**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E CIÊNCIA DOS
MATERIAIS**

**“INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS COM FILMES
DE LANGMUIR DE FOSFOLIPÍDIOS”**

MIRNA INÉS MOSQUERA SÁNCHEZ

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências “Física Aplicada”

Orientador:
Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior

USP/IFSC/SBI

8-2-001393

Comissão Julgadora:
Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior (IFSC-USP)
Prof. Dr. Richard Charles Garratt (IFSC-USP)
Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund (IF-USP)
Profa. Dra. Ana Maria Carmona Ribeiro (IQ-USP)
Profa. Dra. Galina Borissevitch (UNICOC)

04

São Carlos – São Paulo
2000

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Sánchez, Mirna Inés Mosquera

“Interação de moléculas biologicamente ativas com filmes de lagmuir de fosfolipídios”/ Mirna Inês Mosquera Sánchez – São Carlos, 2000

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2001 páginas: 107

Área: Física Aplicada

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior

1. Moléculas Biológicas, Filmes de Langmuir

I. Título

IFSC**UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO****Instituto de Física de São Carlos**

Caixa Postal 369 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP
Fone: (0xx16) 273-9777 - Fax: (0xx16) 273-9777
E-mail: wladerez@if.sc.usp.br

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MIRNA INES
MOSQUERA SANCHEZ APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 02 DE AGOSTO DE 2000.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior/IFSC-FCM-USP

Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund/IF-USP

Prof. Dr. Richard Charles Garratt/IFSC-FFI-USP

Profa. Dra. Ana Maria Carmona Ribeiro/IQ-USP

Profa. Dra. Galina Borissevitch/UNICOC

e-mail: wladerez@if.sc.usp.br

*Un tributo a Jorge, hermano:
-estarás em mi coração por siempre.*

AGRADECIMENTOS

Neste momento, é um ato de justiça registrar que só foi possível chegar ao ápice deste processo marcado por profundos significados das minhas trajetórias pessoal, acadêmica e profissional, graças à colaboração de muitas pessoas, familiares, professores, amigos. Externo minha gratidão a todos.

Primeiramente a **Deus**, pela vida, força e sustento que me concede a cada dia, para concluir as tarefas que me são confiadas.

Agradecimentos especiais a minha família:

-aos meus queridos pais: Alvaro e Inés, que embora privados da convivência cotidiana, com amor e paciência incentivaram-me durante essa travessia. Eles estão de corpo presente na Colômbia, mas espiritualmente habitam no meu coração.

-a Jayme, quem soube romper todas as barreiras com as quais protegi o meu coração. Sempre sensível, carinhoso, e maravilhoso na compreensão das grandiosidades e debilidades do ser humano.

-aos meus irmãos Álvaro, Gustavo e Zuleima, fortes, alegres, trabalhadores e principalmente amigos.

-a Nenita, Miguel e Antonio e todos os meus tios, um exemplo de dedicação e vontade de sair adiante na vida.

-aos meus sobrinhos, Felipe, Christian, Johan, Luis e Jorge, a nova geração da minha família, a esperança de um futuro melhor, meus amores mirins.

Aos professores:

-Dr Osvaldo Novais de Oliveira Junior, meu orientador no doutorado, quem se revelou privilegiado nas reflexões e na condução da pesquisa em sistemas moleculares complexos, despertou em mim o interesse na arte de pesquisar através da **Perspectiva Maravilhosa do Estudo da Técnica de Langmuir**.

-Dra. Patrycja Dynarowicz, humana e talentosa, uma grande pesquisadora.

-Dr. José Pedro Donoso González, que em um momento de crise soube ser compreensivo e tolerante.

-Dra. Débora Gonçalves, que com o seu entusiasmo pela ciência me mostrou que grande parte do aprendizado vem dos livros.

-Dr Celso Pinto de Melo, Diretor de Desenvolvimento Científico do CNPq, meu orientador no curso de mestrado, que me incentivou a continuar com o doutorado.

-Dr. Rubén Antonio Vargas Zapata, meu orientador na graduação, um físico completo.

-Drs. Mathias Lösche, Heinrich Haas e Marcel Tabak, participantes diretos do grupo de trabalho em filmes de Langmuir, sua ajuda foi valiosa e enriquecedora.

-Lic. Manuel Salvador Collazos Parra, meu professor de física do segundo grau, com quem aprendi os primeiros conhecimentos em pesquisa básica e aplicada.

-Lic. Rodolfo Guevara Rivas, meu professor de línguas, o mestre perfeito.

-Lic. Maura Elisa Díaz Hidalgo, minha professora das primeiras letras e amiga de toda a vida, uma lutadora.

-à minha madrinha, a Prof. Ana Ruth Díaz, grande dama, graças pelo carinho.

-Lics. Fidel Mosquera, Cecilia Murillo de Mosquera, Cristina Viáfara de Zúñiga, Plácida González, mas que professores, grandes amigos.

-a todos meus professores, o saber distribuído não tem preço.

Aos amigos:

-à Martha, pela força e principalmente pela sinceridade,

-a Alexandre Marletta, quem soube tolerar o meu temperamento e fez nossa convivência na sala de trabalho amena e acolhedora,

-à Arlete e Romildo, chegaram no momento certo para me dar aquela força a mais que todos precisamos para não desistir dos nossos objetivos,

-à Luisa, amiga incansável que sempre me incentivou a enfrentar os desafios com os quais me deparei;

-à Sandra, que sempre me escutou e deu conselhos atinados,

-a Dante, que me motivou a mostrar espírito de luta,

-à Carla, me ensinou que o crescimento vem de dentro de nós mesmos,

-a Luis Eduardo de Almeida, uma pessoa muito fina e espiritual,

-à Mara, Ana Tereza, Viviane, e Kathia, pela amizade honesta e douradora,

-à Orfa, Esperanza, Mercedes, pelo afeto sincero,

-a Antonio, os mais jovens também ensinam,

-a Ailton, que ajudou bastante com o material de pesquisa,

-a Wilker, aprendi muito trabalhando com ele.

Aos Técnicos:

-ao Ademir, Débora, Bertho, Rosângela, Wladerez e Níbio, facilitaram o meu trabalho com uma eficiência e uma capacidade acima da média e em um ambiente muito cooperativo e salutar.

-A todos os colegas do grupo de Polímeros, que me fizeram sentir em casa.

-A todos que acreditaram e torceram por este trabalho, contribuindo de diferentes formas, mesmo no anonimato, os meus mais sinceros agradecimentos.

-Ao povo brasileiro, trabalhador, hospitaleiro e festivo, minhas recordações sempre serão as melhores, e minha dívida eterna.

-Ao CNPq, à CAPES, à FAPESP e todos os órgãos de financiamento à pesquisa básica e aplicada no Brasil e no mundo.

