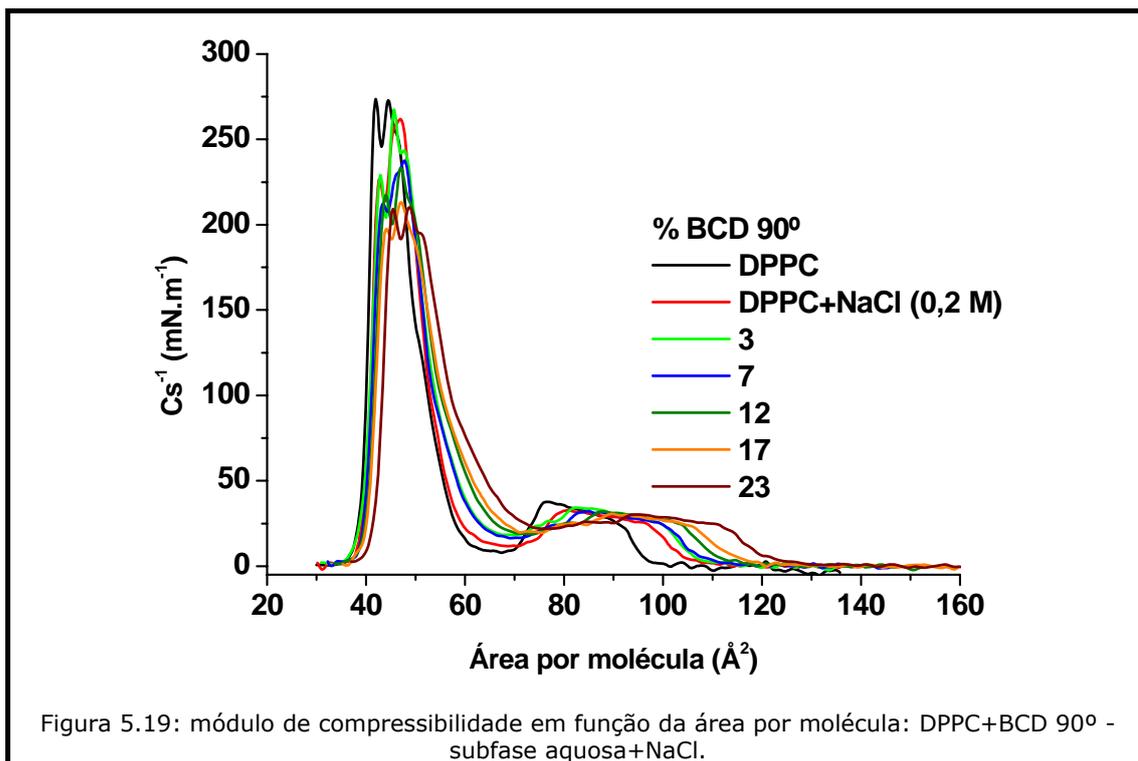


Esta maior interação é quantitativamente representada pelo coeficiente angular obtido das retas (figura 5.16) que mostram a dependência da A_{mm} em função da $\%_{BCD}$. O valor deste coeficiente para o BCD 180° aumenta até $a_{180^\circ} = (0,60 \pm 0,04)$, sendo 1,7 vezes maior do que o obtido na ausência de NaCl; para o BCD 150° o aumento do coeficiente também é de 1,7 vezes: $a_{150^\circ} = (0,30 \pm 0,02)$ e para BCD 90° o coeficiente é praticamente inalterado.

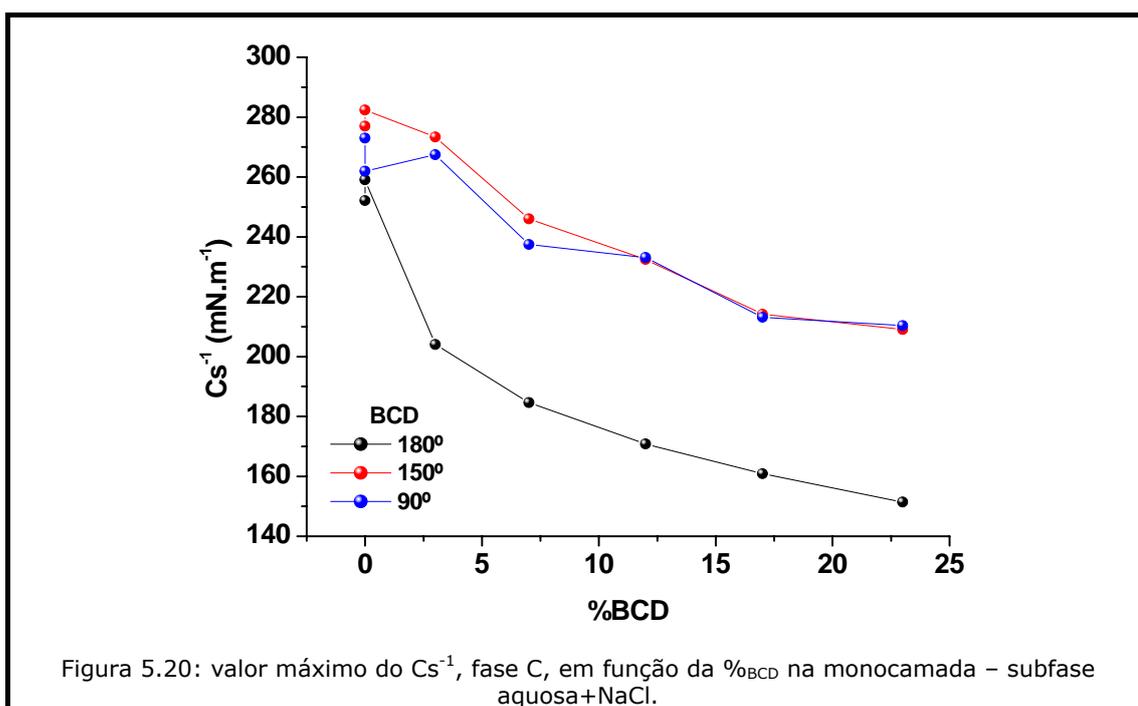


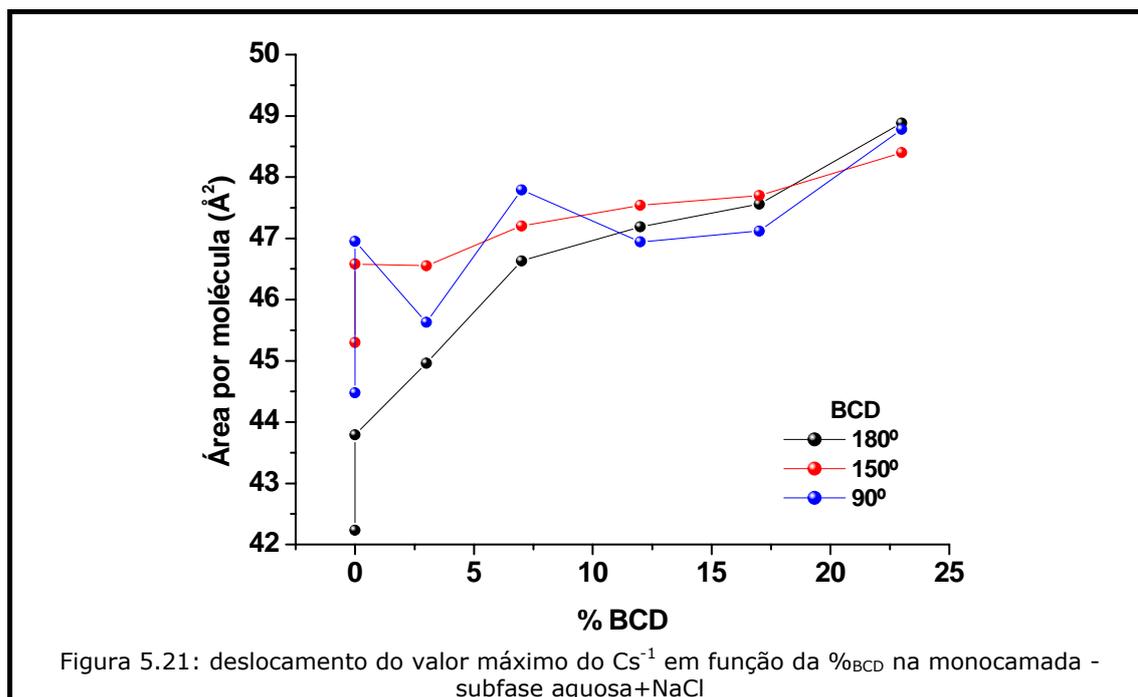
As curvas do Cs^{-1} das monocamadas mistas em subfase aquosa+NaCl estão mostradas nas figuras 5.17 a 5.19. Observa-se que o perfil das curvas e as modificações ocorridas são semelhantes às obtidas na ausência de NaCl, tendo como diferencial, um maior efeito na presença de NaCl (observe que para 17 e 23% de BCD 180° na monocamada, figura 5.17, o valor do Cs^{-1} na transição de fase LE/LC equivale ao valor da fase LE).





Além da maior intensidade nas mudanças observadas das curvas de Cs^{-1} (figuras 5.17 a 5.19), a presença de NaCl na subfase não somente provoca a diminuição do valor máximo do Cs^{-1} da fase C (figura 5.20), em função da $\%_{BCD}$, como desloca este valor para maiores área por molécula (figura 5.21).





