UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOÃO FRANCISCO VENTRICI DE SOUZA

"Efeito de Materiais Particulados em Sistemas Modelos de Biomembranas"

JOÃO FRANCISCO VENTRICI DE SOUZA

"Efeito de Materiais Particulados em Sistemas Modelos de Biomembranas"

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

Área de Concentração: Química Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

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

Souza, João Francisco Ventrici de

Efeitos de Materiais Particulados em Sistemas Modelos de Biomembranas. Ribeirão Preto, 2012.

80 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Zaniquelli, Maria Elisabete Darbello.

1. Tensoativos Pulmonares 2. Material Particulado 3. Monocamadas 4. DPPC 5. Colesterol

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Francisco Ventrici de Souza

"Efeito de Materiais Particulados em Sistemas Modelos de Biomembrana"

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

Área de Concentração: Química Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).		
Prof(a). Dr(a).		
Prof(a). Dr.		
Trabalho Defendid	o e Aprovado pela Banca Examinado	ora em//2012

Esta dissertação é dedicada à Professora Maria Elisabete Darbello Zaniquelli, em quem me inspiro não só como profissional, mas como pessoa.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli pela dedicação, atenção e confiança depositada em mim para desenvolver este trabalho.

Aos companheiros de laboratório Profa. Dra. Ana Paula Ramos, Camila Bussola, Roberta Pugina e Douglas Monteiro, sem os quais não teria dias tão agradáveis no trabalho.

Agradeço aos técnicos Rodrigo Ferreira Silva e Ivana Aparecida Borin pela disposição nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM), respectivamente.

A Wallance Pazin, Marina Pires e Prof. Dr. Amando Ito pela atenção e cooperação com as análise de Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM).

Agradecimento também à Profa. Dra. Tonya Kuhl da Universidade da Califórnia, Davis, por me receber em seu laboratório durante parte das minhas pesquisas com tanta gentileza e atenção.

À Universidade de São Paulo por proporcionar um ambiente de qualidade para o desenvolvimento dos meus trabalhos e à FAPESP pelo suporte financeiro.

Finalmente à minha família por ser um alicerce à minha formação e propiciar os momentos de alegria que me sempre me deram energia para continuar seguindo em frente.

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas algumas propriedades de sistemas miméticos de tensoativos pulmonares (TP) constituídos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e DPPC/colesterol e suas interações com o material particulado (MP) proveniente da queima da palha da cana-de-açúcar, reconhecido por meio de estudos clínicos como agente agravador de diversas patologias respiratórias. O MP utilizado neste trabalho foi analisado por meio de uma série de técnicas: espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de varredura acrescida do uso de análise de energia dispersiva de raios X (MEV e MEV-EDX) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Os valores médios de tamanho e potencial zeta das partículas foram 250 nm e -27 mV, respectivamente. Isotermas de pressão superficial versus área por molécula de DPPC e DPPC/colesterol foram estudadas na ausência e presença de partículas e trouxeram informações a respeito da inserção das partículas nas monocamadas. O sistema DPPC/colesterol apresentou variações menores de área mínima por molécula com o aumento da concentração de MP, indicando que o colesterol atua como agente organizador da monocamada. Reologia superficial dilatacional dinâmica foi de oscilação harmônica da gota pendente. estudada pelo método Concentrações pequenas de MP aumentam a fluidez das monocamadas, enquanto concentrações mais elevadas aumentam a rigidez das mesmas. A presença de colesterol potencializa o efeito provocado pelo MP. Os dados de módulo de compressibilidade obtidos das isotermas se mostraram próximos daqueles obtidos nos estudos reológicos em frequências elevadas. As monocamadas foram transferidas para substratos sólidos por meio da técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Os filmes LB resultantes foram analisados por meio de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia do tempo de vida de fluorescência (FLIM). Ambas as técnicas mostraram que as partículas se depositam juntamente com o filme e que o sistema DPPC/colesterol dispõe de um arranjo mais homogêneo para as partículas. Imagens de FLIM mostraram que provavelmente esse arranjo se dá devido à preferência do colesterol em se alocar em regiões periféricas às partículas, conferindo estabilidade às mesmas na interface. O trabalho permitiu concluir que o MP proveniente da cana-deaçúcar possui efeito sobre algumas propriedades superficiais estudadas nos sistemas modelos de TP e que essas propriedades devem ter o potencial de interferir no perfeito funcionamento desses sistemas nos meios biológicos.

ABSTRACT

This work presents some of the properties of mimetic systems of pulmonary surfactants (PS) composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and DPPC/cholesterol and their interactions with particulate material (PM) originated from the burning of sugar cane leaves which is known by clinical studies as an injurious agent of the respiratory airways. The PM described in the present work was analyzed by different techniques: Dynamic Light Scattering (DLS), Scanning Electron Microscopy (SEM) with EDS (Energy Dispersive Spectrometry) and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR). The average values of size and zeta potential were 250 nm and -27 mV, respectively. DPPC and DPPC/cholesterol π -A isotherms were studied in the absence and presence of particles and it brought some information about the particle insertion in the monolayers. The DPPC/cholesterol system showed smaller changes in the minimum area per molecule with the increase of PM concentration which indicates the cholesterol acts as an organizer in the monolayer. Dilatational surface rheology data indicated that smaller PM concentrations increase the fluidity of the monolayers while the higher PM concentrations increase their rigidity. Cholesterol enhances the effects provoked by PM. Compressional modulus data obtained from the isotherms showed to be very close to those obtained from the rheological studies performed at higher frequencies. The transferred monolayers, using Langmuir-Blodgett technique, to solid supports were analyzed by Atomic Force Microscopy (AFM) and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) which showed that the particles are deposited together with the film and the

DPPC/cholesterol system presents a more homogeneous particle arrangement. FLIM images showed that most likely this arrangement is due to the preference of cholesterol to allocate in regions surround the particles, granting stability to them in the monolayers. The study allowed concluding that PM originate from burned sugar cane leaves has an effect over some features of PS model systems and those properties have the potential to interfere in the perfect performance of these systems in biological environments.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema mostrando a monocamada de tensoativos pulmonares e
reservatório adjacente composto de multicamadas de lipídeos 2
Figura 2. Lipídeos utilizados: Colesterol (acima) e DPPC (abaixo) 4
Figura 3. Esquema de uma cuba de Langmuir: (A) vista lateral representando a
monocamada sendo comprimida e (B) vista de topo mostrando como a pressão
superficial (π) corresponderia a uma força por unidade de comprimento com a qual a
interface contendo a monocamada tenta se expandir em relação à interface limpa sem
a monocamada. As setas indicam a direção da compressão11
Figura 4. Esquema do tensiômetro utilizado para as medidas de viscoelasticidade 13
Figura 5. Esquema de uma gota pendente centro-simétrica e os parâmetros utilizados
na determinação da tensão superficial γ (Ravera, Ferrari e Liggieri 2000)14
Figura 6. Representação das oscilações aplicada e de resposta de um sistema, e as
indicações das respectivas diferenças
Figura 7. Esquema das técnicas LB (a) e LS (b), mostrando a subfase aquosa, as
barreiras móveis da cuba de Langmuir comprimindo um filme monomolecular na
interface ar-água e o suporte sólido (Rubinger et al. 2006)
Figura 8. Indicação das camadas iônicas ao redor de uma partícula e os potenciais a
elas associadas
Figura 9. Diagrama de energia potencial entre dois átomos ou duas superfícies,
mostrando os pontos onde os modos de análise de AFM estão situados23
Figura 10. Esquema de preparação das dispersões da palha de cana queimada 26
Figura 11. Imagem de MEV para as partículas espalhadas sobre uma lâmina de vidro.
Figura 12. Gráfico da distribuição de tamanhos das partículas. O valor médio é de
cerca de 250 nm

Figura 13. Espectro de absorbancia das particulas na região do infravermeino 35
Figura 14. Comportamento de monocamadas de DPPC para diferentes temperaturas:
■10 °C; ●25 °C; ▲29 °C; ▼33 °C; ▶36 °C; ●40°C
Figura 15. Isotermas de monocamadas de DPPC, obtidas a 36 \pm 0,5° C, contendo
diferentes [MP]: ■ 0; ● 2; ▲ 4 e ▼ 8 ppm
Figura 16. Isotermas de monocamadas de DPPC/colesterol (90/10 p/p), obtidas à 36 ±
0,5°C em diferentes [MP]: ■ 0; ● 2; ▲ 4 e ▼ 8 ppm39
Figura 17. Comportamento de E em função de [MP] para os sistemas: (A) DPPC e (B)
DPPC/colesterol. ■ 0,150 Hz; ● 0,225 Hz; ▲ 0,300 Hz; ▼ 0,375 Hz e ◀ 0,450 Hz., na
pressão de 30 ± 1 mN m ⁻¹ e na temperatura de 36 ± 0,5 °C44
Figura 18. Comportamento de E em função de [MP] em diferentes frequências: (A)
0,150 Hz; (B) 0,225 Hz; (C) 0,300 Hz; (D) 0,375 e (E) 0,450. ■ DPPC e ●
DPPC/colesterol (90/10 p/p), à 36 <u>+</u> 0,5°C49
Figura 19. Comportamento de E em função da frequência em diferentes condições: ■
DPPC em [MP] = zero; O DPPC em [MP] = 2 ppm; \triangle DPPC em [MP] = 4 ppm; \blacktriangledown
DPPC em [MP] = 8 ppm; ◀ DPPC/colesterol em [MP] = zero; ▶ DPPC/colesterol em
[MP] = 2 ppm; ◆ DPPC/colesterol em [MP] = 4 ppm e ● DPPC/colesterol em [MP] = 8
ppm, à 36 <u>+</u> 0,5°C50
Figura 20. Imagens de AFM para o sistema DPPC em diferentes [MP]: (A) zero; (B) 2
ppm; (C) 4 ppm e (D) 8 ppm
Figura 21. Esquema do provável formato das partículas analisadas53
Figura 22. Análise de perfil das partículas do sistema de DPPC em [MP] igual a 8 ppm.
54
Figura 23. Imagens de AFM para o sistema DPPC/colesterol em diferentes [MP]: (A)
zero; (B) 2 ppm; (C) 4 ppm e (D) 8 ppm
Figura 24. Imagens de FLIM para os diferentes sistemas de monocamadas e [MP].
DPPC/Chol10 corresponde a uma razão 90/10 (p/p) DPPC/colesterol58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Analise química elementar do MP obtido da quelma da palha da cana-de-
açúcar como obtido por EDS33
Tabela 2. Bandas de absorção observadas e as estruturas correspondentes de acordo
com as referências (Andrade et al. 2010; Hamelmann et al. 2005; Lepesant, Powers e
Pershan 1978; Li et al. 2001)36
Tabela 3. Relação das Áreas Mínimas por Molécula para os diferentes sistemas e as
estimativas das áreas ocupadas pelas partículas, 36 ± 0,5 °C40
Tabela 4. Grau de ocupação das partículas nas monocamadas41
Tabela 5. Pressões de colapso para os diferentes sistemas de monocamadas, à 36 <u>+</u>
0,5 °C42
Tabela 6. Fator de Compressibilidade, C _s -1, para os diferentes sistemas de
monocamadas, à 36 <u>+</u> 0,5 °C42
Tabela 7. Comparação de C_s^{-1} e E, para os diferentes sistemas de monocamadas, à
36 <u>+</u> 0,5 °C

Sumário

FOLHA DE APROVAÇÃO	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
Lista de Figuras	viii
Sumário	xi
Capítulo 1: Introdução	1
1.1. Tensoativos Pulmonares	1
1.2. Uso de Monocamadas como Modelos de Biomembranas	4
1.2.1. Monocamadas de DPPC e colesterol	5
1.3. Material Particulado e efeitos à saúde	7
1.4. Objetivos	10
Capítulo 2: Fundamentos dos Métodos Experimentais	10
2.1. Monocamadas de Langmuir e Isotermas π -A	10
2.3. Filmes Langmuir-Blodgett (LB)	17
2.4. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	18
2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	22
2.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)	23
2.7. Espectroscopia de Absorção na Região do InfraVermelho	24
2.8. Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência	24
Capítulo 3: Materiais e Métodos	26
3.1. Produção de Partículas e Dispersão	26
3.2. Isotermas π-A	27
3.3. Filmes LB	28
3.4 Reologia de monocamadas	28
3.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	29
3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
3.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)	29
3.8. Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)	30
3.9. Espectroscopia na Região do Infravermelho	30
Capítulo 4: Resultados e Discussão	31
4.1. Análise das Partículas	31
4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31

4.2.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	33
4.2.3. Espectroscopia na Região do Infra-Vermelho	35
4.3. Estudo do Comportamento das Monocamadas	37
4.3.1. Isotermas π-A	37
4.3.2. Reologia	43
4.2. Análise dos Filmes LB	51
4.2.1. Microscopia de Força Atômica (AFM)	51
4.2.2. Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)	56
Capítulo 5: Conclusões	59
Capítulo 6: Referências Bibliográficas	60

Capítulo 1: Introdução

1.1. Tensoativos Pulmonares

O sistema de tensoativos pulmonares (TP) é constituído de proteínas, lipídios saturados e insaturados, que adsorvem na interface ar/líquido do pulmão, formando uma monocamada e mantendo um reservatório associado (Fig. 1). Devido à sua compactação, tensões superficiais inferiores a 1 mN m⁻¹ são atingidas ao final da expiração, quando a área superficial dos pulmões é mínima. Além disso, os TP conferem propriedades mecânicas necessárias às funções dos pulmões.