Símbolos

π : pressão de superfície

γ : tensão superficial na ausência da monocamada de Langmuir

γ_0 : tensão superficial com a monocamada de Langmuir

ΔV : potencial de superfície total

μ_i : momento de dipolo de cada grupo molecular na interface

ϵ_i : constante dielétrica de cada grupo molecular na interface

Ψ_0 : potencial eletrostático devido à dupla camada elétrica difusa

Z : fator de compressão

p : pressão volumétrica de um gás real

V_T : volume de um gás real

T : temperatura

R : constante universal dos gases

k : constante de Boltzmann

σ : densidade superficial de carga

n : concentração de contra-íons na subfase

ϵ : constante dielétrica do meio

Nomenclatura

D: Debye

mD: miliDebye

mN/m: miliNewtons/metro

mm/min: milímetros/minuto

DIP: dipiridamol

DPPG: dipalmitoil fosfatidil glicerol

DPPC: dipalmitoil fosfatidil colina

CPZ: clorpromazina

TFP: trifluoperazina

MEL: melatonina

COL: colesterol

GC: Gouy-Chapman

FTIR: infravermelho por transformada de Fourier

INDICE

SÍMBOLOS
RESUMO
ABSTRACT

CAPÍTULO 1

Introdução..... 1

CAPÍTULO 2

Considerações sobre medidas de pressão e potencial de superfície em filmes de Langmuir..... 5

2.1. A pressão e potencial de superfície..... 5

 a) A pressão de superfície..... 5

 b) O potencial de superfície contra a área por molécula..... 6

2.2. Técnicas de medidas..... 7

 a) Pressão de superfície..... 8

 b) Potencial de superfície..... 9

2.3. A interpretação das isothermas de pressão contra a área por molécula.... 9

 2.3.1. Figuras de isothermas de pressão para o DPPC e o DPPG..... 9

 2.3.2. Fatores que afetam as isothermas de pressão de superfície.....12

 Ionização de fosfolipídios.....15

 Interação entre íons e lipídios carregados na interface água-ar.....16

 2.3.2. Como as isothermas de potencial de superfície podem ser afetadas..... 17

CAPÍTULO 3

Parte experimental..... 22

 Materiais empregados..... 22

Procedimento.....	22
 CAPÍTULO 4	
Misturas DIP.....	29
4.1. Misturas DIP/DPPC.....	30
A. Isotermas de pressão de superfície.....	30
• Influência da pressão nas formação de monocamadas para diferentes pressões.....	30
B. Isotermas de potencial de superfície.....	38
Discussão.....	42
• Regime das baixas concentrações do DIP.....	42
• Altas concentrações do DIP.....	45
• Interpretações a escala molecular das interações do DIP com a camada do DPPC.....	46
• Conclusão.....	47
4.2. Misturas DIP/DPPG.....	48
A. Isotermas de pressão de superfície.....	48
B. Isotermas de potencial de superfície.....	50
Conclusão.....	52
 CAPÍTULO 5	
Misturas TFP e CPZ.....	53
5.1. Misturas CPZ/DPPC.....	53

A. Isotermas de pressão de superfície.....	53
B. Isotermas de potencial de superfície.....	56
Conclusão.....	58
5.2. Misturas CPZ/DPPG.....	59
A. Isotermas de pressão de superfície.....	59
B. Isotermas de potencial de superfície.....	61
Conclusão.....	63
5.3. Misturas TFP/DPPC.....	64
A. Isotermas de pressão de superfície.....	64
B. Isotermas de potencial de superfície.....	68
Conclusão.....	70
5.4. Misturas CPZ/DPPG.....	71
A. Isotermas de pressão de superfície.....	71
B. Isotermas de potencial de superfície.....	75
Conclusão.....	77
 CAPÍTULO 6	
Misturas MEL e COL.....	78
<i>Melatonina</i>	78
6.1. Misturas MEL/DPPC.....	79
A. Isotermas de pressão de superfície.....	79
B. Isotermas de potencial de superfície.....	83

Conclusão..... 86

6.2. Misturas MEL/DPPG.....86

A. Isotermas de pressão de superfície..... 86

B. Isotermas de potencial de superfície..... 89

Conclusão.....91

COLESTEROL..... 92

6.3. Misturas COL/DPPC.....93

A. Isotermas de pressão de superfície..... 93

B. Isotermas de potencial de superfície..... 98

Conclusão.....101

6.4 Misturas COL/DPPG.....102

A. Isotermas de pressão de superfície..... 102

B. Isotermas de potencial de superfície.....105

Conclusão..... 108

CAPÍTULO 7

Conclusões e perspectivas.....109

Conclusões gerais.....109

Perspectivas.....111

REFERÊNCIAS112

Anexo I

RESUMO

A interação de várias substâncias bioativas com monocamadas de fosfolipídios foi investigada usando isothermas de pressão e potencial de superfície, incluindo as drogas farmacológicas dipiridamol (DIP), clorpromazina (CPZ) e trifluoperazina (TFP), além da melatonina (MEL) e o colesterol (COL). Os fosfolipídios empregados foram o zwitteriônico dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e o aniônico dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) espalhados na superfície de água ultrapura, sendo que as monocamadas servem como modelo simples de membranas. A cooperatividade na interação entre fosfolipídios e moléculas com atividade biológica foi essencial para entender os acentuados efeitos na expansão (ou condensação) das monocamadas e as mudanças no momento de dipolo (até 10% de aumento na expansão em relação à monocamada do fosfolipídio puro para as misturas DIP/DPPC) que ocorreram a concentrações molares muito baixas entre 0,2-0,4% do DIP. Tais efeitos foram observados para todas as cinco substâncias investigadas, em todos os regimes de pressão. Nas altas concentrações, o comportamento da interação depende do tipo de molécula e também de se a monocamada hospedeira é de DPPC ou DPPG. Para o DPPC, as drogas farmacológicas foram expelidas da interface em vários graus a altas pressões, e existia um máximo de concentração da droga acima do qual ocorria a saturação, provavelmente porque as moléculas em excesso foram para a subfase. Essas concentrações críticas foram de 2% em mol para o DIP e a CPZ e de 5% em mol para a TFP. Para o DIP, em particular, os resultados das isothermas foram correlacionados com experimentos de espectroscopia de FTIR e microscopia de fluorescência *"in situ"*, realizados por colaboradores, os quais permitiram a determinação de uma localização precisa da droga estudada. Não existe inserção do DIP na região da cauda hidrofóbica da monocamada do DPPC, com a interação ocorrendo com o grupo fosfato no zwitterion, cujas pequenas mudanças na orientação induzidas pelo DIP levam a grandes mudanças no momento de dipolo. Como o DPPG está carregado negativamente sobre a superfície da água pura, não existe saturação nos efeitos de expansão com o aumento da concentração das drogas. O aumento do momento de dipolo efetivo na monocamada mista é atribuído a alterações na densidade de carga superficial pela adsorção da droga catiônica, que reduz a contribuição negativa do potencial da dupla camada, quando comparado com o da monocamada de DPPG puro. Os resultados do COL e a MEL devem ser considerados separadamente devido a sua natureza distinta, embora um comportamento cooperativo também tenha observado com grandes efeitos nas baixas concentrações. Tanto o COL como a MEL induzem mudanças na expansão das monocamadas de DPPC até a máxima concentração empregada, 20% molar. Para o COL foi observado um efeito de condensação a baixas concentrações, o qual foi seguido por uma expansão a altas concentrações, confirmando assim resultados prévios da literatura. Todas as monocamadas mistas COL/DPPG apresentavam-se expandidas, também confirmando alguns resultados da literatura para lipídios (diferentes do DPPC) quando misturados com o COL. A interação da MEL com o DPPC foi essencialmente similar à do COL, apesar do fato de a MEL pura não formar monocamadas estáveis. Sua interação com o DPPG foi peculiar já que o efeito que esta induz satura a 5% em mol. Isto também difere do comportamento das drogas farmacológicas. A MEL é neutra em todos os pHs, portanto, sua interação com as membranas modelo de DPPG e DPPC só pode ocorrer via dipolo. O mesmo se aplica ao colesterol, o que justifica as diferenças no comportamento destas duas moléculas quando comparadas com as drogas (DIP, CPZ, TFP), que são carregadas sobre a água pura, nas misturas com os dois fosfolipídios (DPPG e DPPC).