O efeito conjunto (sinérgico) de BCD e de NaCl, provavelmente, é devido à interação mútua da carga positiva do BCD e da carga negativa do Cl^{-1} com a carga negativa do grupo fosfato e a carga positiva do grupo trimetilamônio do DPPC, respectivamente. Em outras palavras, a presença de NaCl aumenta a interação entre os BCD e as moléculas de DPPC, pois os ânions adsorvidos na região polar da monocamada (cabeça polar dos fosfolipídios) faz com que a monocamada adquira um excesso de carga negativa. Este excesso de carga negativa compensa ("blinda") as cargas positivas da cabeça polar das moléculas de DPPC, diminuindo assim a repulsão eletrostática, que por consequência facilita a aproximação das moléculas de BCD e DPPC.

5.2 Potencial Superficial (V)

Nesta seção são apresentadas as isotermas de potencial superficial ($\Delta V-A$) das monocamadas mistas (DPPC+BCD) em função da porcentagem de BCD ($\%_{BCD}$), sendo estas as mesmas porcentagens utilizadas para a obtenção das isotermas ($\pi-A$). Estas isotermas foram comparadas com a isoterma ($\Delta V-A$) da monocamada de DPPC puro.

5.2.1 Subfase aquosa

A isoterma (ΔV -A) do DPPC, mostrada na figura 5.22, apresenta potencial zero para grandes distâncias entre as moléculas (grandes valores de área por molécula), aumenta abruptamente a partir de $(120 \pm 5) \text{ \AA}^2$ e atinge o valor máximo de potencial que fica compreendido no intervalo $[500;600] \text{ mV}$, concordando com (Borissevitch et al. 1996). Este rápido aumento tem sido atribuído, para monocamadas de fosfolipídios e de outros compostos alifáticos, à diminuição da constante dielétrica efetiva na interface monocamada-água que ocorre quando uma determinada densidade de empacotamento é atingida (Borissevitch et al. 1996).

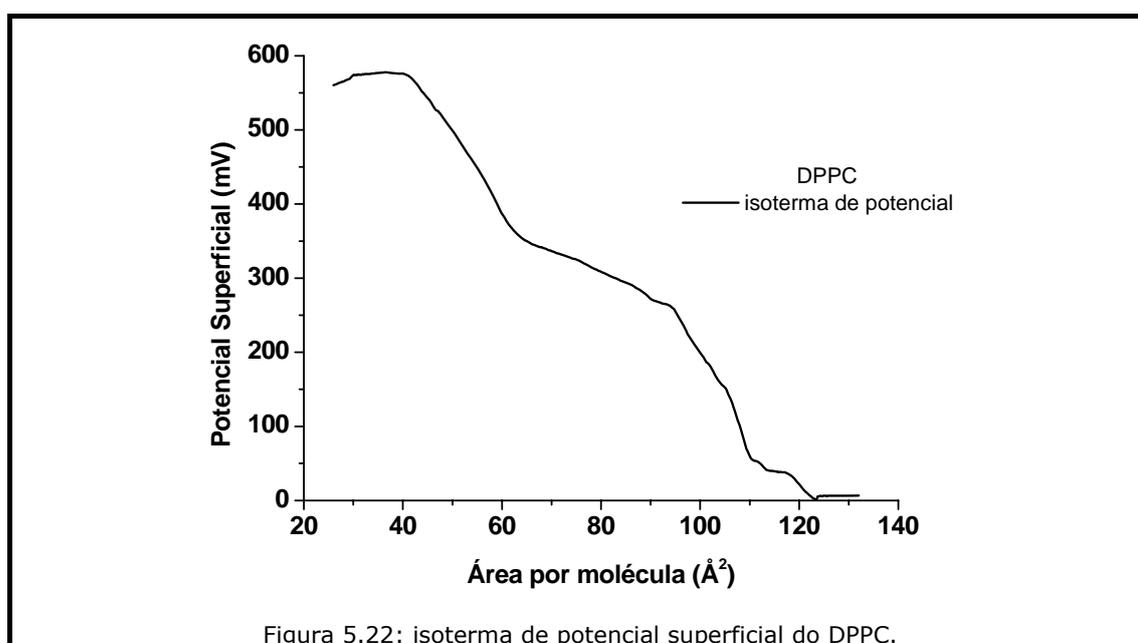
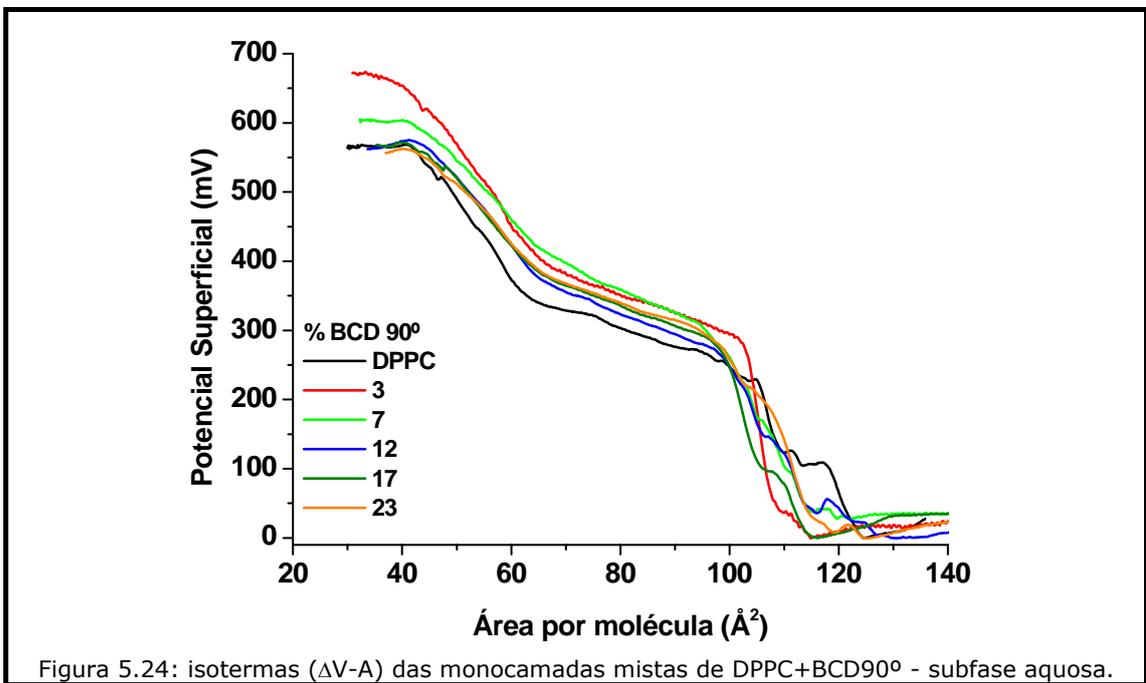
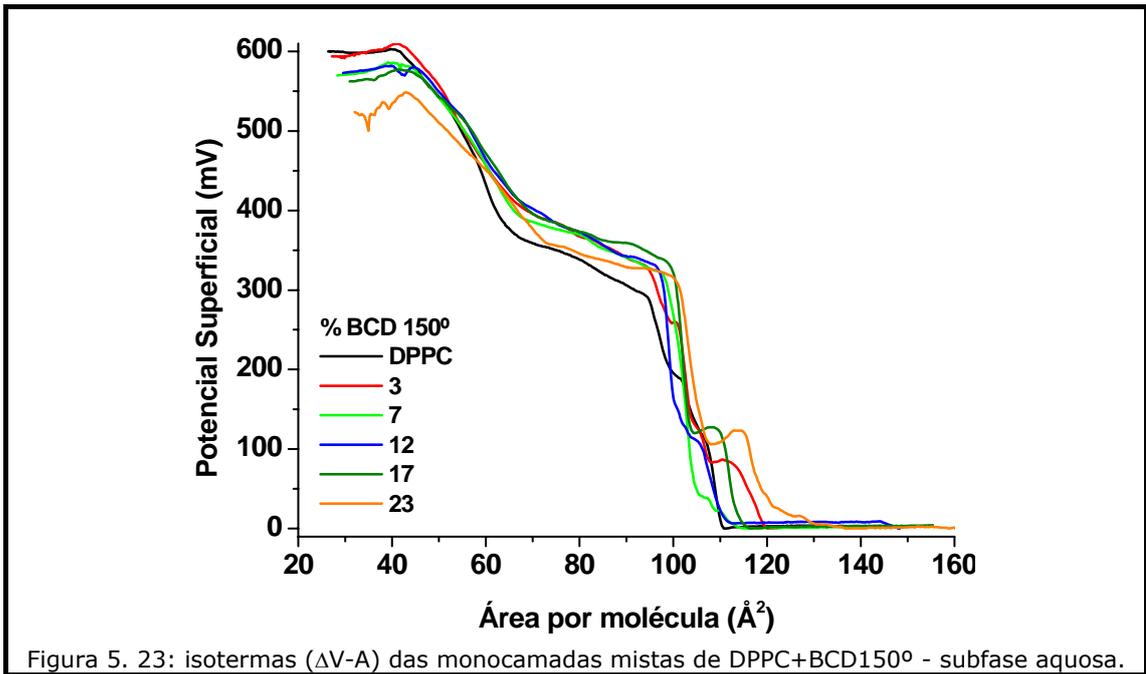
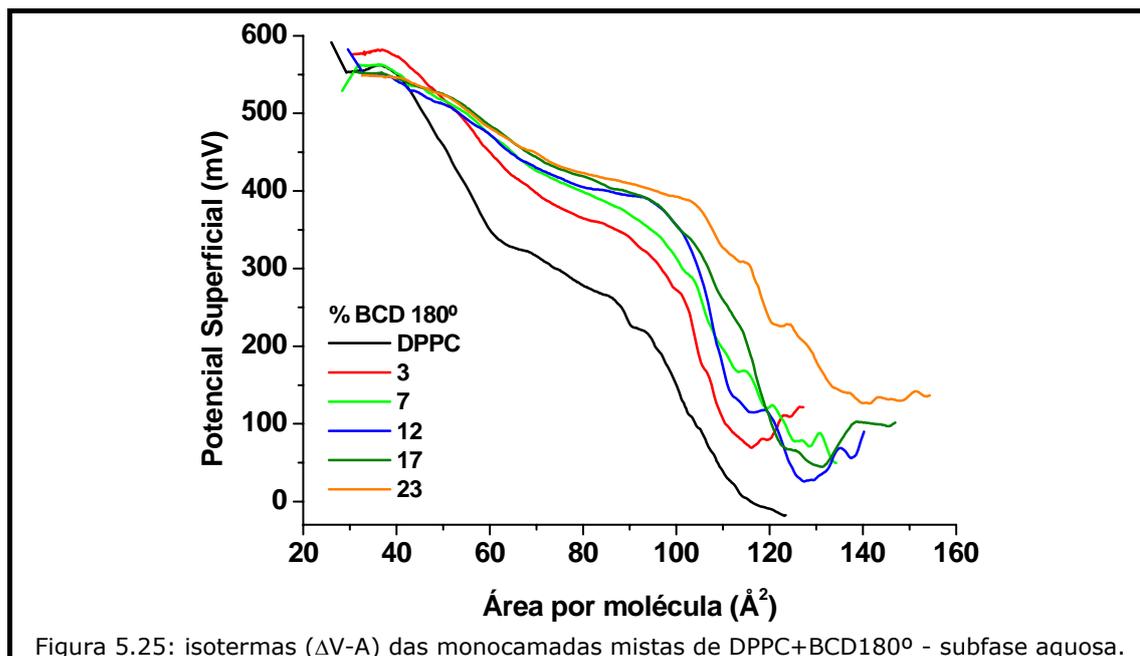