O TP é composto de aproximadamente 90% de lipídios (Dobbs, 1989; Goerke 1998), sendo o restante de proteínas associadas, especificamente ou não, e com alguns aspectos funcionais dos lipídios. A fração lipídica é uma mistura complexa na qual 80% são fosfatidilcolinas, (10-15)% fosfatidilgliceróis, acrescidos de fosfatidildietanolamina, fosfatidilinositol e esfingomielina, com (2-3)% cada um, mais liso-bis-ácido fosfatídico. De qualquer forma, destacam-se como principais componentes o dipalmitoilfosfatilcolina (DPPC) e o 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina, apresentando-se também em quantidades consideráveis o dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e o 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilglicerol (POPG). Os lipídios neutros correspondem a ~4%, dos quais 90% é colesterol (Goerke, 1998), que apresenta funções importantes (Orgeig; Daniels, 2001; Tolle et al., 2002).

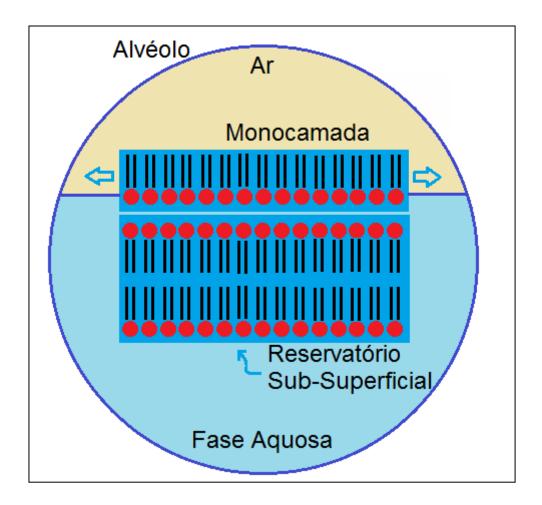


Figura 1. Esquema mostrando a monocamada de tensoativos pulmonares e reservatório adjacente composto de multicamadas de lipídeos.

Dentre as proteínas que compõe o TP, são quatro as principais, sendo duas pequenas e hidrofóbicas, denominadas SP-B e SP-C e, as outras duas, glicoproteínas hidrofílicas, mais complexas denominadas SP-A e SP-D, sendo a SP-A (Wong et al., 1996) a mais abundante das proteínas do TP. Apesar da função desta proteína não ser completamente esclarecida destaca-se um papel na defesa imune pulmonar, em decorrência de sua capacidade de se ligar a carboidratos (LeVine et al., 1999). Estudos demonstram que a SP-A interage com mono e bicamadas lipídicas, podendo restaurar as propriedades biofísicas do tensoativo oxidado (Rodriguez-Capote; McCormack; Possmayer, 2003) e

fazendo a mediação da assimilação de fosfatidilcolina pelas células tipo II do alvéolo (Tsuzuki; Kuroki; Akino, 1993).

O Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Fig.2) é um fosfolipídeo zwitteriônico, correspondendo a 93-96% dos lipídeos, enquanto colesterol apresenta-se com composições variando em humanos entre 5 a 10% (Diemel et al., 2002).

Recentemente, usando fosfolipídios marcados radioativamente, mostrou-se que a composição de ambos, monocamada adsorvida e reservatório associado, devem ter composições semelhantes (Yu; Possmayer, 2003), ou seja, não há adsorção preferencial de nenhum dos fosfolipídios. Entretanto, sabe-se que em um indivíduo não saudável a composição relativa de colesterol pode aumentar significativamente.

Reconhece-se que o colesterol tem papel fundamental nas membranas alveolares. Essa molécula favorece a adsorção das moléculas de DPPC à interface líquido-ar, ou seja, à membrana alveolar (Buschmann; Schollmeyer, 1992; Buschmann; Schollmeyer, 1993). Além disso, confere propriedade plastificante à membrana (Tierney; Block; Longo, 2005), o que significa uma maleabilidade maior da membrana quando comparada com uma membrana constituída somente de DPPC.

Figura 2. Lipídeos utilizados: Colesterol (acima) e DPPC (abaixo).

Uso de Monocamadas como Modelos de Biomembranas

Uma das mais efetivas técnicas no estudo de propriedades físicoquímicas de interfaces líquidas é a de Langmuir (Langmuir 1917; Davies;
Rideal, 1961; Dynarowicz-Łatka; Dhanabalan; Oliveira Jr, 2001). Quando
moléculas insolúveis de natureza anfifílica, ou seja, as que possuem uma longa
cadeia apolar e um grupamento polar, são dispostas na superfície de um
líquido de alta tensão superficial (água, por exemplo) a tendência é que essas
moléculas se espalhem na superfície do líquido formando um filme da
espessura de uma molécula, o que é chamado de monocamada. Esse
processo ocorre devido ao efeito hidrofóbico e a consequência é que os grupos
polares dessas moléculas anfifílicas orientam-se em relação ao líquido de alta
tensão superficial, enquanto a cauda apolar volta-se para o exterior da solução,
ocorrendo um ordenamento dessas moléculas na superfície do líquido. Essas
monocamadas podem ser convenientemente comprimidas resultando em

monocamadas altamente orientadas. Paralelamente, medidas macroscópicas dessas monocamadas, que compreendem variações de tensão superficial ou potencial superficial, ou ainda microscópicas de várias naturezas, permitem inferir sobre o comportamento das moléculas presentes na interface.

Uma vez que moléculas constituintes de membranas biológicas são geralmente anfifílicas, e a sua constituição principal é a de uma bicamada lipídica com proteínas ligadas de diferentes formas, a utilização de monocamadas de Langmuir, que correspondem à metade de uma bicamada, se mostra muito efetiva no estudo de sistemas modelos de biomembranas (Wiecek et al., 2008; Maggio et al., 2005; Gidalevitz et al., 2003; Lourenzoni et al., 2007). Inclusive em nosso grupo de pesquisa, tem-se demonstrado a utilidade dessa ferramenta na investigação da interação entre fosfolipídios com: peptídeos, anestésicos, polissacarídeos e proteínas; imobilização de proteínas e propriedades dinâmicas de monocamadas de Langmuir (Caseli et al., 2005a; Caseli et al., 2005b). Mais recentemente, temos estudado o efeito de material particulado, proveniente da queima das folhas de cana-de-açúcar, em monocamadas de fosfolipídios contendo diferentes teores de colesterol. Esse sistema modelo já havia sido utilizado (Wustneck et al., 2005) para estudar monocamadas de fosfolipídios acrescidas de algumas proteínas de extratos pulmonares.

1.2.1. Monocamadas de DPPC e colesterol

Monocamadas de DPPC juntamente com colesterol já foram bastante estudadas e suas principais propriedades se encontram bem descritas na literatura. Um dos exemplos é o poder do colesterol em melhorar o

reespalhamento da monocamada após uma compressão (Yu; Possmayer, 1988; Fleming; Keough, 1988), que é um fator essencial ao processo de respiração, uma vez que os alvéolos são comprimidos e expandidos de maneira constante e necessitam de estabilidade para que não haja o colapso das membranas. Outro efeito conferido pelo colesterol é o de condensar a monocamada (Shah; Schulman, 1967; Muller-Landau; Cadenhead, 1979), produzindo estruturas mais compactas. Ainda, estudos do efeito do pH nas propriedades de condensação do colesterol mostraram que esse fenômeno ocorre mais eficientemente em condições neutras (Gong et al., 2002). O comportamento de fase de monocamadas mistas DPPC e colesterol também é conhecido (Karmakar; Raghunathan; Mayor, 2005). Outro estudo de importância como base para as considerações feitas nesse trabalho mostra como as propriedades elásticas de sistemas contendo DPPC e colesterol variam de acordo com a proporção dos componentes (Tierney; Block; Longo, 2005), sendo que para algumas proporções, o efeito do colesterol sobre o DPPC é de aumento de fluidez, e para outras o que ocorre é o aumento da rigidez. Além das propriedades intrínsecas de monocamadas contendo DPPC e colesterol, alguns dos efeitos desses componentes sobre outras estruturas também são descritos, como por exemplo, no caso dos tensoativos pulmonares, os efeitos do colesterol em algumas das proteínas do sistema (Yu; Possmayer, 1998; Gómez-Gil; Pérez-Gil; Goormaghtigh, 2009; Gómez-Gil et al., 2009). Por fim, o efeito da desregulação da composição dos tensoativos pulmonares, em especial, o colesterol é apontado como causa de doenças respiratórias bastante sérias (Piantado; Schwartz, 2004).

1.3. Material Particulado e efeitos à saúde

Os efeitos de materiais particulados de várias naturezas têm sido estudados sobre sistemas de TP e comprovadamente se mostram nocivos às propriedades físico-químicas desse sistema. Alguns exemplos vão desde partículas a que estamos submetidos diariamente como o caso daquelas exaladas por motores de combustão à diesel (Shi et al., 2009) e alguns componentes em particular como o eicosano (Kanno; Furuyama; Hirano, 2008). Em ambos os caso, foram comprovados danos às propriedades físico-químicas de sistemas contendo componentes dos TP, além da ruptura organizacional desses sistemas. Casos mais particulares como os de trabalhadores expostos a altas concentrações de silicatos tendem a desenvolver uma patologia conhecida como silicose, que também afeta o perfeito funcionamento do TP, como descrito em alguns trabalhos (Wallace et al., 2007). Alguns tipos de nanopartículas poliméricas (Stuart et al., 2006), apesar de não disponíveis em grandes quantidades na atmosfera vêm sendo estudadas para avaliação dos possíveis efeitos às propriedades dos TP devido à possibilidade de emprego como carreadores de drogas aos pulmões. Efeitos relativos às concentrações dessas nanopartículas são avaliados para fins de formulações de dosagens seguras aos pacientes.

O material particulado (MP) proveniente da cana-de-açúcar já foi observado como sendo um grande vilão à saúde pulmonar (Arbex et al., 2004; Ribeiro, 2008; Lopes; Ribeiro, 2006; Ribeiro; Assunção, 2002; Gonçales, 2006). No entanto, estudos sobre o efeito desse material particulado nas propriedades físico-químicas dos alvéolos pulmonares ainda é escasso.

O estado de São Paulo detém 75% da área de plantações de cana-de-açúcar no país, sendo que no total há cerca de 5 milhões de hectares plantados (Malilay, 1999). O grande consumo interno de álcool, e o interesse cada vez maior por energia de fontes renováveis são os grandes responsáveis pela grande produção de cana-de-açúcar no Brasil.

A Lei nº 11.241/2002 apresenta, em seu artigo 2º, uma tabela para a eliminação gradativa do atual processo de colheita e estipula que apenas em 2031 a queima seja totalmente eliminada. Estima-se que hoje ainda exista pelo menos 50% de área mecanizável e apenas 10% de área cultivada em terrenos com declividade elevada, que ainda pratica a queima. A prática da queimada para esse tipo de atividade advém da necessidade da eliminação do excesso de palha que dificulta o corte, e também serve de abrigo a animais que colocam em risco os trabalhadores.

A queima da palha da cana dá origem a uma série de gases tóxicos como monóxido de carbono e benzeno (Ribeiro, 2008), assim como também, ao material particulado. Diversos estudos realizados têm verificado relação direta entre as queimadas e alguns problemas respiratórios (Ribeiro, 2008; Lopes; Ribeiro, 2006; Ribeiro; Assunção 2002; Gonçales, 2006), porém mais focados no tratamento do problema como questão social e de saúde, sendo o efeito do material particulado nos pulmões ainda não tratado com aprofundamento sob o ponto de vista biofísico e físico-químico. Ainda, segundo alguns autores (Malilay, 1999; Donaldson et al., 2001), é o material particulado menor que 0,3 µm (partículas finas) que chega até os alvéolos pulmonares e mesmo em pequenas concentrações pode causar sérios danos à saúde respiratória de um

indivíduo e, portanto, são principalmente os efeitos dessas partículas finas que necessitam de um melhor entendimento.

Nessa dissertação abordamos o efeito das partículas mencionadas em sistemas modelo de biomembranas: monocamadas de Langmuir. Nesse sentido, alguns exemplos como o de nanopartículas de Sílica foram estudadas em sistemas mistos de fosfolipídios (Guzmán et al., 2012a; Guzmán et al., 2012b) mostraram se incorporar nas monocamadas, sendo possível até mesmo a transferência para substratos sólidos. Experimentos de reologia mostraram que sistemas contendo as nanopartículas apresentam uma menor correlação entre as deformações aplicadas e as respostas observadas, o que indica um pior desempenho na reorganização da monocamada em presença das partículas. Estudos com nanopartículas de Ouro (Tatur; Badia, 2012) e Poliorganosiloxanos (Harishchandra; Saleem; Galla, 2010) mostraram a tendência dessas partículas se alocarem em regiões periféricas aos domínios formados por DPPC em monocamadas de Langmuir, o que induz a uma modificação nos formatos desses domínios. A mesma observação, no caso das nanopartículas de Ouro, não foi feita para sistemas de tensoativos pulmonares comerciais, onde as partículas se localizam em regiões exteriores aos domínios de lipídios. Por fim, um estudo de revisão (Schulz; Olubummo; Binder, 2012) faz um apanhado amplo no que concerne a interação entre diversos tipos de partículas (metálicas, poliméricas, inorgânicas) como sistemas lipídicos e poliméricos, dando ênfase ao fato de que as modificações estruturais e físicoquímicas ocorrem em função da carga, composição e tamanho das partículas em questão.

1.4. Objetivos

Este trabalho tem o intuito de empregar tanto monocamadas líquidas como filmes LB para a determinação de algumas propriedades físico-químicas, além de uma análise morfológica de sistemas modelos de Tensoativos Pulmonares (TP) frente à influência provida pelo Material Particulado (MP) proveniente da queima da palha da cana-de-açúcar. A influência do componente Colesterol (Col) também é avaliada e associada ao MP.