ABSTRACT

The interaction of various bioactive substances with phospholipid monolayers has been investigated using surface pressure and surface potential isotherms, which include the pharmaceutical drugs dipyridamole (DIP), chlorpromazine (CPZ) and trifluoperazine (TFP), in addition to melatonin (MEL) and cholesterol (COL). The phospholipids employed were the zwitterionic dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) and the anionic dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) spread onto ultrapure water surfaces, where the monolayers served as simple model membrane systems. Cooperativity in the interaction between phospholipid and bioactive molecules was essential to account for the large effects of expansion (up to 10% increase in area in relation to the pure phospholipid monolayer for the DIP/DPPC mixture) of the monolayers and changes in dipole moment, which occurred at very low concentrations, e.g. 0.2 - 0.4 mol% of the substance. Such large effects were observed for all 5 substances investigated, at all surface pressure regimes. At higher concentrations, the interaction behavior depended on the type of molecule and also on whether the host monolayer was DPPC or DPPG. For DPPC, the pharmaceutical drugs were expelled at varying degrees from the interface at high surface pressures, and there was a maximum drug concentration above which the effects saturated, probably because the molecules in excess were lost to the subphase. These critical concentrations were 2mol% for DIP and CPZ and 5mol% for TFP. For DIP, in particular, the results from isotherms were correlated with *in situ* FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy experiments, carried out by collaborators, which allowed the precise location of the drug to be determined. There is no insertion of DIP into the hydrophobic tail region of the DPPC monolayer, with interaction taking place with the phosphate group in the zwitterion, whose small changes in orientation induced by DIP lead to the large changes in dipole moment. Because DPPG is negatively charged on a pure water surface monolayer, there is no saturation of the expansion effects with the increase in drug concentration. The increase in the effective dipole moment of the mixed monolayers are attributed to alterations in the surface charge density by adsorption of the cationic drugs, which then reduces the negative contribution of the double-layer potential, as compared to the pure DPPG monolayer. The results for COL and MEL must be considered separately owing to their distinct nature, even though a cooperative behavior was also observed with large effects at low concentrations. Both COL and MEL induce changes in the DPPC monolayers up to the highest concentration employed, viz. 20mol%. For COL, a condensation effect was observed at low concentrations, which was followed by monolayer expansion at high concentrations, thus confirming previous results in the literature. All COL/DPPG monolayers were more expanded than pure DPPG, also confirming previous results from the literature. While the interaction of MEL with DPPC was essentially similar to that of COL, in spite of the fact that MEL does not form stable monolayers on its own, its interaction with DPPG was somewhat peculiar in that the effects it induced saturate at 5mol%. This also differs from the behavior of the pharmaceutical drugs. MEL is neutral over a wide range of pHs, and therefore its interaction with DPPC and DPPG monolayers must occur via dipole interaction. The same applies to COL, and this explains why the behavior of these two substances is different from the drugs (DIP, CPZ and TFP) that are charged on the water surface, in the interaction with DPPC and DPPG.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A ação fisiológica de fármacos e outras substâncias biológicas está, em muitos casos, estreitamente ligada à sua interação com a membrana celular. Por isso, há décadas [1-3] estudos vêm sendo empreendidos para investigar tais interações no nível molecular, mas uma dificuldade recorrente está na complexidade de uma membrana celular, composta por uma bicamada de fosfolípidios - o seu arcabouço - que abriga uma série de moléculas como as proteínas. Reproduzir as condições experimentais de uma membrana é uma tarefa árdua, senão impossível, o que tem motivado pesquisadores a empregar modelos de membrana. Há vários tipos de modelo, dentre os quais destacam-se as micelas e os filmes (monocamadas) de Langmuir contendo fosfolípidios. Tais filmes são adequados porque apresentam alta ordem estrutural quando depositados na interfase água-ar.

Neste trabalho de tese, empregaremos filmes de Langmuir como modelos de membrana e estudaremos sua interação com diversas moléculas biológicas. Serão empregadas basicamente duas técnicas de caracterização: as isotermas de pressão de superfície e potencial de superfície, de filmes dos fosfolípidios dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), e dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG), misturados com as moléculas de interesse biológico. A escolha dos fosfolípidios foi baseada na sua importância como componentes de diversas membranas celulares, além de sua disponibilidade em alto grau de pureza, e existência de vários estudos da literatura que podem ser empregados como referência. As moléculas estudadas compreendem três fármacos, o dipiridamol (DIP), a trifluoperazina (TFP) e a clorpromazina (CPZ), além de duas de natureza biológica, a melatonina (MEL) e o colesterol (COL).

O DIP e seus derivados atuam como vasodiladores coronários e como co-ativadores de efeitos anti-tumorais de outras drogas através da interação com glicoproteínas que podem ser associadas com a resistência a multidrogas (RMD) desenvolvida em células tumorais [4-8]. Estudos espectroscópicos (absorção, fluorescência, e NMR) da associação do DIP com membranas e macromoléculas biológicas [9-13] indicam que as componentes da membrana celular são mediadores da interação do DIP com sistemas biológicos. Estudos de afinidade com micelas [9, 11] e vesículas [12, 13] de fosfolípidios mostram que as constantes de associação para o DIP e vários derivados estão correlacionadas com a hidrofobicidade dos compostos. Além disso, a constante de associação desses compostos

com as membranas já foi correlacionada com os efeitos farmacológicos das drogas, por exemplo, inibição do transporte de adenosina ou de fosfato através das membranas celulares dos glóbulos vermelhos do sangue [14] e suas atividades antitumorais. Nenhuma dessas propriedades da família do DIP, a da inibição da coagulação das plaquetas nem sua ação como um antioxidante, [15-19] foi explicada em nível molecular. A clorpromazina (CPZ) e a TFP (trifluoperazina) são tranqüilizantes, ou agentes antipsicóticos, fenotiazínicos, estudados em conexão com sua ação em membranas, especialmente em membranas nervosas e dos eritrócitos do sangue [20,21]. A CPZ é usada também como uma droga anti-vômito em tratamento de alcoólicos e para o controle do vômito intratável [22]. Além disso, é sabido que a CPZ e a TFP são efetivos na preservação do organismo [23], ainda assim, estas duas drogas não têm sido muito usadas na preservação do organismo. O COL, uma substância graxa, é um constituinte natural de membranas celulares, sua concentração molar varia dependendo das características específicas de cada membrana. E a MEL, outro constituinte natural, é um hormônio presente em todos animais vertebrados mamíferos [24] ou não [25], sintetizado na glândula pineal, na retina e na região gastro-intestinal, sua função é a de circular dentro do sangue no ciclo dia/noite com altos teores principalmente durante a escuridão, na noite), em invertebrados [26], além de algas [27] e bactérias [28, 29], e também em uma variedade de plantas comestíveis [30, 31].