Figura 5.22: isoterma de potencial superficial do DPPC.

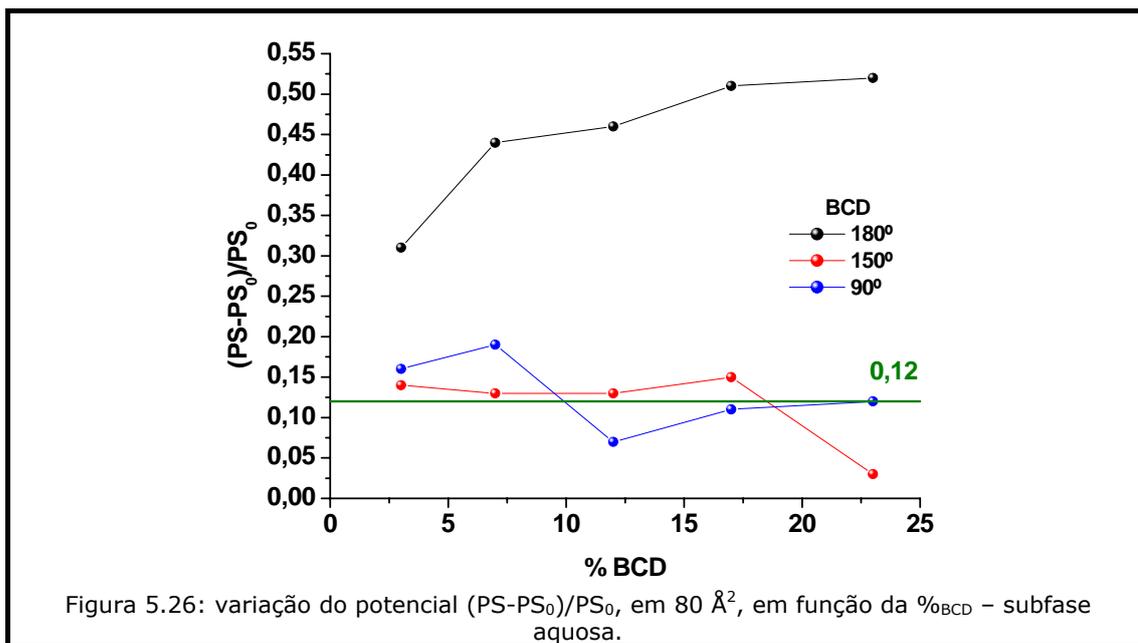
A presença dos BCD 150° e 90° na monocamada causa pequenas flutuações nas isotermas (ΔV -A) (figuras 5.23 e 5.24) que podem ser considerados como desvios experimentais. Já a presença do BCD 180° (figura 5.25) provoca um aumento do potencial na isoterma toda, com exceção do valor máximo. Observa-se que a partir de $(60 \pm 2) \text{ \AA}^2$ o valor do potencial, para cada $\%_{\text{BCD}}$ converge para o valor máximo de potencial.





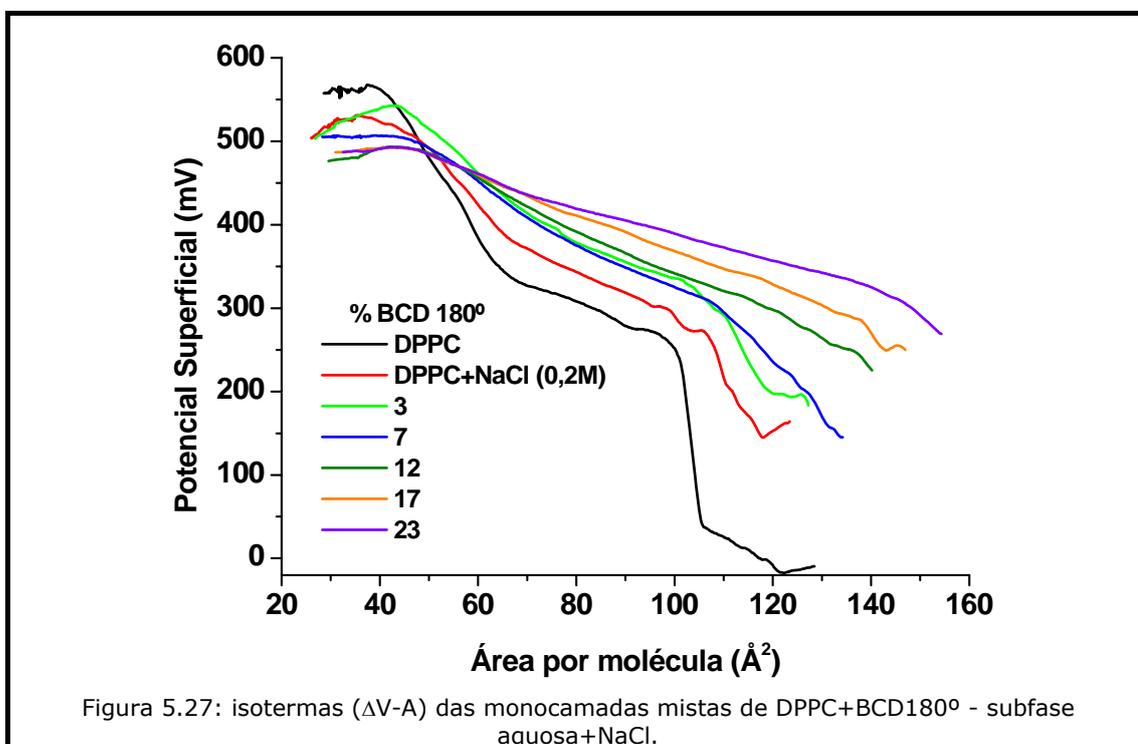
Como discutido na seção 5.1.1, a presença do BCD estimula a interação entre as moléculas de DPPC em grandes áreas por molécula. Esta interação provoca uma orientação das moléculas de DPPC na interface ar-água e das de água da subfase (adjacentes à cabeça polar do DPPC), o que explica o aumento do potencial observado em grandes áreas por molécula. Em 60 \AA^2 , a monocamada encontra-se no final da transição de fase LE/LC, região onde os domínios estão formados e quando na presença de BCD estes se encontram próximos (ver seção 5.3). Então, a partir de 60 \AA^2 , na presença de BCD, podemos dizer que as moléculas de DPPC já se encontram, praticamente, em seu maior ordenamento. Fato que explica a convergência do potencial para o valor máximo. O fato, do valor máximo do potencial não alterar devido à presença de BCD, mostra que os BCD não contribuem no potencial superficial, pois não possuem momento de dipolo.

Na figura 5.26, são mostradas as curvas de variação relativa do potencial da monocamada em função da $\%_{\text{BCD}}$ em um valor de área fixa, 80 \AA^2 . Para os BCD 150° e 90° a variação do potencial é pequena e oscila em torno do valor médio de 0,12, confirmando que são desvios experimentais; já o BCD 180° provoca um aumento inicial de 30% e um aumento máximo de 50%, que corresponde à saturação do sistema.



5.2.2 Subfase aquosa + NaCl

A isoterma ($\Delta V-A$) do DPPC, mostrada na figura 5.27, quando na presença de NaCl na subfase, é deslocada para valores maiores de potencial com exceção do valor máximo, sendo este diminuído de aproximadamente 50 mV.