Capítulo 2: Fundamentos dos Métodos Experimentais

2.1. Monocamadas de Langmuir e Isotermas π -A

Camadas monomoleculares de substâncias tensoativas insolúveis podem ser estudadas usando uma técnica introduzida por Irving Langmuir (Langmuir, 1917). Neste caso, a substância de interesse, solubilizada em solvente apropriado que apresente baixa solubilidade em água e evapore com facilidade, é distribuída com o auxílio de uma microseringa sobre a superfície de uma subfase aquosa ou água pura, contida em uma cuba feita de material hidrofóbico, usualmente teflon[®]. Essa substância quando em quantidades convenientes, forma uma camada com a espessura de uma molécula, uma monocamada, caso o seu espalhamento na interface seja favorável. Essa monocamada é comprimida por meio de barreira(s) móvel(is) e a pressão superfícial é monitorada em função da posição ocupada pela barreira, que modifica a área disponível por molécula na interface ar/líquido. Esta montagem é usualmente denominada cuba de Langmuir. A Figura 3 apresenta um esquema dessa montagem, mostrando como a pressão superficial pode ser

interpretada em termos de uma força por unidade de comprimento agindo na interface. Este foi conceito empregado no equipamento introduzido por Langmuir, que era dotado de duas barreiras: uma que comprimia a monocamada e outra flutuante ligada a uma balança de torção que media a força exercida pela monocamada. Os equipamentos atuais empregam de uma maneira geral a medida direta da tensão superficial, $\gamma(\mathbf{x})$, pelo método de lâmina de Wilhelmy, sendo \mathbf{x} a posição da barreira que comprime a monocamada.

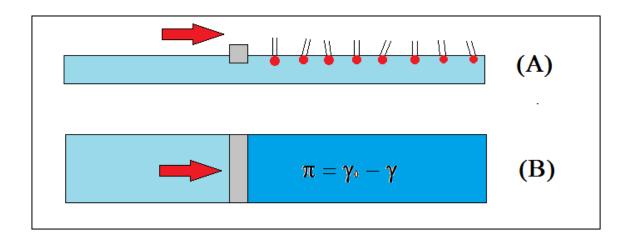


Figura 3. Esquema de uma cuba de Langmuir: (A) vista lateral representando a monocamada sendo comprimida e (B) vista de topo mostrando como a pressão superficial (π) corresponderia a uma força por unidade de comprimento com a qual a interface contendo a monocamada tenta se expandir em relação à interface limpa sem a monocamada. As setas indicam a direção da compressão.

À medida que se aumenta a compressão da monocamada, diminuindo a área ocupada por molécula (A) na interface, a pressão superficial aumenta, havendo uma tendência de ordenamento das moléculas, e consequentemente um empacotamento que é característico para cada diferente molécula. Essa diferença no comportamento do empacotamento das moléculas de um

tensoativo com o aumento da pressão, a uma temperatura constante, resulta em uma curva denominada de isoterma superficial ou, simplesmente, curva π -A.

2.2. Reologia de Monocamadas

Apesar de o pulmão apresentar distintas funções, o seu papel principal é permitir as trocas gasosas entre o ar inalado e o sangue. Para que esse processo de troca gasosa ocorra satisfatoriamente há necessidade de membranas finas com elevada área superficial e com características mecânicas adequadas, como é o caso daquelas dos alvéolos pulmonares. O comportamento pulmonar pode ser estudado sob o ponto de vista bio-mecânico usando-se modelos viscoelásticos (Savi; Pacheco, 1999). De uma maneira bastante simplificada, pode-se entender a viscoelasticidade pela análise dos comportamentos extremos: elástico e viscoso. Ao se aplicar uma deformação a um sistema, diferentes respostas podem ser obtidas: se o sistema retornar à sua conformação original, ele é considerado um sistema perfeitamente elástico e é tratado como um sólido; o sistema, pode também responder de forma que haja um escoamento do material e a conformação final não seja a mesma conformação que inicialmente era observada. Esse comportamento é denominado viscoso e esse sistema é tratado como líquido. Finalmente, há a possibilidade de ser observado um comportamento híbrido (tanto elástico como viscoso), e esse comportamento é denominado viscoelástico. O sistema, no caso tem tendência de retornar à conformação inicial após a deformação, no entanto, o sistema é modificado através do escoamento parcial do material. No caso da presente proposta de estudo, as medidas de viscoelasticidade dilatacional dinâmica de superfície (Lucassen; van den Tempel, 1972; Ivanov et

al., 2005) serão a principal ferramenta para o entendimento do comportamento do sistema modelo do alvéolo pulmonar frente ao material particulado ao qual estará em contato.

As medidas de viscoelasticidade foram realizadas usando-se a técnica de oscilação harmônica da gota pendente. O esquema desse equipamento é mostrado na Figura 4.

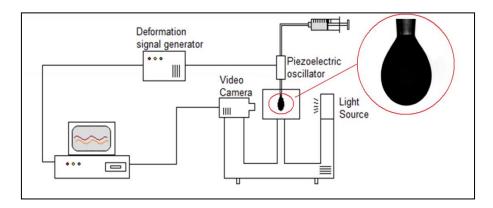


Figura 4. Esquema do tensiômetro utilizado para as medidas de viscoelasticidade.

A tensão superficial em um equipamento desse tipo é determinada pelo método do formato da gota pendente. A tensão superficial é calculada tendo em vista a equação de Young-Laplace. Considera-se que sobre uma gota pendente em um campo gravitacional agem as forças peso, empuxo e tensão superficial e levando-se em consideração que existe uma diferença de pressão através de uma interface curva líquida, chamada de pressão capilar, dada por:

$$\Delta P = \gamma (1/R_1 + 1/R_2),$$

sendo R_1 e R_2 os dois raios principais de curvatura da gota elongada. Essa gota apresenta um eixo de simetria e a primeira equação descrevendo o formato de uma gota centro-simétrica foi apresentada por Bashforth e Adams em 1883, observando que cada ponto da interface deve estar em equilíbrio mecânico, ou seja, a pressão capilar deve ser contrabalanceada pela pressão

hidrostática (Figura 5). Este é o fundamento do método de determinação de tensão superficial pelo método da gota pendente. Na prática, o equipamento digitaliza a imagem da gota e obtém os parâmetros geométricos necessários. Em seguida usa um algoritmo que permite o cálculo de γ associado ao formato de gota (Figura 5).

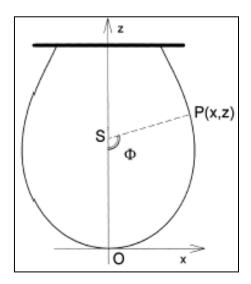


Figura 5. Esquema de uma gota pendente centro-simétrica e os parâmetros utilizados na determinação da tensão superficial γ (Ravera, Ferrari e Liggieri 2000).

A equação de Bashforth e Adams usada na determinação da tensão superficial pelo método do formato da gota é:

$$2 + \frac{\beta z}{b} = \left[\frac{1}{R^*/b} + \frac{\operatorname{sen} \phi}{x/b} \right]$$

na qual: R^* é o raio de curvatura da seção meridiana, no ponto P(x,z); ϕ é o ângulo entre a normal à superfície em P(x,z) e o eixo vertical; b é o raio de curvatura no ápice da gota (O) e β é o fator de forma, definido por:

$$\beta = \frac{\Delta \rho g b^2}{\gamma}$$

onde $\Delta \rho$ é a diferença de densidade entre o líquido e o ar e g é a aceleração da gravidade.

As medidas de viscoelasticidade, por sua vez, consistem na aplicação de uma deformação, por meio de um oscilador piezelétrico, no volume de uma gota pendente e suportada na ponta de uma agulha. Imagens da gota são obtidas em intervalos tempo definidos e digitalizadas. Estas imagens permitem que a variação da tensão superficial seja acompanhada durante todo o processo, e constituem a resposta ao distúrbio à interface provocado pela deformação. A tomada das medidas é sincronizada e assim, a diferença entre a oscilação aplicada à gota e a oscilação observada através da variação da tensão superficial servem de base para a obtenção dos parâmetros viscoelásticos do sistema (Kovalchuk et al., 2005).

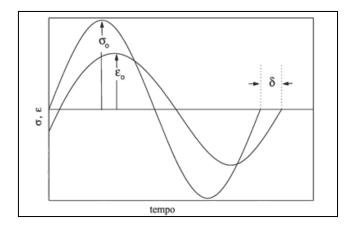


Figura 6. Representação das oscilações aplicada e de resposta de um sistema, e as indicações das respectivas diferenças.

A elasticidade dilatacional de superfície, também chamada de elasticidade de superfície ou módulo de elasticidade de superfície, E, é definido como:

$$E = \frac{d\gamma}{d \ln A}$$

onde d γ corresponde ao gradiente infinitesimal de tensão superficial frente a uma variação relativa de área (A). O valor de equilíbrio é o módulo de Young e é identificado com elasticidade de Gibbs, também chamado de módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) para monocamadas de Langmuir. Em condições dinâmicas, há filmes desde perfeitamente viscosos até perfeitamente elásticos, sendo que o último caso ocorre em condições em que nenhum processo de relaxação é observado na escala de tempo do experimento. Observando a figura 6, isso significa que não há diferença de fase (δ), também descrito como ângulo de fase (θ), entre a perturbação e a resposta do sistema (mudança da tensão superficial). Por outro lado, diferenças de fase são característicos de comportamentos viscoelásticos. Essa característica é levada em consideração introduzindo-se o seguinte módulo complexo:

$$E = |E| \cos \theta + i |E| \sin \theta$$

A parte imaginária é a quantidade que equivale ao processo de dissipação de energia e é relacionada com a viscosidade dilatacional (η_{σ}):

$$\eta_{\sigma} = (|E| \operatorname{sen} \theta)/\omega$$

na qual, a frequência angular, $\omega=2\pi f$, é estabelecida quando uma deformação senoidal de frequência f é imposta à superfície.

Dessa forma, as duas contribuições (elástica e viscosa) poderão ser entendidas e analisadas durante o trabalho com base nos valores de módulo de elasticidade (E), para a contribuição elástica, e o ângulo de fase (θ), para a contribuição viscosa.

2.3. Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

As monocamadas de Langmuir podem ser analisadas por diferentes técnicas micrográficas, espectroscópicas, etc quando convenientemente transferidas para suportes adequados. Mica foi escolhida para esse trabalho pela baixa rugosidade de sua superfície quando recém clivada e pela afinidade com as moléculas de interesse. Existem duas técnicas que permitem a transferência de monocamadas formadas na interface líquido/ar para substratos sólidos: de Langmuir-Blodgett (LB) e de Langmuir-Schaefer (LS), como mostrado na Figura 7.

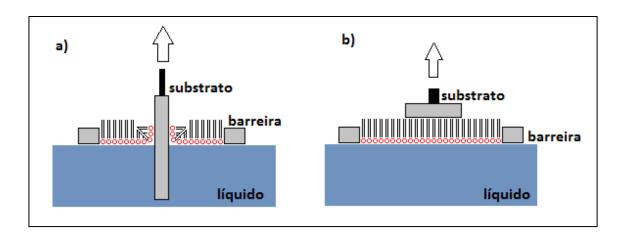


Figura 7. Esquema das técnicas LB (a) e LS (b), mostrando a subfase aquosa, as barreiras móveis da cuba de Langmuir comprimindo um filme monomolecular na interface ar-água e o suporte sólido (Rubinger et al., 2006).

A técnica LB permite a deposição de filmes camada por camada, sendo que cada camada tem a espessura de uma única molécula. Nesta técnica, há a transferência de um filme da interface ar-água para um suporte sólido através da imersão e/ou retirada deste, verticalmente, da subfase. Nos experimentos aqui descritos o suporte foi inicialmente imerso na subfase suporte da

monocamada e a transferência se deu pela retirada vertical do mesmo. Nesse caso, a cauda hidrofóbica dos fosfolipídios fica exposta.

Para ser quantitativamente transferida, a monocamada deve estar submetida a uma pressão de superfície constante durante o processo de deposição.

2.4. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Partículas dispersas em um meio líquido movem-se ao acaso (movimento Browniano). Partículas menores movem-se mais rapidamente que partículas grandes, e portanto possuem coeficiente de difusão (D) maior. Para uma dispersão de partículas esféricas, com viscosidade η, sob temperatura constante T, o coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico d_h das partículas, como mostra a equação de StokesEinstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h}$$

onde k é a constante de Boltzmann. Devido ao movimento Browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo. Supondo que haja uma janela de dimensão reduzida, através da qual a luz espalhada pelas partículas alcança um detector, a intensidade da luz que atinge o detector irá flutuar devido ao movimento das partículas. Esta flutuação da intensidade de luz espalhada ocorrerá com maior velocidade quando a dispersão contiver partículas pequenas, pois estas se movimentam mais rapidamente e passam diante da janela um número maior de vezes dentro de um intervalo de tempo. Portanto, existe uma relação entre a velocidade de flutuação da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas. Existe

também uma função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada. No caso de partículas pequenas, essa função de auto-correlação entre as intensidades diminui mais rapidamente com o tempo, do que no caso de partículas grandes. A função de autocorrelação, G(t), é:

$$G(t) = \langle I(t_0) \times I(t_0 + t) \rangle$$

onde $I(t_0)$ e $I(t_0+t)$ são as intensidades de luz espalhada nos instantes t_0 e (t_0+t) , respectivamente. No tempo $t=t_0=0$, a intensidade de espalhamento é I(0) e a função de auto-correlação possui um valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de espalhamento em um tempo (t_0+t) terá cada vez menos correlação com a intensidade de espalhamento inicial, e a média sobre os produtos das intensidades, que é G(t), tende a zero. Normalmente admitese que G(t) decai exponencialmente em função do tempo. Para partículas esféricas e monodispersas, G(t) é expresso por:

$$G(t) = Ae^{-2\Gamma t} + B$$

onde A e B são constantes, e Γ é a constante de decaimento da curva exponencial gerada pela função de auto-correlação. Por sua vez, Γ é dada por:

$$\Gamma = Da^2$$

onde D é o coeficiente de difusão das partículas e q é o vetor de onda da luz espalhada, que é dado por:

$$q = (4\pi n/\lambda_0) \operatorname{sen}(\theta/2)$$

onde n é o índice de refração do líquido que dispersa as partículas, θ é o ângulo de detecção da luz espalhada e λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente. Os aparelhos utilizados para medir tamanho de partículas são dotados de um software que encontra a curva que melhor se ajusta aos pontos gerados pela função de autocorrelação, ou seja, encontra um valor apropriado

para Γ. Ao substituir Γ é encontrado um valor para D. Finalmente, substituindo D encontra-se o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas.