As drogas DIP, CPZ e TFP são carregadas positivamente, já a MEL e o COL, são neutros; no pH da água. Estudos da distribuição de drogas entre o intestino e o plasma, entre os canais dos rins e a urina, e entre plasma e outros compartimentos do corpo sugerem que só drogas não dissociadas e solúveis em lipídios podem, na verdade passar a través das membranas celulares. Ou seja, a MEL (usada na medicina como uma droga antidepressiva) e o COL (que não é uma droga, mas sim um constituinte natural das membranas que não dissocia na água) são os únicos candidatos a atravessar a parte hidrofóbica das membranas de lipídios. Por outro lado podemos prever que drogas CPZ, TFP e DIP, dissociadas no pH aquoso, ficariam confinadas a parte hidrofílica das moléculas de lipídios. Elas só poderiam atravessar a membrana a través de um sistema de transporte [32].

A escolha das moléculas ocorreu pelo seu interesse biológico, e por serem - em sua maioria - materiais investigados num projeto de colaboração entre o Grupo de

Biofísica Molecular do IQSC, USP, liderado pelo Prof. Marcel Tabak, e o Grupo de Polímeros Prof. Bernhard Gross, do IFSC, USP.

Embora todos os compostos usados neste trabalho sejam de interesse biológico, aqui foram preparados filmes de Langmuir de membranas modelo cuja significância biológica e farmacológica está muito longe de ser atingida. A forma mais simples de se preparar um filme de Langmuir é na água pura, que tem um pH de 5,6, sendo que o pH fisiológico é de 7,4. E mesmo que tivesse sido usado um pH 7,4 as membranas naturais estão constituídas não por um ou dois lipídios, elas agrupam uma variedade de lipídios (nos quais são mudados os grupos funcionais das cabeças, o comprimento da cauda, e o nível de saturação das cadeias entre outros fatores), além de proteínas, glicoproteínas, do colesterol e de outras substâncias, por exemplo, pequenos íons, que também poderiam estar presentes. Portanto, o objetivo principal desta tese, *preparar e caracterizar filmes de Langmuir de fosfolipídios misturados a algumas drogas na água pura*, é um primeiro passo para se construir modelos mais sofisticados e mais realistas que possam simular membranas celulares interagindo com moléculas biologicamente ativas.

A tese está organizada da seguinte maneira. No Capítulo 2 são discutidos aspectos fundamentais para a interpretação de isotermas de pressão e potencial de filmes de Langmuir. Não é apresentada nenhuma revisão bibliográfica sobre filmes de Langmuir, uma vez que uma literatura considerável já está disponível em português sobre este tópico, na forma de dissertações e teses de outros membros do Grupo de Polímeros [33, 34].

O Capítulo 3 descreve os procedimentos experimentais para a fabricação e caracterização dos filmes de Langmuir, com ênfase nos cuidados tomados para obter reprodutibilidade dos resultados. Esses cuidados foram essenciais, porque efeitos foram observados para minúsculas quantidades de substâncias na monocamada.

A substância investigada com maior profundidade foi o dipiridamol (DIP) interagindo com DPPC, para o qual nossos resultados de pressão e potencial de superfície podem ser correlacionados com medidas de espectroscopia de infravermelho e microscopia de fluorescência, realizadas por colaboradores. Os resultados e discussão para o DIP são apresentados no Capítulo 4, em que se introduz o conceito de cooperatividade entre moléculas do fosfolipídio, induzida pela interação com o DIP. Este conceito acabou por ser fundamental, uma vez que todas substâncias investigadas apresentaram resultados - a baixas concentrações - que só podem ser explicados a partir de cooperação de efeitos. A interação DIP/DPPG também aparece no Capítulo 4.

O Capítulo 5 traz os resultados de interação entre os fármacos CPZ e TFP com os fosfolipídios DPPC e DPPG. As outras duas substâncias investigadas, a saber, melatonina (MEL) e colesterol (COL), têm naturezas diferentes e foram tratadas num capítulo à parte. Alguns resultados de isotermas de pressão e potencial de superfície, entretanto, são semelhantes àqueles obtidos com os fármacos, o que permitiu uma comparação direta com os estudos da cooperatividade entre as moléculas nas baixas concentrações tanto para o COL como para a MEL (Capítulo 6). Os estudos das misturas MEL e fosfolipídios são inéditos. Mas na literatura já foi mostrada uma ampla gama de resultados de preparação de vesículas, bicamadas, monocamadas, entre outros sistemas, das misturas de fosfolipídios e COL. Os resultados obtidos neste trabalho além de verificar o já exposto na literatura, são úteis porque, no intuito de simular membranas biológicas, é sabido que o colesterol faz parte delas e para se chegar a sistemas mais complexos seria adequado partir de sistemas das misturas simples COL/fosfolipídios que seriam usados como referência. Uma outra vantagem deste estudo é que aqui foi usada a área por lipídio como controle para comparar a influência do COL nas membranas modelos do DPPC e DPPG, a concentrações muito baixas, (0,1-0,5), e na literatura não se tem relatos sobre este tipo de tratamentos e interações.

Para finalizar, no Capítulo 7, são feitas as conclusões e propostas de trabalhos futuros.

Capítulo 2

CONSIDERAÇÕES SOBRE MEDIDAS DE PRESSÃO E POTENCIAL DE SUPERFÍCIE EM FILMES DE LANGMUIR

Por *filmes de Langmuir* são comumente denotados os filmes orgânicos finos formados por monocamadas moleculares em uma interface ar-água. Por exemplo, os fosfolípidios¹, moléculas anfifílicas de extrema importância na biologia e na medicina, podem existir como monocamadas superficiais. Além de estudar a natureza das interações químicas, é importante estudar os requisitos físicos para a formação dos filmes de Langmuir. A seguir serão mostradas duas grandezas físicas importantes usadas na caracterização de filmes de Langmuir, as medidas de pressão e potencial de superfície.

2.1 A pressão e potencial de superfície

a) A *pressão de superfície*, denotada por π , é definida como a redução da tensão superficial relativa àquela da água limpa. Esta redução ocorre pela adsorção superficial de moléculas de caráter anfifílico chamadas comumente de monocamadas ou filmes superficiais de Langmuir. Estas moléculas anfifílicas, embora insolúveis como um todo na água, devem possuir uma região hidrofílica que permita sua interação com a camada mais superficial da água.