O NaCl, assim como o BCD, diminuem a repulsão entre as moléculas de DPPC em grandes áreas por molécula, conforme discutido na seção 5.1.2, antecipando a reorientação das moléculas de DPPC na interface ar-água. Este é o motivo que faz o potencial apresentar um maior valor em grandes áreas por molécula. A adsorção dos íons da subfase, em sua maioria os ânions de Cl^- , pode gerar uma dupla camada elétrica, que é característica de monocamadas ionizadas. Esta dupla camada contribui no valor do potencial, conforme equação 3.4 apresentada no capítulo 3. Para monocamadas completamente ionizadas negativamente, segue da teoria de Gouy-Chapman que a variação do potencial, devido à dupla camada, varia com a concentração de íons de aproximadamente -59 mV por cada década modificada na concentração de íons (Oliveira Jr. 1990). Este fato confirma que a presença dos ânions Cl^- na monocamada, gera uma dupla camada elétrica, e a monocamada de DPPC comporta-se como uma monocamada ionizada quando na presença de NaCl na subfase.

Na figura 5.27, também são mostradas as isotermas ($\Delta V-A$) das monocamadas mistas de DPPC+BCD180° na presença de NaCl. Como esperado, os efeitos do BCD sobre a isoterma ($\Delta V-A$) é intensificado na presença de NaCl. A isoterma ($\Delta V-A$) não apenas é deslocada para maiores valores de potencial como também para maiores valores de área por molécula. Este resultado está em concordância com as isotermas ($\pi-A$) obtidas para a monocamada mista DPPC+BCD180° na presença de NaCl (figura 5.13) que mostram que as moléculas de DPPC começam interagir próximo dos 160 Å², para 23% de BCD na monocamada. Observe que o valor máximo do potencial é igual ao valor obtido para a monocamada de DPPC puro com NaCl na subfase, indicando que a diminuição do valor máximo do potencial deve-se somente ao sal.

5.3 Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM)

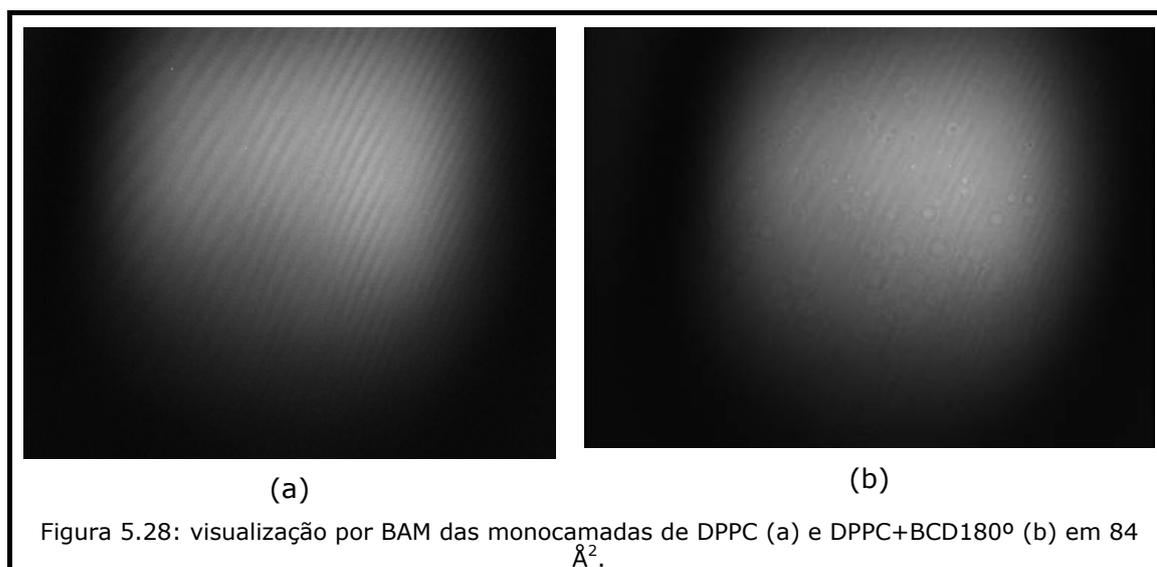
A técnica de microscopia por ângulo de Brewster permite visualizar as mudanças da morfologia e do colapso de monocamadas formadas na interface ar-água (Patino et al. 1999). A forma dos domínios que compõem a monocamada de DPPC depende da velocidade de compressão e da densidade superficial (fase da monocamada). Se a velocidade de compressão estiver no intervalo de 0,2 a 8,0 Å²/molécula.min, os domínios da monocamada de DPPC

são nucleados e com formato semelhante ao de feijão (*bean-like shapes*) e crescem progressivamente do formato de feijão à um formato de "S", atingindo finalmente o formato de multi-lobos (Klopfer e Vanderlick 1996).

Neste trabalho foram obtidas imagens, por microscopia de ângulo de Brewster, somente para as monocamadas de DPPC e de DPPC+BCD180°. A %_{BCD} na monocamada mista é 8% e ambas as monocamadas foram formadas em subfase aquosa.

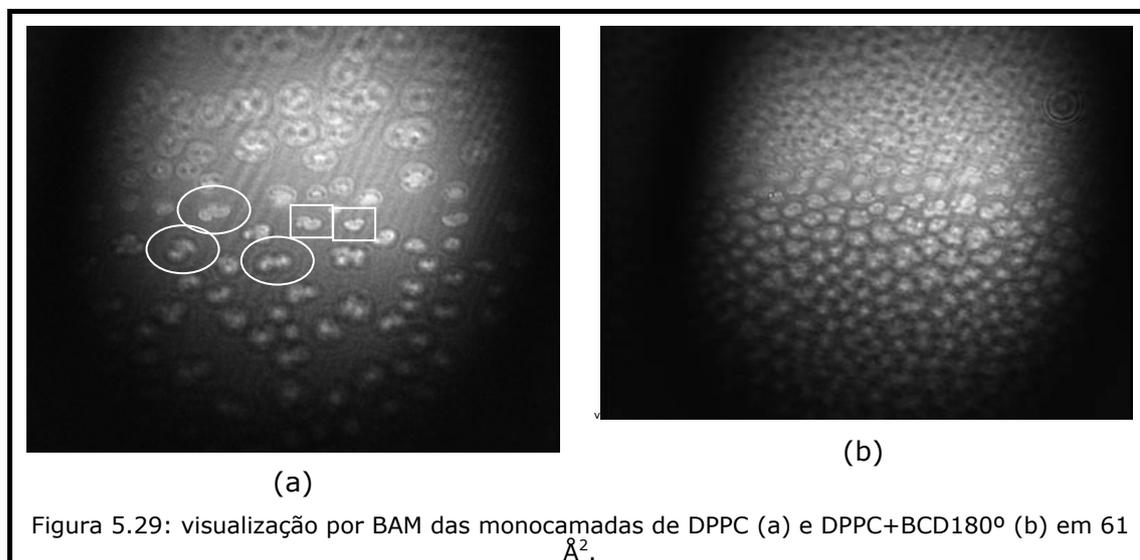
As imagens obtidas para as monocamadas de DPPC e de DPPC+BCD180°, em diferentes valores de áreas por molécula, estão mostradas nas figuras 5.28 a 5.31.

Na fase LE nenhum domínio pode ser observado quando na ausência de BCD (figura 5.28 a); na presença de BCD180° (figura 5.28 b) já são observados algum tipo de agregado, porém, de formato não determinado. Estas primeiras imagens confirmam a expansão da isoterma (π -A).

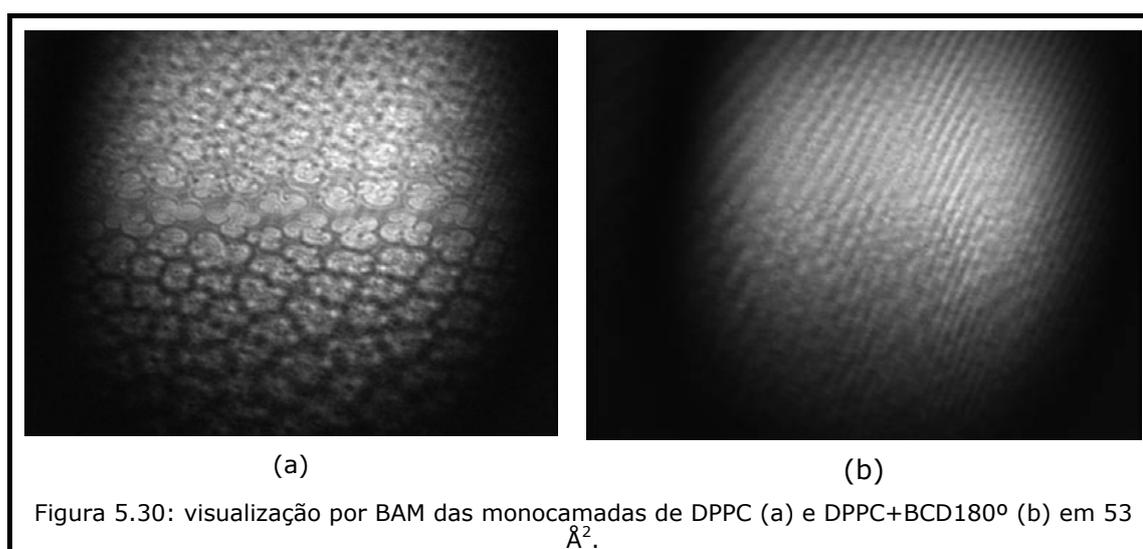


Na transição de fase LE/LC são observados domínios com formato feijão (marcado com um quadrado) e "S" (marcado com um círculo), conforme mostra figura 5.29 (a), e quando na presença de BCD180° os domínios visualizados são multilobos. Domínios multilobos são formados em áreas menores que 60 Å², portanto, a presença de BCD180° antecipa a formação dos domínios e também diminui seu tamanho (figura 5.29 b). Estes resultados estão em concordância com a discussão realizada no item 5.1.1. Além disso, observa-se que na