O coeficiente de difusão translacional dependerá não apenas do tamanho e forma da partícula, mas também de qualquer estrutura superficial, assim como a concentração e o tipo de íons no meio. Isso significa que o tamanho pode ser maior que o medido por microscopia eletrônica, por exemplo, onde a partícula é removida do seu meio.

O desenvolvimento de uma carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons nas regiões periféricas à superfície, resultando em uma concentração maior de contra-íons (íons de carga oposta à da partícula) próximos à superfície. Portanto, uma dupla camada existe ao redor de cada partícula. A camada líquida ao redor da partícula pode ser dividida em duas componentes: uma região interior, chamada de camada de Stern, onde os íons estão fortemente atraídos; e uma exterior, difusa, região onde esses íons são menos atraídos. Na camada difusa há uma fronteira na qual os íons e partículas formam uma entidade estável. Quando uma partícula se move, os íons no interior da fronteira se movem junto, enquanto os íons além da fronteira não. Essa fronteira é conhecida como plano de deslizamento (do inglês, slipping plane) e o potencial associado a essa fronteira é conhecido com o potencial Zeta (ζ). O esquema da figura 8 ilustra os termos utilizados acima.

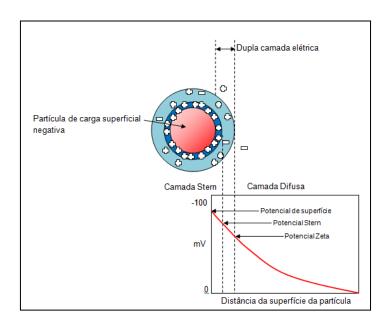


Figura 8. Indicação das camadas iônicas ao redor de uma partícula e os potenciais a elas associadas.

Quando um campo elétrico é aplicado através de um eletrólito, partículas carregadas em suspensão no eletrólito são atraídas na direção do eletrodo de carga oposta. Forças viscosas agindo sobre as partículas tendem a oporem-se ao movimento. Quando o equilíbrio é atingido entre essas duas forças opostas, as partículas se movem a uma velocidade constante. A velocidade da partícula é dependente dos seguintes fatores: força do campo elétrico ou gradiente de voltagem; a constante dielétrica do meio; a viscosidade do meio; e do potencial Zeta. A velocidade de uma partícula em um campo elétrico é comumente associada a sua mobilidade eletroforética. Portanto, pode-se obter o potencial Zeta de uma partícula aplicando-se a equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\epsilon \zeta f(ka)}{3\eta}$$

onde ζ é o potencial Zeta, U_E é a mobilidade eletroforética, ϵ é a constante dielétrica do meio e f(ka) é a função de Henry. Dois valores são geralmente

utilizados como aproximação para a determinação de f(ka): 1,5 ou 1,0. No caso de meio aquoso em concentrações moderadas de eletrólitos, como o desse trabalho, o valor utilizado é de 1,5, segundo a aproximação de Smoluchowski, que diz que esse valor é aplicável para a análise de partículas maiores que 0,2 mícrons em concentrações salinas maiores que 10^{-3} mol.L⁻¹.

2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV consiste em utilizar um feixe fino de elétrons para explorar a superfície de uma amostra ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura deve estar em perfeita sincronia com o feixe incidente. A interação desse feixe de elétrons com os átomos da amostra dá origem a uma série fenômenos, dentre eles, os elétrons secundários e os retroespalhados (mais importantes na obtenção das imagens de MEV). O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação.

A técnica de EDS (do Inglês *Energy Dispersive X-ray Spectrometer*) se vale do posicionamento do feixe de elétrons do microscópio sobre uma amostra, os elétrons mais externos são excitados e mudam de nível energético. Ao retornar ao estado fundamental, a energia excedente é liberada na forma de radiação na faixa dos Raios-X. Como cada átomo possui níveis de energia característicos, a energia dos Raios-X detectados podem ser associados à presença desses átomos na amostra.

2.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A técnica de AFM é utilizada para a obtenção de informações topográficas do que se está sendo analisado. Imagens são formadas a partir da varredura da amostra, linha por linha, com uma ponta muito fina que interage de diferentes formas com os átomos da amostra. No modo contato, o que se mede é a interação repulsiva entre a ponta e os elétrons da amostra. No modo não-contato, a interação medida é a atrativa, uma vez que a ponta não chega a tocar a amostra.

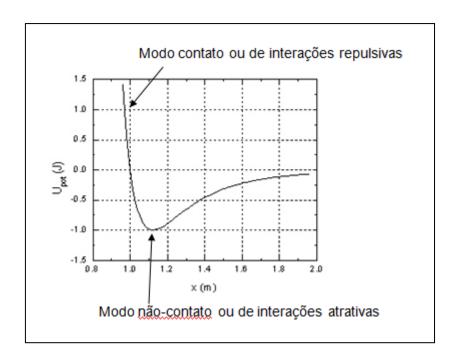


Figura 9. Diagrama de energia potencial entre dois átomos ou duas superfícies, mostrando os pontos onde os modos de análise de AFM estão situados.

Há ainda o modo intermitente que é um híbrido dos dois modos anteriores. Para todos os casos, a detecção topográfica da amostra é realizada através de um feixe de laser que incide sobre a haste que liga a ponta ao microscópio. Dessa forma, as variações de relevo que são observadas durante

a varredura são detectadas pela variação na posição do laser no detector. As imagens são baseadas na altura de cada ponto da amostra.

2.7. Espectroscopia de Absorção na Região do InfraVermelho

A radiação eletromagnética interage com a matéria de diversas maneiras dependendo de vários fatores, por exemplo, o comprimento de onda. A região do espectro que compreende as radiações conhecidas como Infravermelho é responsável pela interação com os modos vibracionais das moléculas. Como os modos de vibração possuem energias definidas na região do Infravermelho, a interação da radiação eletromagnética com a amostra é facilmente detectável através de uma varredura nessa região, resultando em um espectro de absorção onde é possível identificar moléculas ou grupos funcionais presentes na amostra em análise.

2.8. Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência

A resolução de um microscópio depende do comprimento de onda da radiação que está sendo utilizada para iluminar o espécime. Assim, a resolução de um microscópio ótico, que utiliza luz visível nunca pode ser maior que aproximadamente 0,3 μm ou 300 nm. Quando diminuímos o comprimento da radiação aumentamos a resolução, isto é conseguimos distinguir tamanhos menores. Na microscopia de fluorescência emprega-se luz na região do ultravioleta para iluminar a amostra. Como o comprimento de onda é menor, consegue-se uma resolução maior. Nesta técnica empregam-se sondas luminescentes, que consistem em moléculas com capacidade de absorverem radiação na faixa do ultravioleta, passando de um estado energético

fundamental para um estado excitado para em seguida emitir radiação na região visível do espectro eletromagnético. No caso da microscopia de fluorescência essas substâncias são escolhidas de forma a permanecerem na interface e interagirem de forma diferenciada com os diferentes estados superficiais presentes na superfície em equilíbrio.

Cada molécula fluorescente possui um tempo de vida característico, seja ele dependente do grupo cromóforo presente ou pelo ambiente químico em que ele se encontra (ou seja, a sua vizinhança). Esse fenômeno faz com que quando excitadas, essas tenham tempos de relaxação diferentes, ou seja, emitam luz por períodos de tempo diferentes. É o que se conhece por tempo de vida. A técnica que se utiliza da capacidade de produzir imagens a partir dos diferentes tempos de vida das moléculas é conhecida como Microscopia de Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM, do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Essa técnica, apesar de relativamente recente, já foi utilizada para o estudo de monocamadas de lipídios anteriormente (Stockl e Herrmann 2010). Assim como na microscopia de fluorescência convencional, essa técnica, quando aplicada ao estudo de monocamadas de lipídios, utiliza moléculas marcadoras, ou sondas fluorescentes. Essas moléculas são, na maior parte, muito parecidas com os lipídios em análise com apenas a substituição de um determinado grupamento por um grupamento cromóforo.

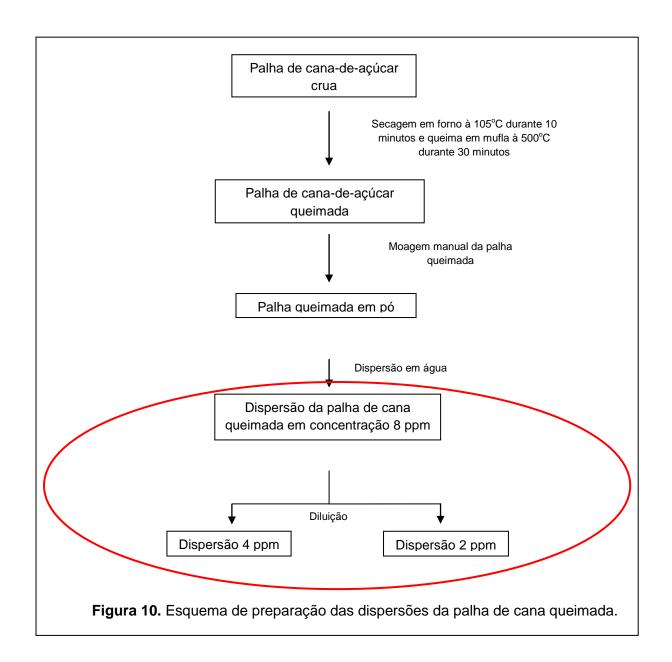
As sondas fluorescentes mais comuns empregadas para verificar diferenças de morfologia de monocamadas são as baseadas no cromóforo [7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il] (NBD), que é ligado a um lipídeo de interesse. A proporção de moléculas de lipídeo marcado com NBD é geralmente em torno de 1% em mol do total de lipídios usados para formar a monocamada.

Nesse tipo de arranjo, é comum a marcação de mais do que um lipídeo para a verificação da distribuição dos diversos componentes em uma membrana ou monocamada.

Capítulo 3: Materiais e Métodos

3.1. Produção de Partículas e Dispersão

As dispersões da palha da cana queimada foram preparadas seguindo o procedimento descrito no esquema abaixo:



Como mostrado acima, o processo que preparação das dispersões da palha de cana queimada envolve uma série de etapas, onde primeiramente há uma lavagem da palha crua e secagem em forno à 105°C durante 10 minutos. Em seguida, a palha seca deve ser queimada em mufla à 500°C, durante 30 minutos, para garantir a queima total da palha.

A palha queimada é então macerada com pistilo em gral até que se torne um pó bem fino. Então, 8 mg desse pó são dispersos em 1000 mL de água, a fim de se obter uma dispersão de concentração 8 ppm. Feito isso, por diluição é possível se obter as dispersões de mais baixas concentrações diluindo-se pela metade cada uma das dispersões. No entanto, as diferentes concentrações não são todas preparadas de uma só vez, devido à possibilidade de agregação das partículas dispersas em períodos de tempo longos. Por isso, cada diferente concentração é preparada no dia em que se for trabalhar com ela.

3.2. Isotermas π -A

Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Sigma-Aldrich) e Colesterol (Sigma-Aldrich) foram utilizados para a formação das monocamadas. Para a subfase, água ultra pura (Mili-Q, Milipore) foi utilizada tanto nos experimentos contendo apenas subfase de água pura quanto para o preparo das dispersões do MP. Monocamadas de DPPC e DPPC/Chol foram formadas a partir de soluções aproximadamente 1 mM em clorofórmio sobre subfases contendo apenas água ou dispersões de MP de diferentes concentrações em uma Cuba de Langmuir (*Insight, Brasil*) de 240 cm² de área. Isotermas superficiais de compressão foram obtidas a uma taxa de 42 mm² por segundo e a temperatura controlada em 36 ± 0,5°C por um banho termostático *Tecnal TE-184*.

3.3. Filmes LB

A formação dos filmes LB foram realizadas em uma Cuba de Langmuir (*Insight - Brasil*) de 240 cm² de área. A barreira foi comprimida a uma taxa de 42 mm² por segundo e o substrato era movimentado a uma taxa de 0,031 cm por segundo. A temperatura foi controlada em 36 + 0,5°C por um banho termostático *Tecnal TE-184*. Folhas de mica recém-clivadas, de espessura menor que 1 mm foram utilizadas nas deposições.

Nesse trabalho, a pressão foi controlada em 30 mN m⁻¹, pressão em que a monocamada encontra-se em um regime condensado e é reconhecido por ser uma pressão que se aproxima da encontrada em membranas biológicas.

3.4 Reologia de monocamadas

OCA-20 (*Dataphysics – Alemanha*). Na ponta da agulha foram formadas gotas com volume em média de 15 µL, tanto de água pura como das dispersões. Na superfície dessa gota eram espalhadas as soluções de lipídios em clorofórmio em uma concentração de 10⁻⁴ mol.L⁻¹ até que se atingi-se a pressão de interesse. As oscilações foram conduzidas em frequências que variaram desde 0,15 até 0,45 Hz. 500 imagens foram capturadas para um total de 5 ciclos de oscilação da gota, em cada frequência. As imagens foram analisadas pelo software e depois de uma transformada de Fourier, obteve-se os dados de viscoelasticidade do sistema.