A pressão superficial, π , é examinada como uma função da área por molécula. Esta característica (conhecida como a isoterma para uma temperatura particular) é facilmente obtida, o que proporciona uma informação útil. A determinação de π é usualmente feita em mNm^{-1} . Para uma superfície plana em equilíbrio, a relação de π , abaixo representada se mantém [33].

$$\pi = \gamma - \gamma_o, \quad (1)$$

em que γ é a tensão superficial na ausência da monocamada e γ_o o valor com a monocamada presente. O valor da tensão superficial da água limpa é de 73 mNm^{-1} e quase todas as moléculas anfifílicas de interesse atingem uma tensão superficial máxima menor que a da água.

¹ Os lípidios são moléculas, de origem biológica, solúveis em solventes orgânicos, mas insolúveis na água.

b) *O potencial de superfície contra a área por molécula.* O potencial de superfície, denotado por ΔV , é definido como a soma de dois termos: o potencial de polarização ΔV_p , que relaciona os momentos de dipolo das moléculas anfifílicas que formam o filme, ou monocamada superficial, incluindo o momento de dipolo devido à camada superficial de hidratação da monocamada, e o termo devido ao potencial superficial da dupla camada elétrica difusa, formada pela superfície do filme carregado e os contra-íons próximos a ela, Ψ_o [35]. Em monocamadas que não têm carga elétrica líquida (por exemplo, lipídios zwitteriônicos como o PC e o PE), Ψ_o é sempre zero. A Fig. 2.1 mostra um esquema de uma molécula anfifílica, uma amina de longa cadeia alquílica, sobre a superfície da água. São induzidas as contribuições das componentes normais dos momentos de dipolo da molécula, e da reorientação das moléculas de água próximas à interface. Os momentos de dipolo das moléculas que formam o filme são: μ_1 devido ao rearranjo das moléculas de água no filme, μ_2 que contribui como a componente vertical do momento de dipolo das cabeças hidrofílicas das moléculas anfifílicas, e μ_3 é a componente vertical do momento de dipolo dos grupos hidrofóbicos das moléculas [36]. A equação para o potencial é dada por:

$$\Delta V = \frac{1}{A \epsilon_o} \left(\frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\mu_3}{\epsilon_3} \right) + \Psi_o, \quad (2)$$

em que A é a área por molécula, ϵ_o é permissividade do vácuo e os ϵ_i , com $i=1,2,3$, são as constantes dielétricas efetivas dos meios nos quais estão inseridos os diferentes dipolos.

O potencial da dupla camada elétrica difusa, Ψ_o , surge de uma distribuição desigual de íons na vizinhança da monocamada adsorvida quando carregada eletricamente. Esta distribuição ou atmosfera iônica é denominada como a dupla camada elétrica difusa de Gouy [37].

Fig. 2.1. Componentes μ_1 , μ_2 , e μ_3 contribuindo no potencial de superfície ΔV_p para uma monocamada eletricamente neutra, as setas para acima e para abaixo na figura indicam que o momento de dipolo pode estar em uma ou outra direção [38].

2.2. Técnicas de medidas

A técnica clássica de preparação e caracterização das monocamadas de Langmuir via isotermas de pressão e potencial de superfície é uma ferramenta bastante útil na obtenção dos filmes finos das misturas de bio-compostos, entre outros materiais anfífilos. A especialização tanto nos fundamentos teóricos como nos experimentais da química de superfícies é requerida para tentar interpretar e entender as propriedades físico-químicas das monocamadas de Langmuir. A preparação de filmes orgânicos finos com um ordenamento estrutural bem delineado, a partir de moléculas biológicas, é útil devido a suas múltiplas aplicações. No presente trabalho, o interesse é descobrir quais são as interações entre as membranas moleculares modelo e algumas substâncias com atividade biológica. Isto porque as membranas celulares apresentam na natureza uma ordem estrutural preferencial e cumprem funções complexas e altamente elaboradas e as drogas se inseridas de forma apropriada nas membranas podem desempenhar de ação farmacológica. O que se faz no laboratório é tentar de uma forma simplificada imitar o comportamento das membranas celulares. Mostraremos a seguir uma descrição detalhada dessas técnicas experimentais.

A subfase usual na preparação dos filmes de Langmuir é água destilada e deionizada que tenha sido recentemente passada através de um filtro multiporoso para remover partículas residuais. Após ser dissolvido em um solvente volátil, o material anfílico é disperso na superfície da água. Embora diferentes tipos de solventes sejam

usados para as distintas classes de materiais, um requisito comum é que o solvente seja pouco miscível na água, já que de outra forma esta tenderia a dissolver o material anfílico parcialmente dissolvido. A velocidade com que o solvente evapora é também importante, uma vez que uma evaporação rápida demais pode levar à presença de defeitos no filme a ser formado.

a) *Pressão de superfície*. Para controlar a pressão superficial se requer uma barreira que intercepte a interface ar-água e possa ser movida para comprimir ou expandir a superfície do filme. Também se requer dispositivo para medir a pressão superficial. Um dos mais bem sucedidos métodos usados neste contexto é o da placa de Wilhelmy, que consiste em uma pequena peça retangular de material hidrofílico (inerte às substâncias depositadas na interface) que intercepta a superfície ar-água e está suportada no braço de uma balança eletrônica, como mostrado na Fig. 2.2. A força exercida é diretamente proporcional à tensão superficial na interface.

b) *Potencial de superfície*. O método do capacitor vibrante [38] é usado para medir o potencial de superfície de monocamadas de Langmuir. Uma corrente alternada é gerada pela vibração (em uma amplitude pequena) de uma placa de ouro ou platina colocada próxima à interface, cuja amplitude é zerada quando uma fonte de tensão variável é ligada a um eletrodo introduzido na subfase da água, como mostrado na Fig. 2.2. A condição de corrente nula implica em que os potenciais da placa de ouro ou de platina e da superfície aquosa sejam então iguais. Depois de confirmado que o potencial na placa é igual ao potencial na superfície limpa da água, o passo seguinte é zerar o sistema e depositar o filme a ser estudado, já que a diferença de potencial, ΔV , medida será a relativa ao filme adsorvido ou espalhado na superfície.

Fig. 2.2. Diagrama esquemático da cuba de Langmuir. 1. Água. 2. Barreiras móveis. 3. Eletrobalança. 4. Placa de Wilhelmy. 5. Prova de potencial. 6. Placa vibrante. 7. Eletrodo.

2.3. *A interpretação de isotermas de pressão contra a área por molécula.*

O gráfico que relaciona a pressão de superfície, π , e a área por molécula, A , registra a isoterma de pressão-área, análogo bi-dimensional da isoterma de pressão-volume quando ocorre a compressão de um gás em um cilindro. A isoterma de pressão de um filme de Langmuir, a partir da compressão, pode apresentar uma variedade de fases. A seguir serão mostradas as isotermas de pressão de dois fosfolípidios: o dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), mostrado na Fig. 2.3 e o dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG), mostrado na Fig. 2.4, que serão empregados no decorrer deste trabalho de tese.