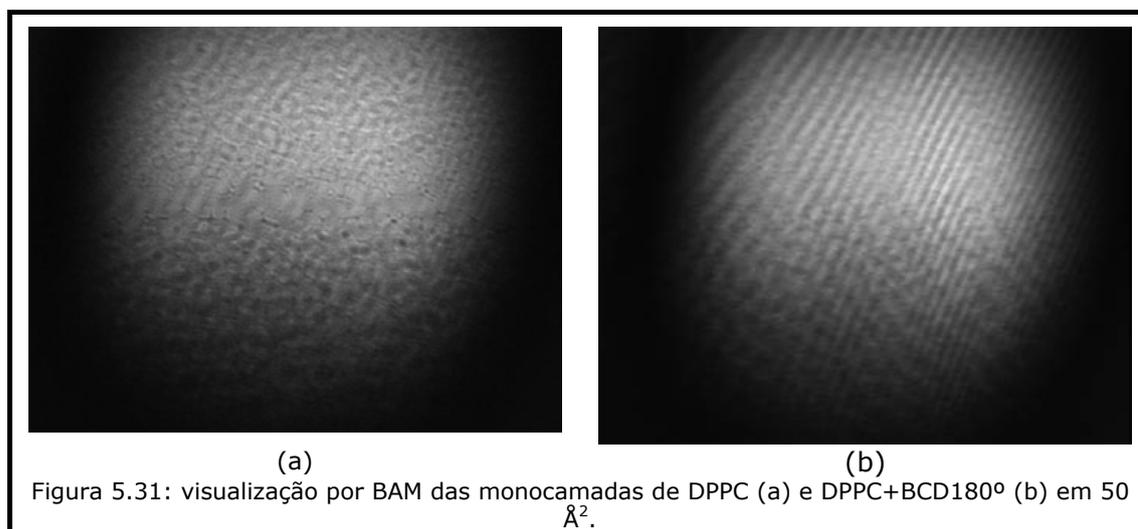
presença de BCD os domínios estão mais próximos. Isto indica que o processo de formação da monocamada é mais avançado na presença do BCD do que ausência, onde os domínios estão ainda separados.



Em 53 \AA^2 , fase LC, são somente observados os domínios multilobos com três e quatro “braços” curvados, que surgem devido à quiralidade das moléculas de fosfolipídios (Krüger e Lösche 2000), conforme mostra figura 5.30 (a), e quando na presença de BCD 180° estes domínios se encontram justapostos (figura 5.30 b).



Na fase C (figura 5.31 a) na ausência de BCD os domínios encontram-se justapostos formando a monocamada na interface ar-água. Na presença do BCD não é possível observar os domínios, ou seja, a monocamada está formada (figura 5.31 b).



A seqüência de formação dos domínios na ausência de BCD 180° (figuras 5.28 (a) a 5.31 (a)) e, conseqüentemente, da monocamada estão em concordância com (Klopper e Vanderlick 1996). As imagens obtidas sugerem que a presença de BCD na monocamada não altera a orientação relativa das moléculas de fosfolipídios na monocamada, isto porque os domínios observados na presença de BCD possuem o mesmo formato que os de DPPC puro, porém de menor tamanho.

Pelas imagens, observa-se claramente, que na presença de BCD todas as fases de formação da monocamada ocorrem em regiões de maiores valores de área por molécula, concordando e corroborando com os resultados de pressão superficial.

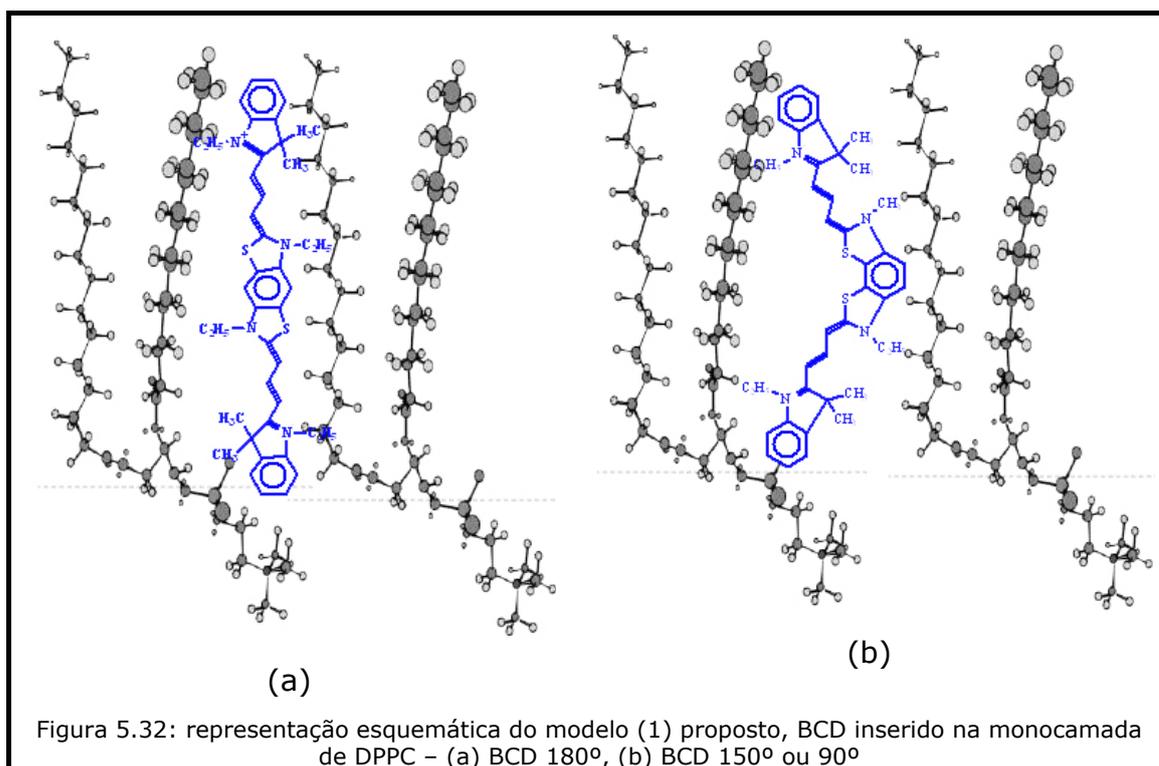
5.4 Influência da Estrutura da Molécula de BCD

Os resultados de isotermas (π -A) e (ΔV -A) mostram que a interação DPPC-BCD depende da estrutura dos corantes, sendo que o efeito diminui na seqüência BCD180° > BCD150° ≥ BCD90°. Este resultado pode estar associado com a diminuição da afinidade dos corantes com a região entre a parte polar e parte

hidrofóbica da monocamada. Esta afinidade deveria aumentar quando a solubilidade de um composto em água diminui. Entretanto, os resultados mostraram o contrário, uma vez que a solubilidade em água, dos BCD, diminui na seqüência $BCD180^\circ > BCD150^\circ > BCD90^\circ$. Assim, associamos a diferença do efeito dos BCD na monocamada com a estrutura espacial de suas moléculas.

Com base nos resultados apresentados, sugerimos duas possibilidades de interação entre as moléculas de BCD e DPPC:

- MODELO 1: as moléculas de BCD, que penetram na monocamada, ficam paralelas às cadeias hidrofóbicas do DPPC, interagindo tanto com a parte hidrofóbica quanto com a parte polar (cabeça), conforme representação esquemática mostrada na figura 5.32.



Podemos ver desta figura que no caso da estrutura linear da molécula de BCD (ângulo entre cromóforos 180°) o contato entre as moléculas do BCD e de DPPC é maior e a estrutura da monocamada é mais compacta. Se compararmos com a inclusão na monocamada dos corantes com ângulos 150° e 90° entre os cromóforos, estes corantes dificultam os contatos entre as moléculas de DPPC e

com moléculas do corante, diminuindo a estabilidade da monocamada (aumento da energia livre do sistema). Isto pode explicar a maior interação entre o DPPC e o BCD180° do que com os BCD 150° e 90°, observada nos resultados de pressão e potencial superficial obtidos.

- MODELO 2: as moléculas de BCD se inserem na região polar da monocamada, conforme representação esquemática mostrada na figura 5.33.

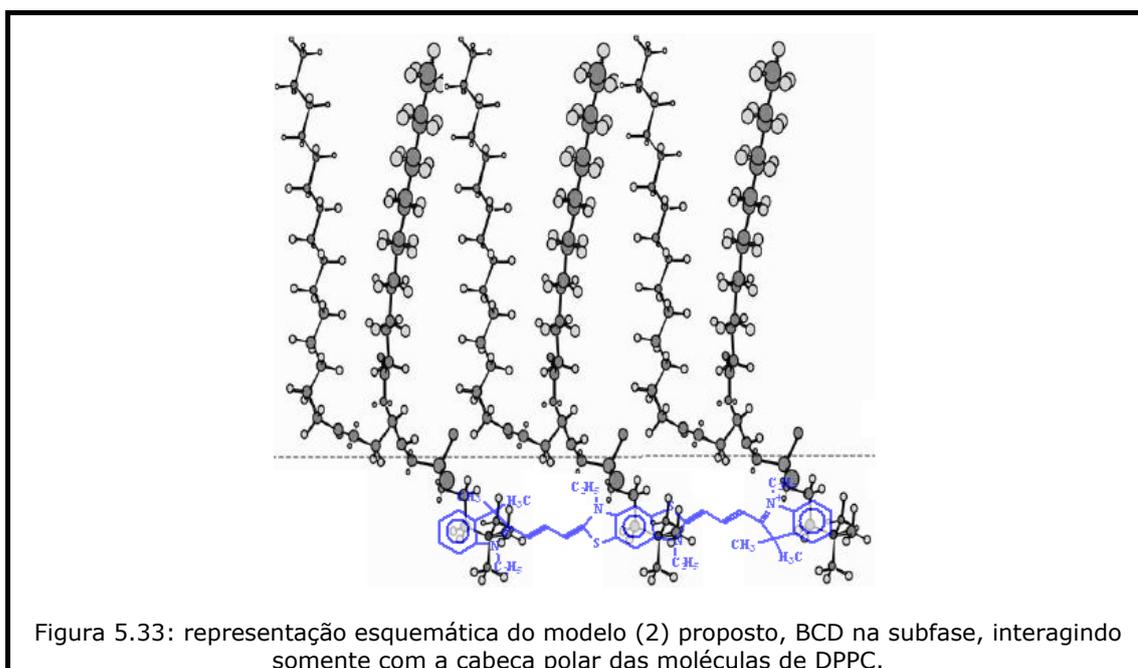


Figura 5.33: representação esquemática do modelo (2) proposto, BCD na subfase, interagindo somente com a cabeça polar das moléculas de DPPC.