3.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As medidas de tamanho e carga de partículas foram realizadas em um Zetasizer 3000 – DTS 5300 (*Malvern - Inglaterra*), laser de 10 mW e lâmpada de HeNe (633nm). As dispersões mais concentradas do MP (8 ppm) foram utilizadas para garantir uma razão sinal/ruído adequado das medidas.

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Imagens e composição elementar das partículas foram obtidas por meio de MEV, utilizando um Microscópio EVO 50 (Zeiss, Alemanha) equipado com o acessório EDS (do Inglês *Energy Dispersive X-ray Spectrometer*).

Para a análise das partículas, cerca de 1 mL da dispersão de MP mais concentrada (8 ppm) foi espalhada sobre a superfície de uma lâmina de vidro e mantida à temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos até completa evaporação da água. As partículas remanescentes foram, então, analisadas. No caso da obtenção de imagens, além do procedimento descrito acima, foi feito o recobrimento do MP com uma fina camada de ouro (cerca de 5-10 nm).

3.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Experimentos de Microscopia de Força Atômica, AFM (do Inglês *Atomic Force Microscopy*) foram utilizados para investigar a morfologia e as diferenças no empacotamento das monocamadas de lipídios provocadas pela presença de MP. Monocamadas de DPPC, DPPC/col e DPPC/col/MP foram transferidas para substratos de mica por meio da técnica de formação de filmes Langmuir-Blodgett, produzindo filmes com a espessura de uma molécula com a parte apolar voltada para fora. A deposição foi conduzida a uma pressão superficial constante de 30 mN m⁻¹ a 36±0,5°C. Os filmes foram analisados a temperatura

ambiente utilizando o modo intermitente do microscópio SPM9600 (*Shimadzu, Japão*). O modo não-contato foi testado, porém resultou em imagens de pior qualidade do que as obtidas pelo modo intermitente.

3.8. Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)

. As micrografias foram obtidas através de um sistema acoplado de microscópio confocal Olympus IX71 e um dispositivo de Fluorescência Resolvida no Tempo PicoQuant Microtime 200. O sistema utiliza-se de um laser de diodo pulsado com comprimento de onda de excitação de 470 nm, além de um filtro BLP01-488R que barra acima de 470 nm e tem uma abertura óptica de 28,0 mm. A detecção mínima de tempo de vida é de 70 ps.

Para a obtenção das imagens, filmes LB foram formados na superfície de placas de mica recém-clivadas em uma pressão de 30 mN m⁻¹ e temperatura de 36±0,5°C. Utilizou-se tanto DPPC quanto colesterol marcados com 1%, em mol, de moléculas que continham NBD. 1-palmitoil-2-{12[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil}-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC-NBD) no caso do DPPC e 25-{n-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)-metil]amino}-27-norcolesterol (Col-NBD) no caso do colesterol, ambos obtidos do fabricante *Avanti Polar Lipids*. O MP não apresentou fluorescência na região de excitação e também nenhuma sonda fluorescente foi utilizada como marcador.

3.9. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Com o objetivo de se detectar possíveis grupos orgânicos presentes no MP utilizado, espectros na região do infravermelho foram obtidos por FTIR (do Inglês Fourier Transformed Infrared Spectroscopy) usando um

espectrofotômetro Bomem MB-102, empregando o modo de transmissão. O MP foi previamente macerado, diluído e misturado com KBr na proporção de 1:100. O pó finamente dividido foi posteriormente prensado mecanicamente e pastilhas desse material foram formadas e analisadas.

Capítulo 4: Resultados e Discussão

4.1. Análise das Partículas

4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MP obtido em laboratório e utilizado no presente trabalho, ou mesmo aquele obtido da queima de biomassa na natureza, pode não consistir apenas de carvão, mas também de material orgânico oxidado juntamente com compostos inorgânicos. Como é de interesse o entendimento do MP nos sistemas biomiméticos de membranas, é relevante entender sua natureza. Além da natureza química, a distribuição de tamanho das partículas também se faz importante. Como mencionado na introdução, MP com tamanho de partículas menores que 250 nm é conhecido como um agente prejudicial à saúde (Li et al., 2010), justificando o estudo com esse tamanho de partículas. Além disso, o formato que melhor descreve as partículas são pequenos paralelepípedos (Figura 11).

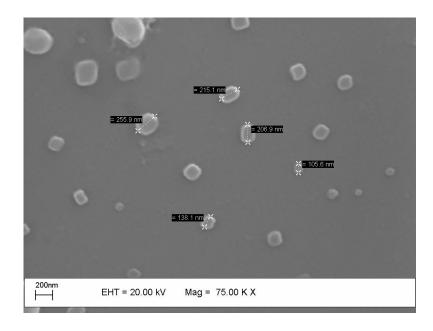


Figura 11. Imagem de MEV para as partículas espalhadas sobre uma lâmina de vidro.

De fato, é de conhecimento que alguns compostos inorgânicos (Malilay, 1999), assim como orgânicos (Nikula et al., 2001; Nieman et al., 1980; Pisula et al., 2005) são encontrados no material particulado atmosférico proveniente da queima da biomassa (Maioli; Knoppers; Azevedo, 2009) e o material que permanece no solo apresenta uma natureza de aromáticos poliméricos (Vasconcellos et al., 2010). No presente estudo, não foi utilizada a fumaça, mas sim o material residual obtido da queima das folhas de cana-de-açúcar. Os resultados de análise elementar por EDS em imagens de MEV são apresentados na Tabela 1. A grande quantidade de oxigênio deve ser proveniente dos compostos orgânicos, assim como da presença de silicatos e carbonatos, produzidos durante a combustão do carbono ou material inorgânico; magnésio, silício, fósforo, enxofre, cloro, potássio e cálcio são elementos que também estão presentes, apesar de que, em menor quantidade. A grande quantidade de carbono é compatível com a produção de carbono

elementar e também da queima incompleta de alguns compostos inorgânicos, uma vez que álcoois, cetonas, ftalatos e alguns sacarídeos como levoglicosanas foram encontrados na fumaça produzida pela queima de palha de cana-de-açúcar (Nikula et al., 2001; Nieman et al., 1980; Pisula et al., 2005).

Tabela 1. Análise química elementar do MP obtido da queima da palha da cana-de-açúcar como obtido por EDS

Elementos	С	0	K	Si	Ca	Mg	CI	S	Р
Proporção									
(% em massa)	70.415	24.744	1.685	1.245	0.804	0.627	0.296	0.132	0.051

4.2.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Alguns parâmetros foram obtidos a partir das dispersões das partículas em água, a fim de se inferir sobre a aplicabilidade do MP nos experimentos. Como já exposto, apenas partículas menores que 0,3 µm conseguem atingir as vias mais profundas do sistema respiratório, inclusive os alvéolos (Malilay, 1999; Donaldson et al., 2001). Dessa forma, há necessidade da confirmação que as partículas que estão sendo utilizadas nos experimentos cumpram esse requisito. Para isso, foram realizados experimentos de espalhamento de luz dinâmico.

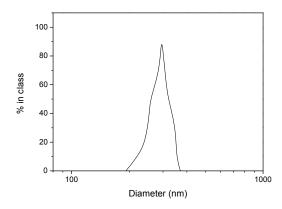


Figura 12. Gráfico da distribuição de tamanhos das partículas. O valor médio é de cerca de 250 nm.

O gráfico da Figura 12 mostra uma distribuição de partículas com um valor médio muito próximo àquele pretendido. Além disso, observa-se uma distribuição relativamente monodispersa, com diâmetro médio de (250±70 nm). Isso valida a utilização dessas partículas como sendo as que realmente atingiriam as vias respiratórias mais profundas em um ser humano.

Além da análise do tamanho de partículas, foram realizadas medidas de potencial zeta, que possibilitará uma análise da contribuição de interações eletrostáticas nos sistemas envolvendo partículas e monocamadas lipídicas.

O valor médio obtido para o potencial zeta das partículas foi ligeiramente negativo (-27,7±2,4 mV), o que poderá nos levar a algumas considerações mais adiante. Novamente, a distribuição obtida foi bastante estreita, evidenciando a baixa polidispersidade do sistema, que apresentou a grande maioria das partículas com valor para o potencial zeta muito próximo ao valor médio.

Ainda considerando características das dispersões dos MP, a análise de pH também foi realizada. É essencial que o sistema esteja em condições bastante parecidas com as que se encontraria no sistema real, ou seja, o corpo humano. Parte importante dessas condições é o pH fisiológico (cerca de 7,4). As medidas realizadas com as partículas na concentração mais elevada a ser utilizada nos estudos sobre o efeito do MP nos sistemas modelos de membranas mostrou um valor de 7,2. Valor considerável aceitável, uma vez que a diferença de 0,2 unidades de pH não traria nenhuma modificação significativa no estado de ionização de qualquer molécula que está sendo utilizada nos trabalhos.

4.2.3. Espectroscopia na Região do Infra-Vermelho

O espectro de infravermelho (Figura 13) é caracterizado pela presença de bandas centradas em: 3430 cm⁻¹ com ombro em ~3050 cm⁻¹, 1610 cm⁻¹, 1430 cm⁻¹, 1080 cm⁻¹, 870 cm⁻¹, 800 cm⁻¹, 610 cm⁻¹ e 450 cm⁻¹.

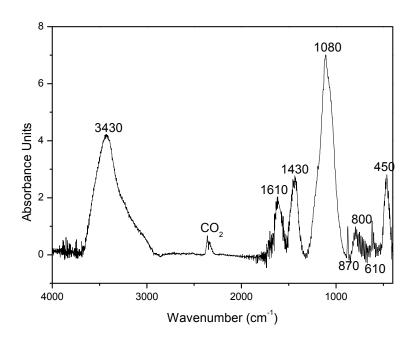


Figura 13. Espectro de absorbância das partículas na região do Infravermelho.

Tabela 2. Bandas de absorção observadas e as estruturas correspondentes de acordo com as referências (Andrade et al., 2010; Hamelmann et al., 2005; Lepesant; Powers; Pershan, 1978; Li et al., 2001)

Número de Onda / cm-1	Vibrações Associadas		
3430	Estiramento O-H		
1610	Estiramento C=C do anel aromático		
1430	Estiramento C=C do anel aromático		
1080	Estiramento Si-O-Si / Estiramento C-O		
870 -800	Deformação Si-O no plano		
610	Estiramento Si-Si		
450	Deformação Si-O fora do plano		

A amostra de MP parece consistir principalmente de silicatos (1080, 870-800, 610 e 450 cm-1, ver Tabela 2) e estruturas aromáticas, que são evidenciadas pela presença dos picos em 1610 e 1430 cm⁻¹. Esses últimos são muito comumente encontrados em queimas de biomassa, como previamente descrito na literatura, e são conhecidos como Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (Vasconcellos et al., 2010; Andrade et al., 2010; Hamelmann et al., 2005; Lepesant; Powers; Pershan, 1978; Li et al., 2001). Por causa de suas estruturas químicas, a maioria dos HAPs tem uma conformação planar e são propensos a produzir estruturas lamelares. Isto pode explicar a pequena altura das partículas comparada com as suas dimensões laterais, conforme detectada nas micrografias de AFM (item 4.2.1.). Estruturas de Silício

foram determinadas pela presença de bandas em 1080, 800, 610 e 450 cm⁻¹. Como mostrado na Tabela 1, Silício, presente em uma quantidade significativa e atribuído a silicatos, também são descritos (Posfai et al., 2003) como compondo material particulado oriundo da queima de biomassa.

A partir desses resultados, o pequeno potencial-Zeta dessas partículas, em torno de -25 mV (reportado no relatório prévio), pode ser devido principalmente aos silicatos presentes na superfície das partículas, embora não possa se descartar a possibilidade da presença de pequenas quantidades de outras espécies iônicas orgânicas e inorgânicas, como carboxilatos e cloretos.

4.3. Estudo do Comportamento das Monocamadas

4.3.1. Isotermas π -A

Inicialmente foi feito um estudo do efeito da temperatura sobre as curvas π -A. A Figura 14 apresenta o comportamento das isotermas superficiais de DPPC em função da temperatura. Verifica-se que na temperatura corpórea DPPC encontra-se em uma região muito próxima a extinção da região de coexistência de fases, ou seja, encontra-se muito próximo da temperatura de transição do lipídio.

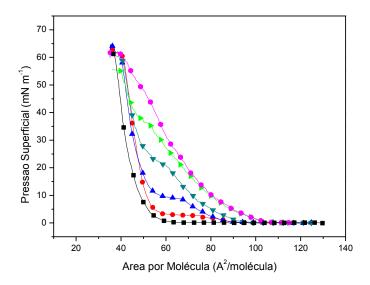


Figura 14. Comportamento de monocamadas de DPPC para diferentes temperaturas:

O estudo com o material particulado foi feito a 36 °C e a Figura 15 apresenta as isotermas de DPPC na ausência e na presença do MP.

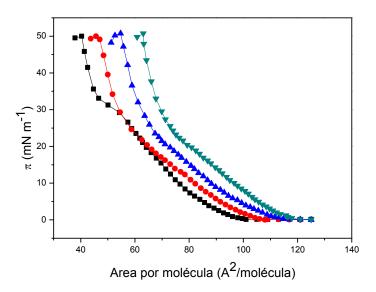


Figura 15. Isotermas de monocamadas de DPPC, obtidas a $36 \pm 0.5^{\circ}$ C, contendo

diferentes [MP]: ■ 0; ● 2; ▲ 4 e ▼ 8 ppm.

As isotermas obtidas com as monocamadas de DPPC (Figura 15) mostram que as partículas causam um deslocamento da área mínima por molécula para valores mais altos, indicando assim um espaçamento promovido pelas partículas através da inserção na monocamada. É possível observar, também, que quanto maior a [MP] maior é a área em que a pressão começa a subir e assim persiste até o colapso, não se encontrando com a curva em ausência de MP, indicando que não há exclusão do MP para dentro da subfase em regiões condensadas da monocamada. A transição de fases característica de DPPC em água, ainda observada nessa temperatura (36°C) é extinta na presença de MP. Partículas carregadas e íons são geralmente responsáveis por tal efeito (Ou-Yang et al., 2011).