A seguir será apresentado brevemente um paralelo entre as isotermas de pressão do DPPC e do DPPG puros. A área molecular média na monocamada do DPPC puro na fase condensada (40 mN/m) difere da do DPPG, pois as moléculas de DPPC ocupam uma área de cerca de $44 \text{ \AA}^2$ no estado condensado, acima dos $40 \text{ \AA}^2$ para duas cadeias alifáticas. Isto indica que a cabeça hidrofílica afeta a área final, devido à repulsão estérica entre as cabeças, o que não ocorre com o DPPG, cujas moléculas ocupam cerca de $38 \text{ \AA}^2$ no estado condensado, devido à redistribuição de prótons H^+ e de cátions entre a monocamada do lípídio carregado negativamente, que emergem das camadas mais superficiais da água e ainda do volume da subfase aquosa. Esta diferença é consequência da fluidez da monocamada do DPPC [39] e da rigidez da monocamada do DPPG [40,41]. Nos experimentos, foram usados em ambos os casos água pura como subfase.

Fig. 2.3. Isoterma de pressão de superfície para uma monocamada do DPPC puro. Representação esquematizada das fases estruturais de uma monocamada de Langmuir com as diferentes regiões de compressão do filme: Região I: fase gasosa, as moléculas estão muito longe uma da outra, não há interação entre elas e a pressão superficial é zero, até aproximadamente 100 Å^2 . Região II: fase líquido-expandida (LE), as moléculas se aproximam, de tal modo que uma pode sentir sua vizinha mais próxima, mais ou menos entre 100 e 80 Å^2 . Região III: fase líquido-condensada (LC), aqui a proximidade entre as moléculas aumenta e algumas se tocam, aproximadamente entre 60 e 50 Å^2 . A transição da fase LE para a LC se inicia no ponto onde está o *. Devemos destacar que entre 80 e 60 Å^2 ocorre uma coexistência das fases LE e LC. A região IV (mais ou menos entre 50 e 45 Å^2) equivale à fase condensada ou sólida (S) em que as moléculas estão empacotadas de tal modo que se comprimimos um pouco mais a monocamada se rompe e passa a formar outras estruturas, o chamado colapso ou região V, onde o desdobramento do filme pode dar lugar a agregados, dissolução na subfase, bicamadas, multicamadas, etc, a partir de aproximadamente 45 Å^2 . O corte com o eixo x representa a área limite de compressão da monocamada.

Fig. 2.4. Isoterma de pressão de superfície para uma monocamada do DPPG² puro. Representação esquematizada das fases estruturais de uma monocamada de Langmuir com as diferentes regiões de compressão do filme: Região I: fase gasosa, as moléculas estão muito longe uma da outra, não há interação entre elas e a pressão superficial é zero, até aproximadamente 58 Å². Região II: fase líquido-condensada (LC), aqui a proximidade entre as moléculas aumenta e algumas se tocam, aproximadamente entre 58 e 44 Å². A região IV (mais ou menos entre 44 e 38 Å²) equivale à fase condensada ou sólida (S) em que as moléculas estão empacotadas de tal modo que se comprimimos um pouco mais a monocamada se rompe e passa a formar outras estruturas, o chamado colapso ou região V, onde o desdobramento do filme pode dar lugar a agregados, dissolução na subfase, bicamadas, multicamadas, etc, a partir de aproximadamente 38 Å².

Quando as áreas superficiais são grandes, as moléculas espalhadas estão longe uma da outra e interagem principalmente com a subfase. Nesta fase, a *gasosa* (G), as moléculas podem ser consideradas como agrupadas em um gás bi-dimensional. A fase *líquida* (L) ocorre quando as moléculas se aproximam uma da outra e a área por molécula diminui. Dependendo da molécula a ser estudada, podem estar presentes as fases *líquido-expandida* (LE), a compressibilidade é alta, e/ou a *líquido-condensada* (LC), a compressibilidade é menor que no caso LE, mas ainda não temos o empacotamento molecular da fase sólida; ou ainda pode ocorrer uma co-existência das fases LE e LC como mostrado na Fig. 2.3. Para áreas ainda menores, a

² A monocamada do DPPG é altamente rígida, um fato empírico que mostra a rigidez do filme pode ser notado grosso modo na fase do colapso. Aí as moléculas permanecem tão próximas que o papel de filtro usado como sensor de Wilhelmy ao ser tocado com a ponta de uma pinça não se mexe, fica fixo dentro do filme.

compressibilidade da monocamada diminui, e a pressão aumenta rapidamente. Esta é a denominada fase *sólida* (S), própria de um cristal bi-dimensional. O *colapso* ocorre quando o ordenamento cristalino é destruído, a monocamada forma estruturas diferentes daquela monomolecular. Uma linha traçada na região da fase sólida pode ser extrapolada ao eixo x, sendo esta interseção conhecida como a *área limite* da dispersão molecular e representada como a área ocupada por uma molécula que não pode ser mais comprimida em uma monocamada superficial de Langmuir.

2.3.1 Fatores que afetam as isotermas de pressão de superfície

A análise detalhada das forças intermoleculares relevantes para a interação de moléculas anfifílicas, com a água e entre si, fornece subsídios para uma interpretação qualitativa dos possíveis efeitos da incorporação de substâncias nos filmes de fosfolípidios. Ocorre que não há teorias consagradas que possam reproduzir, ou explicar quantitativamente as isotermas de pressão de superfície, mesmo para os compostos mais simples, como os ácidos graxos. De fato, há várias tentativas de adaptar equações de estado [42-50] para reproduzir isotermas de pressão e simulações numéricas [51-60] com o objetivo primordial de justificar transições de fase, como as que ocorrem para o DPPC. Talvez esta lacuna em tratamentos teóricos não devesse surpreender, em face da complexidade das interações.

Obviamente que os efeitos causados por incorporação de substâncias biológicas com filmes de fosfolípidios, objeto da presente tese, também não podem ser tratados quantitativamente. Para uma análise qualitativa, entretanto, vale a pena considerar possíveis consequências de tal incorporação, primordialmente com relação à expansão ou condensação de um filme de Langmuir.

Para um composto tradicional, como o ácido esteárico, a contribuição mais importante para a pressão de superfície medida é a repulsão estérica entre as caudas, uma vez que o filme é bastante condensado – ou seja, a pressão de superfície só começa a aumentar significativamente para pequenas áreas por molécula, em cerca de $25 \text{ \AA}^2$. Isso significa que não há interações de longo alcance contribuindo para a pressão, que só aumenta consideravelmente quando se aproxima da área mínima (de máximo empacotamento) ocupada por uma cauda ($20 \text{ \AA}^2$). A isoterma para o ácido oléico, ácido carboxílico com uma ligação dupla no início da cauda hidrofóbica, próximo do COOH , por outro lado, é consideravelmente mais expandida, uma vez que a pressão de superfície deixa de ser nula para áreas superiores a $40 \text{ \AA}^2$. Isto se deve às interações de

mais longo alcance entre o grupo levemente polar introduzido pela ligação dupla com as moléculas da água. Efeitos ainda mais drásticos, com pressões não nulas para áreas superiores a $100 \text{ \AA}^2$ em compostos com uma única cadeia hidrofóbica, são observados em casos em que um grupo polar, como um sulfóxido, é colocado no final da cadeia [33].