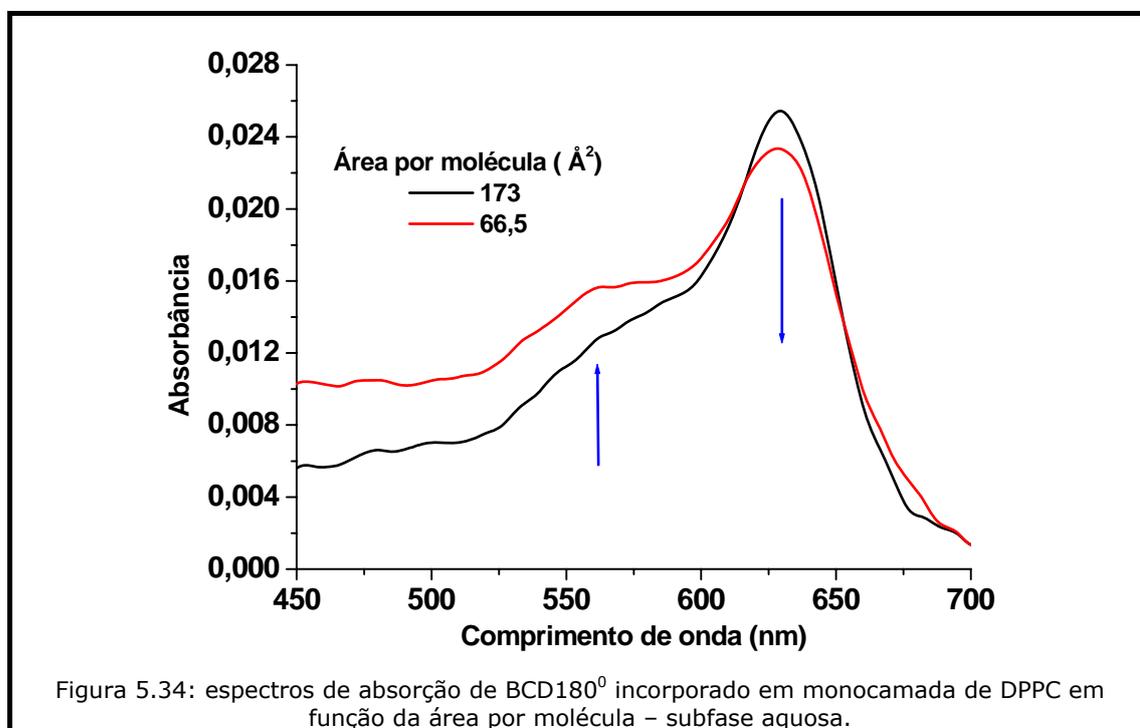
Neste segundo modelo proposto a estrutura espacial dos BCD não deveria ser um fator relevante na sua interação com o DPPC, como é no modelo 1.

O fato do aumento da área mínima por molécula ser proporcional à concentração do BCD pode estar associado com a inclusão das moléculas do BCD entre as cadeias hidrofóbicas da monocamada na direção perpendicular com o plano da superfície.

Baseando nisso supomos que o modelo 1 é mais adequado para explicar a interação dos BCD com a monocamada.

5.5 Espectroscopia de Absorção UV-Visível

Os espectros de absorção das monocamadas na presença de BCD180⁰ foram medidos em função da área por molécula. Devido à baixa sensibilidade do aparelho foi possível somente medir os espectros das monocamadas mistas com uma %_{BCD} acima das utilizadas nas medidas de pressão superficial, potencial superficial e BAM. Somente foram obtidos espectros da monocamada mista de DPPC+BCD180⁰ em subfase aquosa e com número de mols de DPPC igual ao de BCD, ou seja, para cada molécula de DPPC há uma molécula de BCD 180⁰. Alguns espectros obtidos estão mostrados na figura 5.34.

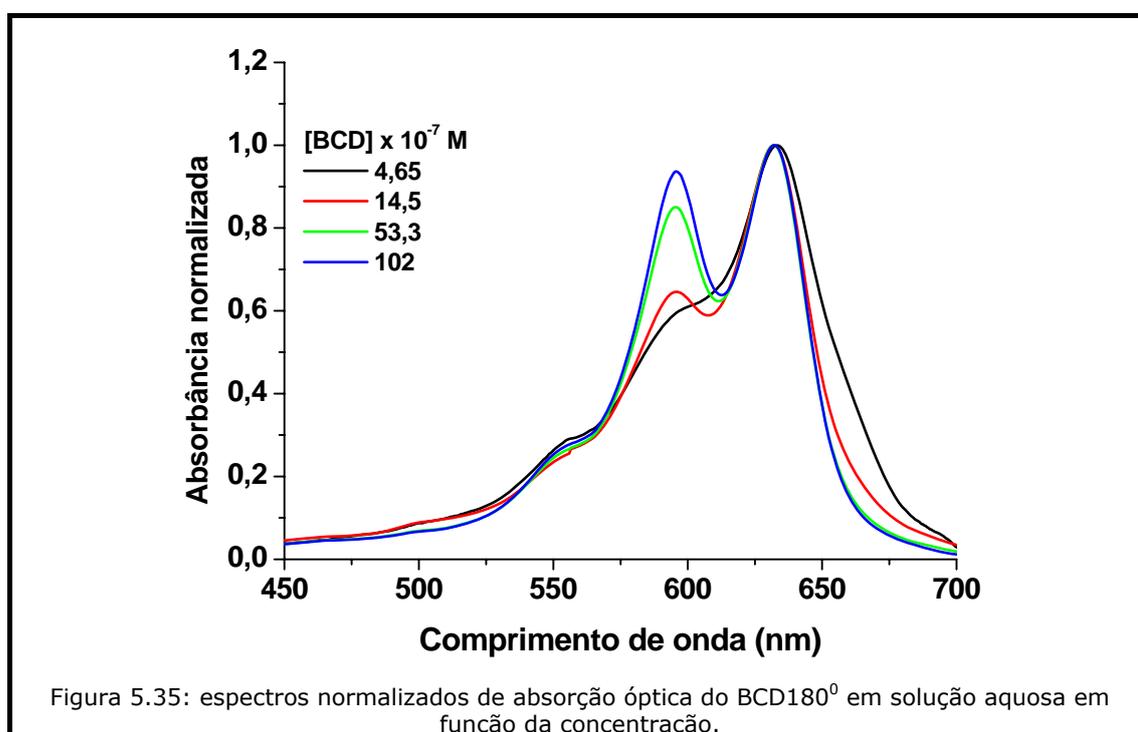


A diminuição da área por molécula de 173 Å² (fase G) até 66,5 Å² (transição de fase LE/LC) induz a redução do pico principal de absorção do BCD180⁰ em 630 nm e aumenta a absorção na região de "ombro" $\lambda < 600$ nm (figura 5.34). Estas mudanças espectrais podem ser associadas com a mudança de concentração do BCD 180⁰ enquanto a área diminui, ou com a mudança do ambiente, onde o BCD se encontra quando se liga aos domínios formados.

Para uma melhor análise dos espectros obtidos do BCD 180⁰ incorporado na monocamada de DPPC, comparamos estes espectros com espectros

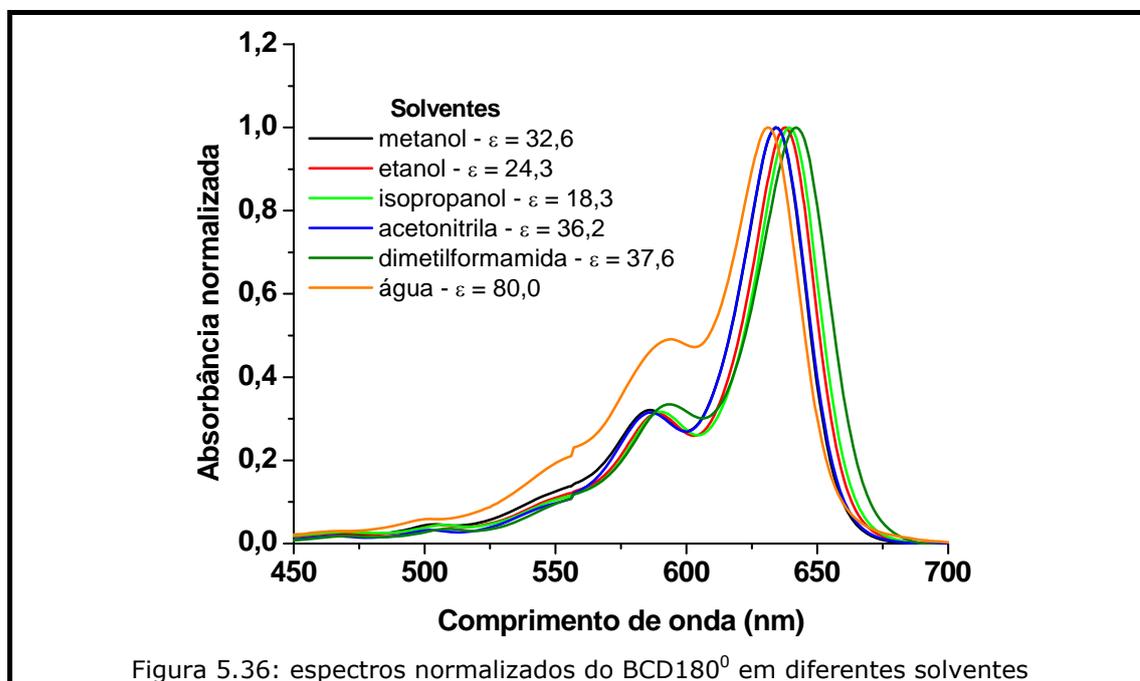
normalizados do BCD 180° em função de sua concentração e em alguns solventes com diferente constante dielétrica e capacidade de formar pontes de hidrogênio.