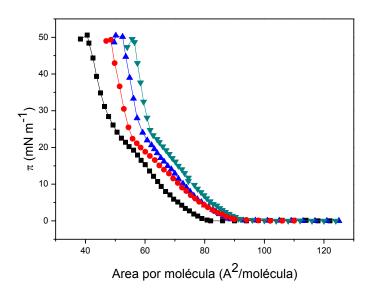


Figura 16. Isotermas de monocamadas de DPPC/colesterol (90/10 p/p), obtidas à 36 ± 0,5°C em diferentes [MP]: ■ 0; ● 2; ▲ 4 e ▼ 8 ppm.

Os sistemas contendo DPPC/colesterol (Figura 16) apresentaram um comportamento ligeiramente parecido com o sistema contendo apenas DPPC em alguns aspectos. A inserção das partículas na interface também é possível

de ser identificada pelo deslocamento das áreas mínimas por molécula. Porém, nesse caso, as áreas em que as pressões começam a ser diferentes de zero não apresentam uma tendência de crescimento, pelo contrário, são bem próximas umas das outras quando em presença de partículas. Esse fato pode ser fruto do arranjo das moléculas de lipídio, principalmente do colesterol, ao redor das partículas. Outra diferença entre os dois sistemas em estudo é a menor diferença entre as Áreas Mínimas por Molécula. Sistemas contendo o colesterol possui uma menor ocupação pelas partículas, fato já observado através das imagens de FLIM, onde as regiões não emissoras de fluorescência (regiões atribuídas as partículas) apresentavam dimensões menores e mais bem definidas.

Tabela 3. Relação das Áreas Mínimas por Molécula para os diferentes sistemas e as estimativas das áreas ocupadas pelas partículas, 36 ± 0,5 °C

[MP] (ppm)		a por molécula olécula)	Área ocupada por partículas (Ų/partículas/molécula)		
,	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)	DPPC	DPPC/Col (90/10	
	40,4	40,5		p/p)	
0	40,4	40,5	-	-	
2	46,6	48,5	6,2	8,0	
4	54,9	51,8	14,5	11,3	
8	62,6	56,2	22,2	16,2	

De posse dos dados da tabela anterior, é possível estimar um grau de ocupação das partículas nas monocamadas. Sabendo-se da quantidade de lipídio espalhada e da área final em que foram confinadas as moléculas chegase em uma porcentagem de área relativa à ocupação das partículas.

Tabela 4. Grau de ocupação das partículas nas monocamadas

	Grau de ocupação do MP nas			
[MP] (ppm)	monocamadas (%)			
	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)		
0	-	-		
2	14,9	15,5		
4	33,4	27,8		
8	48,1	36,7		

Os valores da tabela acima são passíveis de comparação com as micrografias de FLIM, mostradas mais adiante, onde é possível ter uma noção da área ocupada pelas partículas na monocamada. O sistema DPPC/colesterol propicia mostra um grau de ocupação menor para as partículas, com exceção do sistema com [MP] igual a 2 ppm em que os graus de ocupação são bastante próximos.

Nenhuma diferença significativa nas pressões de colapso foi observada.

Um indicativo que as partículas não influem na estabilidade das monocamadas com relação à pressão máxima que podem atingir, como mostra a tabela 5.

Tabela 5. Pressões de colapso para os diferentes sistemas de monocamadas, à 36 + 0,5 °C

[MP] (ppm)	Pressão de colapso (mNm ⁻¹)			
livir I (bbiii)	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)		
0	49,8	50,4		
2	49,8	49,2		
4	50,6	50,6		
8	50,8	49,4		

Os fatores de compressibilidade, C_s-1, das monocamadas foram calculados em regiões onde a monocamada se apresenta em um regime condensado (em geral de 30 a 40 mNm⁻¹), segundo a seguinte expressão:

$$C_s^{-1} = -\frac{d \, \pi}{d \, \ln A}$$

Tabela 6. Fator de Compressibilidade, C_s^{-1} , para os diferentes sistemas de monocamadas, à 36 \pm 0,5 °C

[MP] (ppm)	C _s ⁻¹ (mNm ⁻¹)			
[wii] (ppiii)	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)		
0	147,5	149,3		
2	128,5	126,1		
4	160,8	179,5		
8	235,9	305,4		

Esses valores serão úteis na comparação com os dados reológicos dos sistemas, descritos na próxima seção. Porém, deve-se observar que, na

ausência de partículas, a presença de 10 % p/p de colesterol causa uma leve expansão que é revertida com a adição de 2 ppm de MP. A partir daí, concentrações maiores de MP expandem as monocamadas. Já com relação às áreas mínimas ocupadas por molécula: não se detecta variação considerável na ausência de MP e 2 ppm causa uma leve expansão, que aumenta com o aumento da concentração de MP. Em resumo, a presença de MP causa expansão das monocamadas acima de 2 ppm e a presença de colesterol potencializa esse efeito.

4.3.2. Reologia

Primeiramente, deve-se ter em ment que o Módulo Viscoelástico pode ser divido em duas componentes: a parte real (Módulo de Elasticidade Dilatacional, E) e a parte imaginária (relacionada com a contribuição viscosa do sistema). Em todos os sistemas aqui apresentados, a contribuição viscosa sempre se mostrou muito inferior ao E, assim sendo, somente trataremos os sistemas com relação às suas propriedades elásticas e os valores aqui apresentados correspondem aos módulos de elasticidade dilatacional das monocamadas de lipídios.

Uma possível abordagem dos resultados obtidos consiste na análise das curvas com relação à concentração do MP disperso na subfase (Figura 17).

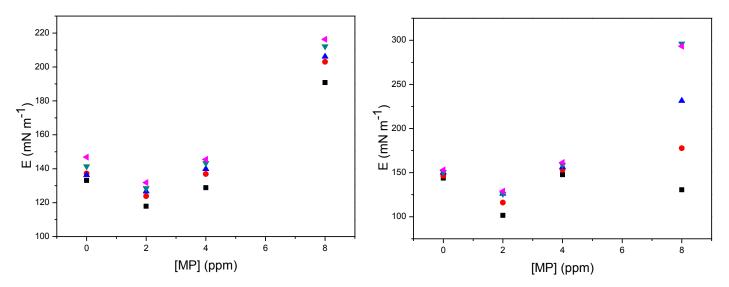


Figura 17. Comportamento de E em função de [MP] para os sistemas: (A) DPPC e (B) DPPC/colesterol. ■ 0,150 Hz; ● 0,225 Hz; ▲ 0,300 Hz; ▼ 0,375 Hz e ◀ 0,450 Hz., na pressão de 30 + 1 mN m⁻¹ e na temperatura de 36 + 0,5 °C.

A primeira observação a ser feita é o decréscimo de E em [MP] baixas (2 ppm). O fosfolipídio DPPC é zwiteriônico, mas em pH neutro tem carga ligeiramente negativa (Wiacek, 2007). O MP apresentou potencial zeta baixo, mas negativo. Esse fenômeno acredita-se ser devido à desorganização do sistema promovido pela interação entre cargas na monocamada. Cargas provenientes das partículas, assim como íons associados a essas partículas interagem com as cargas e momentos de dipolo do lipídio. Assim pode-se atribuir esse resultado a interações repulsivas entre cargas elétricas da partícula e DPPC. Acredita-se que essa interação repulsiva leve a uma desorganização da monocamada, tornando-as mais fluidas e, consequentemente, levando a valores mais baixos de E (Prachayasittikul et al., 2007). De maneira geral, para [MP] mais elevadas observa-se uma tendência de aumento nos valores de E com o aumento da concentração de partículas. Nesses casos, muito provavelmente, deva ocorrera inserção das partículas na monocamada, acarretando em uma organização dos

lipídios ao seu redor, fazendo com que a monocamada se torne mais rígida e consequentemente eleve os valores de E (Kumar; Bohidar, 2010). Esses dois efeitos são concorrentes e dependentes da [MP]. Por isso a observação de um ou outro dependendo da concentração de partículas. Essas explicações foram corrobadas pelas imagens de AFM, conforme será apresentado no item 4.2.1.

Uma segunda colocação a ser feita aqui é a diferença de comportamentos quando em ausência e presença de colesterol. Na ausência de colesterol, o efeito observado é unicamente proveniente do aumento da frequência de oscilação do sistema. Para maiores frequências de oscilação, maiores valores de E. Já no sistema contendo colesterol o mesmo efeito de aumento de E com o aumento da frequência é observado até uma [MP] de 4 ppm. Na [MP] mais alta (8 ppm) os valores de E variam bruscamente com a frequência em um padrão diferente daquele observado para menores [MP]. De uma maneira geral pode-se dizer que E seja mais sensível à variação de freqüência para a [MP] de 8ppm. Esse resultado pode ser atribuído ao complexo arranjo de partículas e colesterol na monocamada. Como sugerido anteriormente, o aumento de E deve estar associado a uma tendência de arranjo das moléculas de colesterol ao redor das partículas, o que confere uma maior organização ao sistema. À medida que se aumenta a frequência de deformação da monocamada, menor o tempo para uma resposta do sistema. Os tempos experimentais de expansão-compressão da (gota) monocamada ficaram entre 2,2 e 6,6 s. As partículas por sua vez devem apresentar um tempo de difusão característico. Se esse tempo exceder o tempo de deformação, as partículas não têm tempo de se difundir da monocamada para o interior da dispersão e vice-versa. Caso contrário ocorre apenas difusão lateral das partículas na monocamada e as partículas permanecem na interface. Assim, quanto menor o tempo para reação do sistema, menos alterado ele será, o que se entende por uma maior rigidez e consequentemente maiores valores de E. Para [MP] igual a 8 ppm, os valores de E para certas frequências, em presença de colesterol, são até mais baixos do que na ausência do colesterol. Esse fato se deve mais uma vez à organização provida pelo colesterol em conjunto com as partículas. O sistema pode não se reorganizar adequadamente em certas frequências em que o tempo é suficiente para a desorganização da monocamada, mas não para a recuperação dessa organização, e o sistema acaba por perder sua rigidez e dessa forma apresentar valores de E até mais baixos do que o próprio sistema sem colesterol. Deve-se ter em mente que o fato [MP] serem mais sensíveis a freqüência deve estar correlacionado ao aumento de processos difusivos em concentrações maiores (maiores gradientes).

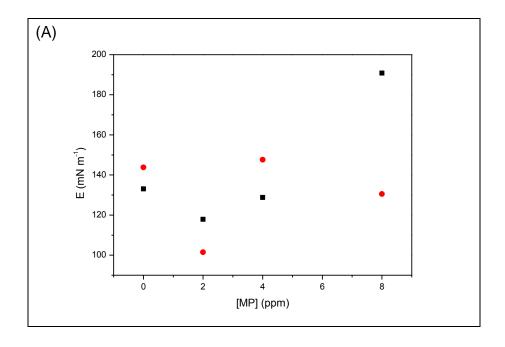
Os dados reológicos obtidos são passíveis de comparação com os dados de equilíbrio, ou seja, a comparação de E e C_s-1. Essa comparação é possível na medida em que o efeito viscoso tende a valores mais baixos, ou seja, o efeito de reorganização da monocamada não seja mais observado e essa se comporte apenas como um filme rígido. No caso do nosso estudo, as frequências mais elevadas são as mais indicadas para a comparação, para as quais os tempos de deformação são menores e o tempo característico de difusão deve superar o tempo de deformação.

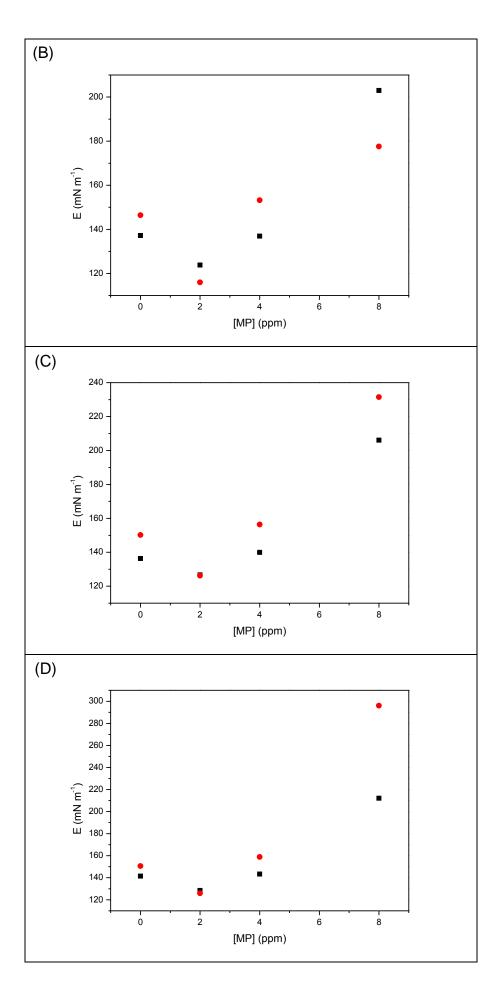
Tabela 7. Comparação de C_s^{-1} e E, para os diferentes sistemas de monocamadas, à 36 \pm 0,5 °C

[MP] (ppm)	C _s ⁻¹ (mNm ⁻¹)		E (mNm ⁻¹)		Diferença (%)	
	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)	DPPC	DPPC/Col (90/10 p/p)
0	147,5	149,3	146,3	152,6	0,8	2,2
2	128,5	126,1	132,2	128,2	2,9	1,7
4	160,8	179,5	145,8	160,5	9,3	10,6
8	235,9	305,4	216,6	292,1	8,2	4,3

Como observado, os dados apresentam uma boa correlação, com diferenças inferiores a 10% (com exceção de apenas um caso). Esses resultados são importantes para a garantia de uma análise comparativa pertinente para os demais resultados obtidos em ambas as técnicas.