Uma outra possibilidade para obter um filme bastante expandido é empregar compostos em que as cabeças estejam fortemente ionizadas, como é o caso das aminas [38]. Aqui, uma contribuição importante para a pressão de superfície advém da repulsão eletrostática entre as cabeças, que pode ser relacionada à dupla camada [38]. Note, entretanto, que filmes de ácidos graxos ionizados não são muito expandidos porque as cabeças ocupam uma área relativamente pequena comparada à ocupada pela cauda e, portanto, não se aproximam suficientemente para gerar um efeito grande de repulsão. Concluindo, se a repulsão eletrostática predominar, deve-se esperar que um filme fique mais expandido à medida que sua carga aumenta. Isso não ocorre para o DPPG principalmente porque as cabeças hidrofílicas carregadas negativamente não são impenetráveis como supõe o modelo de GC (Modelo de Gouy-Chapman). Elas permitem a presença de prótons H^+ ou ainda de alguns cátions provenientes da subfase (não podemos garantir que a água seja tão pura tal que alguns cátions não possam estar presentes no volume aquoso) próximos às cabeças do lipídio ou entre elas e as forças não são eletrostáticas repulsivas, senão eletrostáticas atrativas. A presença de íons entre as cabeças do lipídio propicia uma atração muito forte entre as moléculas que constituem a monocamada do DPPG e por isto ela é altamente condensada, como mostrado na Fig. 2.4.

Já a inserção de substâncias num filme de Langmuir pode trazer efeitos variados, dependendo da localização da substância e também de se elas estão carregadas negativas ou positivamente, ou se são neutras no pH da água. A maioria dos filmes tradicionais, como o DPPG e em larga medida o DPPC, tem sua área – no estado condensado – ditada pelas caudas. É por isso que as áreas por molécula sob altas pressões são em geral múltiplos de $20 \text{ \AA}^2$ (para compostos de uma única cadeia a área por molécula na fase condensada é de $20 \text{ \AA}^2$, para um lipídio de cadeia dupla esta área passa a ser da ordem de $40 \text{ \AA}^2$). Assim, se uma dada substância é inserida na região das caudas de um filme de lipídio, deve-se esperar que a área por molécula de lipídio aumente (o filme se expande). Se a incorporação se der nas vizinhanças do grupo polar, é mais difícil prever os resultados. Tanto a incorporação pode gerar um aumento de área

por lipídio ou simplesmente não afetar esta área. Uma outra possibilidade é que a incorporação da substância afete as próprias interações entre as moléculas do lipídio, e neste caso até mesmo uma condensação do filme pode ocorrer (isto é, a área por molécula de lipídio diminui na presença da substância).

A transição de fase LE-LC que ocorre em um filme de Langmuir do DPPC (uma molécula que possui 16 carbonos em cada uma das suas duas cadeias hidrofóbicas) é simplesmente resultado de um gasto maior de energia para chegar à região sólida do filme. Isto porque tanto o DPPC como o DPPG possuem partes hidrofóbicas iguais, mas o DPPC é um lipídio neutro, enquanto o DPPG é um lipídio carregado negativamente na água pura e experimenta forças atrativas muito grandes, ele atrai contra-íons. Neste caso o gasto de energia necessário para aproximar as moléculas carregadas é menor. Quando a isoterma do DPPG é feita em uma concentração salina o formato da curva passa a ser igual ao formato da curva do DPPC, isto é, aquela transição de fase LE-LC aparece. Isto quer dizer que o sal neutraliza o lipídio inicialmente aniônico? A resposta é SIM, como será mostrado nos parágrafos seguintes.

O DPPG interage mais com a água (isto por possuir carga no pH da água) e alguns íons logram inserir-se na matriz do lipídio, e por isso a monocamada é altamente condensada. É o chamado efeito de protonação do DPPG, pelo surgimento da dupla camada de contra-íons difusos. Já a interação do DPPC se limita às ligações de hidrogênio, não existe nem perda nem ganho de íons na interface, e sim um alinhamento molecular que não permite o domínio das forças atrativas sobre as forças repulsivas e o lipídio é fluido. Portanto, já que as moléculas do PC são neutras não vão querer ficar muito próximas umas das outras e o gasto de energia tende a aumentar quando a compressão aumenta.

A região polar, na qual estão localizadas as cabeças dos lipídios, constituem uma interface entre o volume da fase aquosa e as cadeias de hidrocarbonetos do lipídio, como mostrado na Fig. 2.5. Nesta região, a ionização dos lipídios, e em certos casos a adsorção de íons por parte da cabeça hidrofílica, gera um potencial eletrostático, que somado aos potenciais de polarização ligados às estruturas químicas das cabeças e à camada de hidratação da parte mais superficial da água modula a concentração iônica de prótons, cátions e ânions com respeito àqueles do volume da fase aquosa [35].

Fig. 2.5. Representação esquematizada de um arranjo de moléculas de fosfolípidios aniônicos ionizados em uma membrana modelo em contato com uma subfase água/sal composta de íons univalentes. As espécies carregadas perto da membrana modelo correspondem a uma distribuição positiva, próton (H^+) e cátions (M^+), e negativa (A^-). Deve ser destacado que na camada da interface, as cargas positivas e negativas são compensadas umas às outras com exatidão, o sistema como um todo é neutro [35].

- *Ionização de fosfolípidios.*

Para qualquer ácido e base em uma solução em água, o estado de ionização de vários grupos ionizáveis que formam parte dos fosfolípidios (fosfatos, aminas, carboxílicos), pode em princípio ser descrito por um equilíbrio de ionização caracterizado por uma dada constante de dissociação. No entanto, existem grandes diferenças entre o comportamento de um grupo ionizável quando está no volume da água ou quando está localizado na superfície da membrana do lípido. Na interface plana, os lípidios formam um arranjo de grupos ionizáveis que interagem conjuntamente devido às interações eletrostáticas [61], e também através de uma cadeia de ligações de hidrogênio [62] que incluem as moléculas de água que estão envolvidas na hidratação das cabeças polares do lípido. Como ilustrado na Fig. 2.5, a ionização das moléculas do lípido gera cargas eletrostáticas (negativas ou positivas) e, portanto, um potencial de

superfície eletrostático, Ψ_0 , (negativo ou positivo) que por sua vez traz uma redistribuição de prótons, cátions e ânions na interface água-lipídio.