Na figura 5.35 são mostrados os espectros normalizados de absorção para BCD180° em várias concentrações em solução aquosa. Pode se observar que o aumento da concentração do BCD180°, diminui a intensidade relativa do pico em $\lambda = 630$ nm enquanto a intensidade relativa na região $\lambda < 620$ nm aumenta, formando um novo pico de absorção em $\lambda = 595$ nm.



Na figura 5.36 são apresentados os espectros normalizados de absorção do BCD180° em solventes próticos e apróticos, que possuem diferentes constantes dielétricas (ϵ). Solvente prótico é um solvente que carrega uma ponte de hidrogênio entre um átomo eletronegativo, por exemplo, o oxigênio em um grupo hidroxila ou um nitrogênio em um grupo amina, e um átomo de hidrogênio presente nestes grupos. Convencionalmente, solventes apróticos são aqueles, que não têm capacidade de formar pontes de hidrogênio. A partir destes espectros, pode-se observar que em solventes orgânicos a intensidade de absorção relativa na região $\lambda < 595$ nm é menor do que em água. Portanto, pode-se concluir que as mudanças espectrais do BCD180° incorporado na

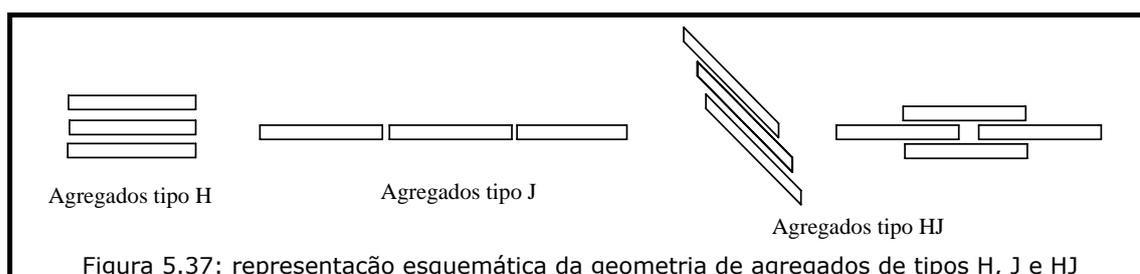
monocamada de DPPC (figura 5.34) são devidas ao aumento de sua concentração e não devido à mudança de ambiente.



O aparecimento de um novo pico de absorção em menores comprimentos de ondas é característico da formação de agregados. Na literatura são considerados dois tipos básicos de agregados de moléculas (Forster e Konig 1957, Kasha 1963):

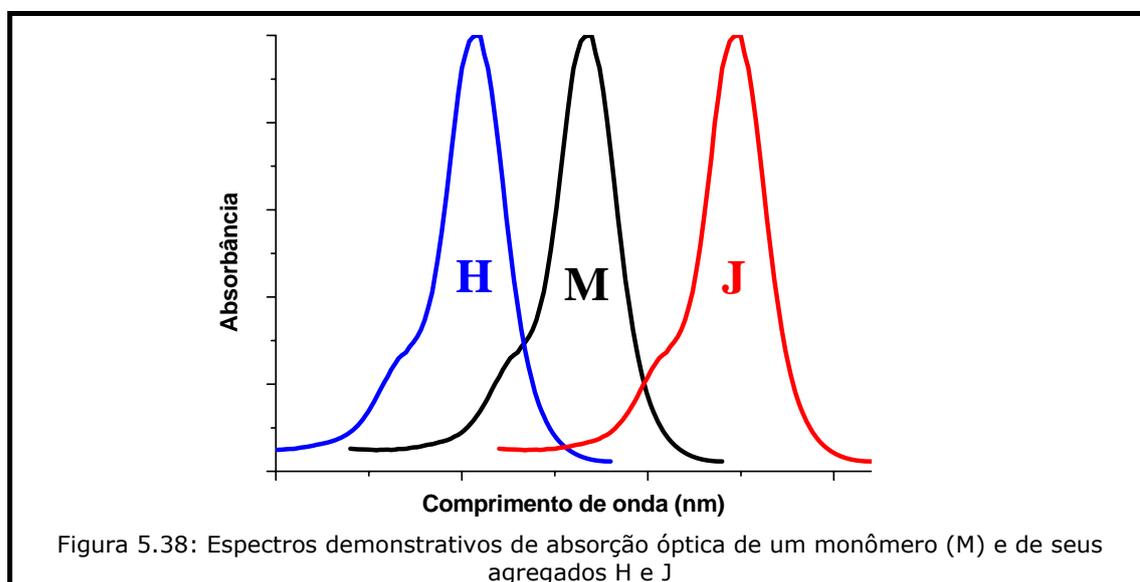
- c₁) **tipo J** ou "edge-to-edge": agregados com ângulo de 180° entre os monômeros e;
- c₂) **tipo H** ou "face-to-face": agregados com 0° entre os monômeros.

Na realidade em muitos casos podem ser observados agregados mistos, denominado tipo HJ, onde o contato "face-to-face" não é completo. Na figura 5.37 são mostrados esquemas destes possíveis agregados.



A estabilidade do agregado depende da sobreposição das nuvens de elétrons dos monômeros. Por isso os agregados H, que possuem maior possibilidade para essa sobreposição, deveriam ser mais estáveis. Contudo, vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H, favorecendo a formação dos do tipo J. Estudos, de diversos sistemas, demonstraram a formação dos agregados do tipo J tanto experimentalmente quanto teoricamente (Van der Auweraer e Scheblykin 2002, Shklyarevskiy et al. 2002, von Berlepsch et al. 2002).

Os níveis de energia dos agregados dependem da orientação relativa entre os dipolos dos monômeros (Forster e König 1957; Kasha 1963). As intensidades relativas das bandas dos espectros de absorção dependem do ângulo entre os dipolos das moléculas que formam os agregados. Para os agregados do **tipo J** a maior intensidade de absorção é observada na região de comprimentos de onda maiores que dos monômeros do mesmo composto; para os do **tipo H** a banda de absorção é deslocada para comprimentos de onda menores, conforme ilustra os espectros mostrados na figura 5.38.



Os espectros do BCD, obtidos na monocamada, mostram que a diminuição da área por molécula aproxima as moléculas de BCD formando agregados tipo H. Este resultado não está em controvérsia com a nossa sugestão da localização das moléculas de BCD na monocamada: em posição vertical, paralelo com as cadeias hidrofóbicas do fosfolipídio. Realmente, neste caso a formação dos agregados de

tipo J não é possível. Entretanto, se o BCD se localiza na posição horizontal entre as cabeças polares dos fosfolípidios a formação dos agregados H também é possível. Então, mesmo que não possamos usar os dados espectroscópicos como uma comprovante do modelo sugerido, estes resultados, no mínimo, não contradizem o modelo proposto.

Capítulo 6 Conclusões

A partir da análise das isotermas de pressão superficial (π -A), curvas do módulo de compressibilidade (Cs^{-1}), isotermas de potencial superficial (ΔV -A) e as imagens obtidas através da microscopia por ângulo de Brewster, todos em função da porcentagem dos BCD na monocamada de DPPC, podemos concluir que:

- a presença dos BCD estimula a formação dos domínios de DPPC sem mudar seu formato, mas diminuindo seu tamanho;
- este efeito está associado com uma blindagem da carga negativa da cabeça polar pela carga positiva do BCD, diminuindo a repulsão entre as moléculas de DPPC;
- devido à presença da carga positiva do BCD nos domínios, estes adquirem uma carga líquida positiva, que aumenta a repulsão entre eles. Isto nivela a diferença entre fases líquida expandida e líquida condensada da monocamada, aumenta a área mínima por molécula e torna a fase condensada da monocamada mais elástica;
- a análise das isotermas (ΔV -A) indicou que os BCD não contribuem no valor do potencial superficial medido;
- a presença de NaCl na subfase aumenta o efeito dos BCD na formação da monocamada de DPPC. Este efeito sinérgico é devido às interações mútuas dos ânions Cl^- com a carga positiva do grupo trimetilamônio da cabeça polar do DPPC e das cargas positivas do BCD com carga negativa do grupo fosfato do DPPC;

A análise dos espectros de absorção do BCD inserido na monocamada mostrara que o BCD na monocamada condensada forma agregados do tipo H e não agregados do tipo J.