Agora, uma análise mais detalhada das diferenças entre os sistemas sem e com colesterol nas diferentes frequências de trabalho (Figura 18).





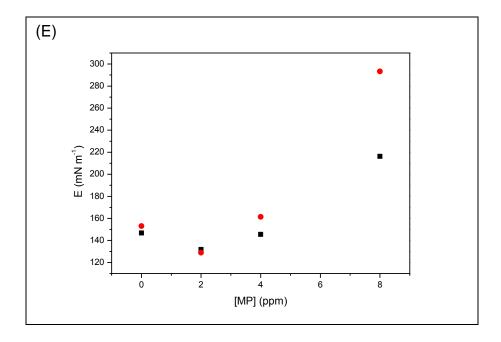


Figura 18. Comportamento de E em função de [MP] em diferentes frequências: (A) 0,150 Hz; (B) 0,225 Hz; (C) 0,300 Hz; (D) 0,375 e (E) 0,450. ■ DPPC e ● DPPC/colesterol (90/10 p/p), à 36 ± 0,5°C.

Nos gráficos da Figura 18, as variações de E dos sistemas em água pura para a primeira [MP] (2 ppm) é sempre maior nos sistemas contendo colesterol, o que indica que o efeito desestabilizador, já mencionado anteriormente, é mais pronunciado nos sistemas contendo colesterol. Fica evidente que o comportamento das monocamadas de DPPC/colesterol/MP aproxima-se do comportamento das monocamadas de DPPC puro/MP à medida que a frequência aumenta para [MP] menores que 8 ppm. Deve-se ter em mente que aumentando-se a frequência diminui-se a chance de ocorrência de efeitos difusivos. Outra observação ainda na Figura 18 é a evolução dos valores de E em [MP] igual a 8 ppm, nos sistemas contendo colesterol. É facilmente observado que em frequências entre 0,225 e 0,300 Hz os valores de E para o sistema contendo colesterol se torna maior do que os valores de E para o sistema sem colesterol.

Mais uma forma de análise dos dados de reologia é o acompanhamento dos valores de E com a frequência de deformação dos sistemas.

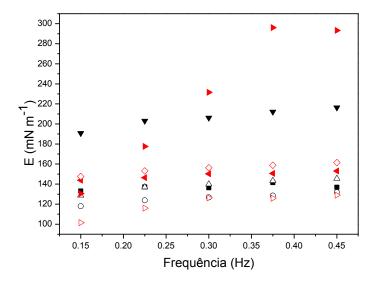


Figura 19. Comportamento de E em função da frequência em diferentes condições: ■

DPPC em [MP] = zero; ○ DPPC em [MP] = 2 ppm; △ DPPC em [MP] = 4 ppm; ▼

DPPC em [MP] = 8 ppm; ◀ DPPC/colesterol em [MP] = zero; ▷ DPPC/colesterol em [MP] = 2 ppm; ◇ DPPC/colesterol em [MP] = 4 ppm e ◆ DPPC/colesterol em [MP] = 8 ppm, à 36 ± 0,5°C.

Todos os sistemas mostraram um padrão bastante comum de aumento de E com o aumento da frequência, como já mencionado, com exceção do sistema contendo colesterol e com [MP] igual a 8 ppm. E na Figura 19 essa tendência de aumento significativo de E com o aumento da frequência é facilmente observada.

4.2. Análise dos Filmes LB

4.2.1. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os filmes LB formados nas placas de mica foram analisados utilizandos e a técnica de AFM. Assume-se que depois de transferida, a monocamada não se altera com relação à distribuição de lipídios e partículas. As imagens do perfil topográfico dos sistemas foram feitas com o objetivo de obter informações sobre a morfologia, segregação de fases e distribuição de partículas nas monocamadas.

A Figura 20 mostra as micrografias dos filmes de DPPC preparados a 36°C e analisados à temperatura ambiente, para concentrações de MP crescendo de 0 a 8 ppm.

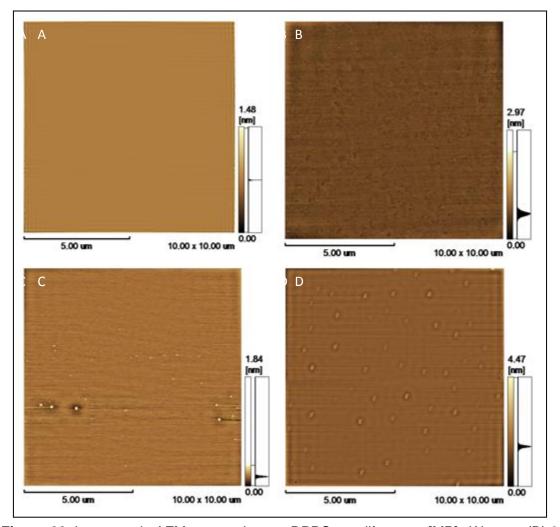


Figura 20. Imagens de AFM para o sistema DPPC em diferentes [MP]: (A) zero; (B) 2 ppm; (C) 4 ppm e (D) 8 ppm.

A monocamada de DPPC puro (Figura 20A) mostra uma imagem de superfície bastante lisa. Para baixas quantidades de MP, Figura 20B apresenta uma imagem que difere consideravelmente daquela obtida na ausência de MP, com uma rugosidade praticamente duplicada. Não se observa nenhum ponto claro que se saliente na interface. Essa variação da morfologia da monocamada pode ser correlacionada com o decréscimo do módulo de elasticidade (E) (discutido no item 4.3.2.) medido pela técnica de oscilação da gota pendente. Conforme a quantidade de partículas injetadas na monocamada é aumentada (Figuras 20C-D), maior é a densidade de pontos claros observados correlacionando-se diretamente com a

53

quantidade de partículas presentes na dispersão que forma a subfase. Dessa forma, é razoável identificar os pontos claros das micrografias com as partículas presentes na interface. Além disso, as depressões não são mais observadas para esses sistemas, ao invés disso, é observada uma superfície mais lisa e homogênea, com exceção das protuberâncias produzidas pelas partículas. É clara a influência da [MP] no arranjo das partículas, culminando com um arranjo quase que igualmente espaçado para o sistema de [MP] igual a 8 ppm.

A Figura 22 traz a análise do perfil da Figura 20D na região que contém os pontos que são descritos como sendo as partículas. Três diferentes partículas foram tomadas como exemplos e seus perfis foram analisados. Os resultados mostraram que as dimensões obtidas na análise de AFM estão muito bem correlacionadas com o tamanho médio das partículas medido por DLS e MEV, dando suporte à interpretação das imagens de AFM. Os resultados de MEV demonstram que a partícula não tem dimensões iguais em todas as direções: ela tem o formato de um paralelepípedo (Figura 21). Assim, por motivo de uma distribuição de grupos superficiais ou carga elétrica desigual nas faces maiores e menores as partículas podem se posicionar na interface expondo a face maior.

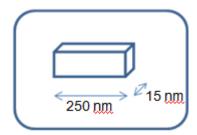


Figura 21. Esquema do provável formato das partículas analisadas.

54

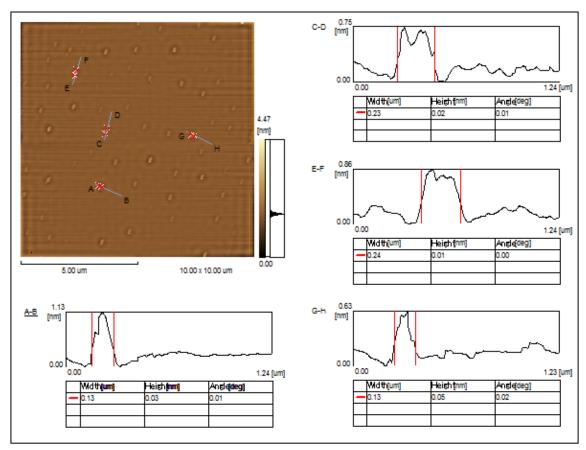


Figura 22. Análise de perfil das partículas do sistema de DPPC em [MP] igual a 8 ppm.

Filmes mistos de DPPC/Colesterol (10% w/w) também foram analisados por AFM. As imagens obtidas são mostradas na Figura 23.

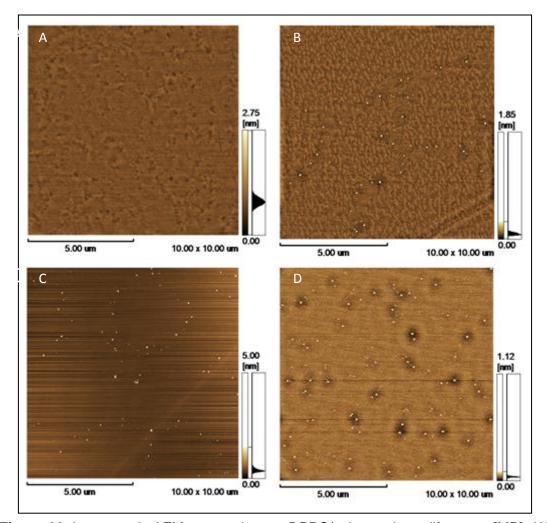


Figura 23. Imagens de AFM para o sistema DPPC/colesterol em diferentes [MP]: (A) zero; (B) 2 ppm; (C) 4 ppm e (D) 8 ppm.

A morfologia desse sistema difere daquele composto apenas por DPPC, em alguns aspectos. Primeiro, a imagem de AFM correspondente à monocamada formada em subfase de água pura, além do padrão ondulatório, entendido como artefato, mostra pontos escuros, evidenciando depressões nas monocamadas muito provavelmente devido à segregação das moléculas de colesterol que se rearranjam próximas umas das outras (Worthman et al. 1997). Interessante é a comparação entre as Figuras 23A e 23B, nas quais os pontos escuros são menos evidentes, mas também observados. No entanto, as morfologias desses dois tipos de monocamadas são diversas, da mesma forma

56

que o comportamento reológico provou ser (ver item 4.3.2.). Conforme as partículas foram inseridas nos sistemas, algumas mudanças são observadas. Com uma quantidade pequena de partículas (2 e 4 ppm), o efeito de desestabilização é evidente, mostrando uma estrutura não-uniforme (Figura 23B). Ainda, as partículas parecem se arranjar ao redor de certas linhas (Figuras 23B-C) que podem ser linhas de tensão ou fronteiras separando grandes domínios de dois lipídios. Apenas com [MP] igual a 8 ppm, a estrutura da monocamada é novamente observada, evidenciada por um padrão homogêneo de distribuição.

Uma proporção de colesterol de 10% (m/m) promove a desorganização da estrutura da monocamada. Baixas [MP] aumentam ainda mais essa desestruturação devido ao efeito desestabilizador já discutido. O fato é que uma [MP] elevada (8 ppm) devolve a estruturação da monocamada. Talvez isso ocorra por meio de uma organização das moléculas de lipídio ao redor das partículas, fazendo com que o efeito provocado tanto pelo colesterol quanto pelo MP diminua.

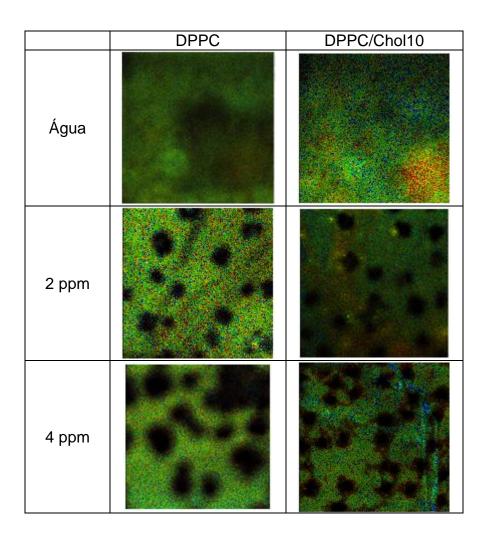
Portanto, a análise das imagens de AFM trouxe evidências para a distribuição do MP nas momocamadas lipídicas, dando suporte para as interpretações das propriedades reológicas que serão discutidas nesse relatório.

4.2.2. Microscopia do Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)

Abaixo são apresentadas as imagens de Fluorescência de Tempo de Vida das emissões das moléculas de lipídios marcadas com NBD (Figura 24). Para as monocamadas de DPPC puro, apenas DPPC-NBD foi usada como

57

sonda. Já nos sistemas contendo DPPC e colesterol, ambas as moléculas se encontram marcadas, DPPC-NBD e Col-NBD foram utilizados como sonda na concentração total de 1 mol % em relação ao total de lipídeos. Espera-se com isso a possibilidade de visualização simultânea de domínios tanto de DPPC quanto de colesterol. De acordo com a literatura (Raghuraman; Shrivastava; Chattopadhyay, 2007), em temperatura ambiente, Col-NBD apresenta tempo de vida maior do que DPPC-NBD. Isso indica que colesterol apresentará sempre cores mais quentes na escala indicada (tendendo ao vermelho), enquanto DPPC se mostrará sempre representado por cores mais frias (tendendo ao azul).



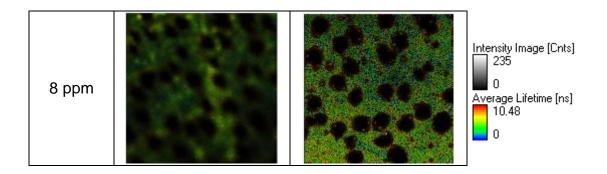


Figura 24. Imagens de FLIM para os diferentes sistemas de monocamadas e [MP].

DPPC/Chol10 corresponde a uma razão 90/10 (p/p) DPPC/colesterol.

As imagens referentes aos sistemas contendo apenas DPPC apresentam pouca variação de cores, o que indica a composição lipídica como sendo de apenas um tipo de molécula. Sistemas contendo partículas evidenciam a presença de regiões não emissoras de luz, o que indica a presença das partículas, que de fato, não são esperadas emitirem algum tipo de luz. A quantidade de regiões não emissoras no filme aumenta com o aumento da [MP], indicando uma distribuição relativamente homogênea dessas partículas no filme.

As imagens dos filmes contendo colesterol apresentam um padrão ligeiramente diferente. Sempre mostrando uma distribuição mais heterogênea de cores, sendo a presença do colesterol responsável por tal fenômeno. O mesmo efeito provocado pelas partículas nos sistemas compostos apenas de DPPC aqui também é observado. Uma peculiaridade desse sistema, porém, é a preferência do arranjo das moléculas de colesterol ao redor das partículas, sendo bastante evidenciado para [MP] 4 e 8 ppm. Isso aumenta a organização do filme e é responsável, como será discutido adiante, pelo aumento da rigidez dessas monocamadas.

Comparando-se as regiões não emissoras de luz em ambos os sistemas (sem e com colesterol), é possível notar que para os sistemas contendo colesterol as mesmas são menores e mais bem definidas, ou seja, mais arredondadas. Já nos sistemas contendo apenas DPPC, as regiões emissoras se mostram mais alongadas e com distribuição mais heterogênea de tamanhos. Desta forma, atribuindo-se às regiões não emissoras às partículas, que não deveriam sofrer alteração de tamanho ou geometria se mantiverem a orientação, conclui-se que nas monocamadas mistas, as mesmas sejam estabilizadas por colesterol. Ao contrário, na monocamada de DPPC puro as mesmas são passíveis de agregação, gerando partículas maiores e com geometrias menos definidas. Esse arranjo em nível mesoscópico, pode afetar as propriedades mecânicas da monocamada.

Outro fato a ser apontado nesses sistemas é o tamanho das regiões não emissoras de luz (e atribuídas às partículas) presentes nos filmes sendo muito maiores que as partículas. Esse resultado pode ser atribuído à agregação, que ocorre de forma mais acentuada das partículas no caso das monocamadas de DPPC puro. Não se descarta, porém, a possibilidade de um processo de depleção lipídica nas vizinhanças da partícula. Se esse processo vir a ocorrer, a presença de moléculas marcadas também deve diminuir e, consequentemente gerar regiões escuras.

Capítulo 5: Conclusões

Altas concentrações de colesterol e MP obtido da queima da palha da cana-de-açúcar (tamanho médio de 250 nm) mostraram-se causadores de efeitos desestruturadores nas monocamadas de DPPC. Segregação de fase e disfunções nas propriedades físico-químicas, como o módulo de elasticidade

dilatacional (E), são algumas das evidências mostradas nesse estudo. Dois efeitos diferentes foram observados quando MP foi inserido nos sistemas modelos de membrana. O primeiro, provavelmente causado pela interação de cargas na superfície da monocamada levando a uma desestabilização do sistema. E o segundo, de natureza geométrica, devido à inserção das partículas na monocamada, tornando as estruturas mais organizadas e rígidas. Altas concentrações de colesterol e altas concentrações de MP, quando associadas, fizeram com que os sistemas se reaproximassem àquele em ausência de partículas, com uma monocamada bem estruturada e valores de E próximos àqueles observados na ausência de partículas. Finalmente, algumas evidências mostraram um efeito similar das moléculas de colesterol e o MP em respeito à estruturação das monocamadas. No entanto, ambos estão longe de ter a propriedade de amenizar os efeitos provocados pelo outro, apenas agem juntos para provocar efeitos semelhantes aos sistemas.

Capítulo 6: Referências Bibliográficas

Andrade, S. J.; Cristale, J.; Silva, F. S.; Zocolo, G. J.; Marchi, M. R. R. Atmospheric Environment **2010**, 44, 2913-2919.

Arbex, A. M.; Cançado, J. E. D.; Pereira, L. A. A.; Braga, A. L. F.; Saldiva, P. H. N. *J. Bras. Pneumol.* **2004**, 30 (2), 158-175.

Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E.; J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem. 1992, 14, 91-99.

Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E.; Textilveredlung 1993, 28, 182-184.

Caseli, L.; Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; Leone, F. A.; Zaniquelli, M. E. D. . *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 969-977.

Caseli, L.; Oliveira, R. G.; Masui, D. C.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A.; Maggio,

B.; Zaniquelli, M. E. D.; *Langmuir* **2005**, 21, 4090-4095.

Davies, J. T.; Rideal, E. K.; Interfacial Phenomena. 1961, 474.

Diemel, R. V.; Snel, M. M. E.; van Golde, L. M. G.; Putz, G.; Haagsman, H. P.; Batenburg, J. J.; *Biochemistry* **2002**, 41, 15007-15016.

Dobbs, L. G.; Annu. Rev. Med. 1989, 40, 431-446.

Donaldson, K.; Stone, V.; Clouter, A.; Renwick, L.; MacNee, W. *Occup. Environ. Med.* **2001**, 58, 211-216.

Dynarowicz-Łatka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira Jr, O. N.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, 91, 221-293.

Fleming, B. D.; Keough, K. M. W. Chem. Phys. Lipids 1988, 81, 49.

Gidalevitz, D.; Ishitsuka, Y. J.; Muresan, A. S.; Konovalov, O.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Lee, K. Y. C.; *PNAS.* **2003**, 100, 6302-6307.

Goerke, J.; Biochim. Biophys. Acta 1998, 1408, 79-89.

Gómez-Gil, L.; Pérez-Gil, J.; Goormaghtigh, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1788, 1907-1915.

Gómez-Gil, L.; Schurch, D.; Goormaghtigh, E.; Pérez-Gil, J. *Biophysical Journal* **2009**, 97, 2736-2745.

Gonçales, T. M. Impacto da Queima da Palha da Cana-de-Açúcar na Saúde. *Il Fórum Ambiental da Alta Paulista* **2006**.

Gong, K.; Feng, S.; Go, M. L.; Soew, P. H. *Colloids and Surfaces A:*Physicochemical and Engineering Aspects **2002**, 207, 113-125.

Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2012**, doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.12.059.

Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F. Soft Matter 2012, 8, 3938-3948.

Hamelmann, F.; Heinzmann, U.; Szekeres, A.; Kirov, N.; Nikolova, T. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2005**, 7, 389 – 392.

Harishchandra, R. K.; Saleem, M.; Galla, H. S. *J. R. Soc. Interface* **2010**, 7, 15-26.

Ivanov, I.B., Danov, K.D., Ananthapadmanabhan, K.P., Lips, A., *Adv.Colloid. Interface Sci.* **2005**, 114-115,61-92.

Kanno, S.; Furuyama, A.; Hirano, S. Archives of Toxicology 2008, 82, 841-850.

Karmakar, S.; Raghunathan, V. A.; Mayor, S. *J. Phys.: Condens. Matter* **2005**, 17, 1177-1182.

Kovalchuk, V. I.; Miller, R.; Fainerman, V. B.; Loglio, G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005**, 114 – 115, 303 – 312.

Kumar, P.; Bohidar, H. B. *Indian Journal of Experimental Biology* **2010**, 48, 1037-1042.

Langmuir, I.; *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39, 1848.

Lepesant, J. P.; Powers, L.; Pershan, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sd.* **1978**, 75, 1792-1795.

LeVine, A. M.; Kurak, K. E.; Wright, J. R.; Watford, W. T.; Bruno, M. D.; Ross, G. F.; Whitsett, J. A.; Korfhagen, T. R.; *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1999**, 20, 279-286.

Li, J. J.; Muralikrishnan, S.; Ng, C. T.; Yung, L. Y. L.; Bay, B. H. *Exp. Biol. and Med.* **2010**, 235, 1025–1033.

Li, X. M.; Momsen, M. M.; Smaby, J. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E. *Biochemistry* **2001**, 40, 5954-5963.

Lopes, F. S.; Ribeiro, H. Rev. Bras. Epidemiol. 2006, 9 (2), 215-225.

Lourenzoni, M. R.; Namba, A. M.; Caseli, L.; Degreve, L.; Zaniquelli, M. E. D.; *J. Physical Chemistry B.* **2007**, 111, 11318-11329.

Lucassen, J. van den Tempel, M., Chem. Eng. Sci. 1972, 27, 1283.

Maggio, B.; Rosetti, C.M.; Borioli, G.A.; Fanani, M.L.; Del Boca, M.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, 38, 1735-1748.

Maioli, O. L. G; Knoppers, B. A.; Azevedo, D. A. *J. Atmos. Chem.* **2009**, 64, 159–178.

Malilay J. Background papers of Health Guidelines for Vegetation Fire Events; 1998 Oct 6-9; Lima, Peru. Genebra: WHO, **1999**.

Muller-Landau, F.; Cadenhead, D. A. Chem. Phys. Lipids 1979, 25, 315.

Nieman, G. F.; Clark, W. R.; Wax, S. D.; Webb, W. R. *Ann. Surg.* **1980**, 191, 171-181.

Nikula, K. J.; Vallyathan, V.; Green, F. H. Y.; Hahn, F. F. *Environm. Health Persp.* **2001**, 109, 4, 311-318.

Orgeig, S.; Daniels, C. B.; Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2001, 129, 75-89.

Ou-Yang, W. Weis, M.; Manaka, T.; Iwamoto, M. *J. Chem. Phys.* **2011**, 134, 154709.

Piantados, C. A.; Schwartz, D. A. Ann. Intern. Med. 2004, 141, 460-470.

Pisula, W.; Tomović, Z.; Simpson, C.; Kastler, M.; Pakula, T.; Müllen, K. *Chem. Mater.* **2005,** 17, 4296-4303.

Posfai, M.; Simonics, R.; Li, J.; Hobbs, P. V.; Buseck, P. R. *Journal of Geophysical Research* **2003**, 108, 13, 8483.

Prachayasittikul, V.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Tantimongcolwat, T.;

Nantasenamat, C.; Galla, H. J. Acta Biochim Biophys Sin 2007, 39, 901-913.

Raghuraman, H.; Shrivastava, S.; Chattopadhyay, A. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1768, 258–1267.

Ravera F.; Ferrari M.; Liggieri L. Adv. Colloid Interf. Sci. 2000, 88, 129-177.

Ribeiro H. Rev. Saúde Pública 2008, 42 (2), 370-376.

Ribeiro, H.; Assunção, J. V. Estudos Avançados 2002, 16 (44).

Rodriguez-Capote, K.; McCormack, F. X.; Possmayer, F.; *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 20461-20474.

Rubinger, C. P. L.; Moreira, R. L.; Cury, L. A.; Fontes, G. N.; Neves, B. R. A.; Meneguzzi, A.; Ferreira, C. A. *App. Surf. Sci.* **2006**, 253, 543–548.

Savi, M. A.; Pacheco, P. M. C. L. *Brazilian J. Biomedical Eng.***1999**, 15 (3), 125-133.

Schulz, M.; Olubummo, A.; Binder, W. H. Soft Matter 2012, doi: 10.1039/czsm06999g.

Shah, D. O.; Schulman, J. H. J. Lipid Research 1967, 8, 215.

Shi, X. C.; Keane, M. J.; Ong, T. M.; Harrison, J. C.; Slaven, J. E.; Bugarski, A.

D.; Gautam, M.; Wallace, W. E. J. Phys.: Conf. Ser. 2009, 151, 012021.

Stockl, M. T.; Herrmann, A. *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 7, 1798, 1444-1456.

Stuart, D.; Lobenberg, R.; Ku, T.; Azarmi, S.; Ely, L.; Roa, W.; Prenner, E. J. Journal of Biomedical Nanotechnology 2006, 2, 245-252.

Tatur, S.; Badia, A. *Langmuir* **2012**, 28, 628-639.

Tierney, K. J.; Block, D. E.; Longo, M. L. *Biophysical Journal* **2005**, 89 2481-2493.

Tolle, A.; Meier, W.; Rudiger, M.; Hofmann, K. P.; Rustow, B.; *Chem. Phys. Lipids.* **2002**, 114, 159-168.

Tsuzuki, A.; Kuroki, Y.; Akino, T.; Am. J. Physiol. 1993; 265, L193-L199.

Vasconcellos, P. C.; Souza, D. Z.; Sanchez-Ccoyllo, O.; Bustillos, J. O. V.; Lee,

H.; Santos, F. C.; Nascimento, K. H.; Araújo, M. P.; Saarnio, K.; Teinilä, K.;

Hillamo, R. Science of the Total Environment 2010, 408, 5836–5844.

Wallace, W. E.; Keane, M. J.; Murray, D. K.; Chisholm, W. P.; Maynard, A. D.;

Ong, T. M. Journal of Nanoparticle Research 2007, 9, 23-28.

Wiacek, A.E.; Colloids and Surf. A 2007, 302, 141-149.

Wiecek, A.; Dynarowicz-Łatka, P.; Vila-Romeu, N.; Nieto-Suarez, M.; Flasinski,

M.; Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 2008, 321, 201–205.

Wong, C. J.; Akiyama, J.; Allen, L.; Hawgood, S.; *Pediatr. Res.* **1996**; 39, 930-937.

Worthman, L. A.; Nag, K.; Davis, P. J.; Keough, K. M. *Biophys J.* **1997**, 72, 2569–2580.

Wustneck, R.; Perez-Gil, J.; Wustneck, N.; Cruz, A.; Fainerman, V. B.; Pison, U.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005,** 117, 33 – 58.

Yu, S. H.; Possmayer, F. Biochim. Biophys. Acta 1988, 81, 961.

Yu, S. H.; Possmayer, F. Journal of Lipid Research 1998, 39, 555-568.

Yu, S. H.; Possmayer, F.; J. Lipid Res. 2003, 44, 621-629.