Baseando-se na análise do efeito da estrutura dos BCD na sua interação com a monocamada, e nos espectros de absorção óptica propusemos dois modelos de

interação dos BCD com a monocamada, e acreditamos que o modelo 1, apresentado abaixo, represente melhor o sistema:

- *modelo 1: as moléculas de BCD se inserem na monocamada, paralelamente ao eixo da molécula de DPPC, interagindo tanto com a cauda hidrofóbica quanto com a cabeça polar.*

Entretanto, os dados obtidos não são suficientes para excluir o modelo 2 proposto:

- *modelo 2: as moléculas de BCD localizam-se na parte polar da monocamada, perpendicular ao eixo da molécula de DPPC.*

Para propor um modelo definitivo para a interação DPPC-BCD é necessário realizar um trabalho futuro que complemente os resultados apresentados neste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Alcântara Jr P., *“Espectroscopia molecular”*, Curso Física Moderna II, Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Física, **2002**.
- Almeida P., *Cianinas: corantes multicoloridos mas apenas “funcionais”*, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.
- Armitage B.A., *Top. Curr. Chem.*, 253 (**2005**) 55.
- Aroti A., Leontidis E., Maltseva E., Brezesinski G., *J. Phys. Chem. B*, 108 (**2004**) 15238.
- Blodgett K.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 57 (**1935**) 1007.
- Blodgett K.B. e Langmuir I., *Phys. Rev.*, 51 (**1937**) 964.
- Bonnett R., *Tetrahedron*, 57 (**2001**) 9513.
- Borisevitch Yu.E., Kuzmin V.A., Mikhailenko F.A., Dyadyusha G.G., *Academy of Science of the USSR*, 228 (**1976**) 448.
- Borissevitch I.E., *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*, 241 (**1978**) 743.
- Borissevitch G.P., Tabak M., Oliveira Jr O.N., *Biochim. Biophys. Acta*, 1278 (**1996**) 12.
- Brezesinski G., Scalas E., Struth B., Möwal H., Bringezu G., Gehlert U., Weidemann G., Vollhardt D., *J. Phys. Chem.*, 99 (**1995**) 8755.
- Brockman H., *Curr. Oppi. Struct. Biol*, 9 (**1999**) 438.
- Cantor C.R. e Schimmel P.R., *“Biophysical Chemistry: Part II - Techniques for the Study of Biological and Structure Function”*, [S.l.]: W. H. Freeman & Co. Ltd, (**1980**).
- Caseli L., *“Influência da âncora de glicosilfosfatidilinositol na imobilização da fosfatase alcalina de placa óssea imobilizada em sistemas miméticos de membranas celulares: monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett de fosfolipídios”*, Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, (**2005**).

- Caseli L., Moraes M. L., Zucolotto V., Ferreira M., Nobre T.M., Zaniquelli M.E.D., Rodrigues U.P., Oliveira Jr O.N., *Langmuir*, 22 (2006), 8501.
- Cevc G. e Marsh D., *“Phospholipid Bilayers, Physical Principles and Models”*, Wiley Interscience, New York, 1987.
- Collins K.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 92 (1995) 5553.
- Collins K.D., *Biophys. J.*, 72 (1997) 65.
- Davies J.T. e Rideal E. K., *“Interfacial Phenomena”*, Academic Press, New York, 1961.
- Demchak R. J. e Fort T., *J. Colloid Interface Sci.*, 46 (1974) 191.
- Deschenaux R., Megert S., Zumbunn C., Ketterer J., Steiger R., *Langmuir*, 13 (1997) 2363.
- Eeman M., Berquand A., Dufrêne Y.F., Paquot M., Dufour S., Deleu M., *Langmuir*, 22 (2006) 11337.
- Ferreira M., Caetano W., Itri R., Tabak M., Oliveira Jr. O. N., *Quim. Nova*, 28 (2005) 502.
- Forster T. e König E., *Zeitschrift für Elektrochemie*, 3 (1957) 344.
- Franks L.M., Teich N., *Introdução a biologia celular e molecular do câncer*, 1ª ed., (1990). Ed. Rocca (Brasil).
- Gehlert U., Weidemann G., Vollhardt D., Brezesinski G., Wagner R., Möwald H., *Langmuir*, 14 (1998) 2112.
- Gennis R.B., *“Biomembranes: Molecular Structure and Function”*, Springer, New York.
- Girard-Egrot A.P., Godoy S., Blum L.J, *Advances in Colloid and Interface Science*, 116 (2005) 205.
- Gorter E., Grendel R., *J. Exp. Med.*, 41 (1925) 439.
- Grishina A.D., Gorbunova Yu.G., Enakieva Yu.Yu., Krivenko T.V., Savel'ev V.V., Vannikov A.V., Tsivadze A.Yu., *High Energy Chemistry*, 42 (2008) 297.
- Héron S. e Meunier J., *Rev. Sci. Instrum.*, 62 (1991) 936.

- James T. H., "The Theory of the Photographic Process", Macmillan Pub. Co.: New York (1977).
- Jones M.N. e Chapman D., "Micelles, Monolayers and Biomembranes", Wiley-Liss (1995).
- Kasha M., *Radiat. Res.*, 20 (1963) 55.
- Klopfer K.J. e Vanderlick T.K., *J. Colloid Interface Sci.*, 182 (1996) 220.
- Krüger P. e Lösche M., *Phys. Rev. B*, 62 (2000) 7031.
- Kuzmin V.A., Borissevitch Yu.E., Dyadyusha G.G., Mikhailenko F.A., *Revue of Academy of Sciences of the USSR*, 229 (1976) 616.
- Langmuir I., *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1917) 1848.
- Miñones Jr. J., Patino J. M. R., Conde O., Carrera C., Seoane R., *Colloids Surf. A*, 203 (2002) 273.
- Ochsner M., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 39 (1997) 1.
- Ogulchansky T. YU., Yashcuk V.M., Losytsky M. YU., Kocheshev I.O., Yarmoluk S.M., *Spectrochim. Acta Part A*, 56 (2000) 805.
- Oliveira Jr O.N., "Electrical properties of Langmuir monolayers and deposited Langmuir-Blodgett films", Thesis of Doctor of Philosophy, School of Electronic Engineering Science, University of Wales, Bangor, United Kingdom (1990).
- Overberck G. A., Hönig D. Wolthaus L., Gnade M., Möbius D., *Thin Solid Films*, 242 (1994) 26.
- Owen D.J., VanDerveer D., Schuster G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 1705.
- Paterno L.G., Mattoso L.H.C, Oliveira Jr O.N., *Quím. Nova*, 24 (2001) 228.
- Patino J. M. R., Sánchez C. C., Niño R. R., *Langmuir*, 15 (1999) 4777.
- Pavinatto F.J., Pavinatto A., Caseli L., Santos Jr D.S., Nobre T.M., Zaniquelli M.E.D., Oliveira Jr O.N., *Biomacromolecules*, 8 (2007) 1633.
- Phillips M.C., Chapman D., *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 301.
- Robertson J. D., *Biophys. Biochem. Cytol.*, 3 (1957) 1043.
- Robertson J. D., *Biophys. Biochem. Cytol.*, 4 (1958) 39.

- Robertson J. D., *"In molecular biology"*, Academic Press, Inc., New York (1960).
- Robertson J. D., *"In cellular membranes in development: proceedings of the XXII Symposium of the Society for the Study of Development and Growth"*, Academic Press, Inc., New York (1963).
- Robertson J. D., *J. Cell Biol.*, 91 No. 3 Pt. 2 (1981) 189s.
- Schaberle F.A., *"Estudo das características espectroscópicas dos corantes cianícos com dois cromóforos na interação com DNA: efeitos da força iônica"*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, (2002).
- Schaberle F.A., *"Efeitos do Meio e da Interação com DNA e Micelas nas Características Espectrais dos Corantes Cianícos com Dois Cromóforos"*, Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, (2007).
- Seelig J., *Q. Rev. Biophys.*, 10 (1977) 353.
- Shah D.O. e Schulman J.H., *J. Colloid Interf. Sci.*, 25 (1967) 107.
- Shapovalov V.L., *Thin Solid Films*, 327-329 (1998) 599.
- Shklyarevskiy O., Boamfa M. I., Christianen P. C. M., Touhari F., van Kempen H., Deroover G., Callant P., Maan J. C., *J. Chem. Phys.*, 116 (2002) 8407.
- Singer S.J., Nicolson G.L., *Science*, 175 (1972) 720.
- Tanford C., *"The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes"*, 2nd Edn., Wiley, New York (1980).
- Tania K., Matsuzakia K., Kodamaa Y., Fukitaa M., Kodairac T., Horiuchia H., Okutsua T., Hiratsuka H., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 199 (2008) 150.
- Taylor D. M., Oliveira Jr. O. N., Morgan H., *J. Colloid Interface Sci.*, 139 (1990) 508.
- Van der Auweraer M. e Scheblykin I., *Chem. Phys.*, 275 (1-3) (2002) 285.
- Vilallonga F.A., Garret E.R., Cereijido M., *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 1720.
- Vogel V. e Möbius D., *J. Colloid Interface Sci.*, 126 (1988) 408.
- Vollhardt D., *Adv. Colloid Interface Sci.*, 64 (1996) 143.

von Berlepsch H., Kirstein S., Bottcher C., *Langmuir*, 18 (2002) 7699.

WHO – World Health Organization (2006).

Wisniewska A., Draus J., Subczynski W.K., *Cell. Mol. Boil. Lett.*, 8 (2003) 147.

Xia X.F., Wang F., Yang M.S., Sui S.F., *Colloids Surf. B*, 39 (2004) 105.

Yang X.M., Xiao D., Xiao S.J., Wei Y., *Appl. Phys. A*, 59, (1994) 139.

Yarmoluc S.M., Kostenko A.M., Dubey I.Y., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 10 (2000) 2201.