Como as cargas são discretas, o campo elétrico gerado por cada carga individual é perpendicular e paralelo ao plano da interface. Assim, qualquer grupo ionizável na interface deverá experimentar o campo elétrico gerado por seus vizinhos mais próximos, que levam uma carga igual ou oposta. Esses grupos ionizáveis interagem através de uma força de Coulomb de blindagem que pode se estender sobre muitas camadas de vizinhos mais próximos [63] em uma forma que depende do sinal e do número de cargas por moléculas do lipídio e/ou do conteúdo iônico da solução que os rodeia.

Além disso, a interface água/lipídio representa uma divisória entre uma fase aquosa de alta constante dielétrica e uma fase, própria dos alquenos, formada pelas cadeias alquílicas do lipídio, de uma constante dielétrica muito baixa (como foi visto nesta seção parte I (e)). Devemos enfatizar que a constante dielétrica da água na região da interface é estimada em torno entre 6 e 8. Os cátions e ânions absorvidos no grupo ionizável do lipídio propiciam uma alteração na densidade superficial de carga e, portanto, no potencial eletrostático, Ψ_0 . [64]. Existem relatos na literatura [65] de que o DPPE na presença do colesterol fica carregado negativamente, isto poderia ser facilmente verificado, via um filme de Langmuir misto COL/DPPE variando a concentração de sal na subfase.

- *Interação entre íons e lipídios carregados na interface água-ar.*

A monocamada do DPPG, que é um lipídio carregado negativamente, poderia passar a ser neutra pela presença na interface de íons de carga oposta (a TFP, a CPZ, e o DIP são moléculas catiônicas (contra-íons)). Isto poderia ocorrer se no filme misto for colocada a quantidade certa de droga de tal forma que a carga líquida total na interface seja zero (a somatória das cargas [lipídio carregado negativamente+droga catiônica+prótons da água]=0). As isotermas de pressão de superfície de Langmuir destas misturas dão a resposta da neutralização do lipídio. Quando o formato da curva π -A de um lipídio carregado negativamente, como o DPPG, deixa de ser condensado e passa a ser expandido está ocorrendo um balanço de cargas na interface. A neutralidade pode ocorrer quando o balanço dá zero e temos um máximo de expansão. Sempre que o balanço seja de uma carga líquida positiva ou negativa o lipídio passa a ser condensado. Mas aqui devemos estar atentos à idéia do que significa ter uma superfície carregada

negativa ou positivamente: De novo tomamos o DPPG, que na água pura fica carregado negativamente, porque ainda que alguns contra-íons provenientes do volume da água se aproximem ou se liguem na superfície, a somatória total da carga líquida é negativa. A força atrativa de Coulomb entre as cargas faz-se evidente neste caso. Sacré e col. [66] fizeram isotermas do DPPG, na água pura e mudando o conteúdo iônico da subfase. Seus resultados mostraram que na água pura o DPPG era altamente condensado, mas à medida que aumentava a concentração salina na subfase o PG tendia à neutralidade pela presença dos prótons e cátions próximos ou ligados à interface. Em uma certa concentração salina a isoterma do DPPG era igual, no formato, à isoterma do DPPC (lipídio neutro). A conclusão óbvia era a de que a carga total na interface lipídio/água era zerada. Mas Sacré e col. [66] aumentaram a concentração salina e a isoterma resultante voltou a ser condensada, portanto, a conclusão era a de que o lipídio passou novamente a ser carregado e neste caso com uma carga líquida positiva.

2.4 Como as isotermas de potencial de superfície podem ser afetadas

A Fig. 2.6 ilustra uma isoterma de potencial de superfície para uma monocamada de DPPC, da qual distinguimos as seguintes características, onde no eixo x é medida a área por molécula, e no eixo y, o potencial resultante da compressão do filme. Para grandes áreas por molécula o potencial é nulo, ou seja, a monocamada não afeta o valor medido para a subfase aquosa (água pura neste caso). Numa determinada área, chamada área crítica, cujo valor é reprodutível dentro de alguns $\text{\AA}^2$, há um aumento abrupto do potencial que cresce monotonicamente à medida que a monocamada é comprimida, inclusive com um novo aumento menos abrupto que termina em um ponto que coincide com a transição de fase LE/LC (como mostrado na Fig. 2.6, o ponto está marcado pelo círculo vermelho). Por motivos explicitados adiante, ainda não é possível tratar quantitativamente esta curva de potencial, nem mesmo para o estado condensado, de máximo empacotamento para o qual a organização da monocamada fornece bons indícios da orientação das moléculas.

Fig. 2.6. Isoterma de potencial de superfície do DPPC puro. Mudanças de fase. O ponto em vermelho corresponde à transição de fase LE-LC. A subida da curva corresponde à área crítica quando a monocamada começa a ser formada.

Fig. 2.7. Isoterma de potencial de superfície do DPPG puro na interface água-ar.

A diferença da isoterma de potencial do DPPC, a do DPPG, ver Fig. 2.7, mostra outras características completamente diferentes. O potencial de superfície é negativo para áreas por molécula grandes, é dizer na fase “gasosa” da monocamada superficial. Isto se deve a que o lipídio é negativamente carregado, à ação da dupla camada elétrica difusa. Quando a monocamada passa a ser compactada, a transição entre a fase “gasosa” e a “condensada” é quase que imediata e não como no caso do DPPC onde antes de chegar na região sólida, o filme passa por diferentes fases de

reordenamento estrutural. O potencial sobe e passa a ser positivo porque ainda que as moléculas do filme sejam negativamente carregadas a proximidade entre elas propicia outro tipo de interações dipolo-dipolo, ou íon-dipolo quando alguns íons pequenos de carga oposta são atraídos pela presença da carga negativa do DPPG.

Abriremos aqui parênteses para discutir o potencial de monocamadas de moléculas mais simples, tais como um ácido graxo que possui uma pequena cabeça (COOH) ligada a uma cauda longa de hidrocarbonetos. Esta monocamada é passível de ser tratada com o modelo de Demchak e Fort (DF) [36], segundo a Equação 2, como o fez Oliveira et al. [67]. No estado condensado as moléculas têm suas caudas orientadas perpendicularmente à superfície da água, o que permite prever possíveis conformações do grupo COOH, e conseqüentemente estimar a contribuição μ_2 , i.e. a componente normal do momento de dipolo da cabeça, o que também pode ser feito para a contribuição μ_3 da cauda, que é essencialmente advinda do grupo terminal CH₃. Com a comparação com os resultados de outros compostos, é possível determinar valores médios para as constantes dielétricas ϵ_2 e ϵ_3 , e para a contribuição da reorientação de moléculas de água da subfase, μ_1/ϵ_1 , que é sempre tomado como parâmetro de ajuste. Como já mencionado, ao empregar um conjunto de parâmetros em que $\mu_1/\epsilon_1 = -65$ mD, $\epsilon_2 = 6,4$ e $\epsilon_3 = 2,8$, o potencial de superfície de um filme de ácido esteárico pode ser relacionado ao momento de dipolo da molécula.

Na ref. [68], Oliveira et al. também empregaram o modelo DF para explicar o formato da curva de potencial. Uma análise crítica das possíveis razões para o aumento abrupto na área crítica, que também ocorre para o ácido esteárico, assim como para os filmes de Langmuir de todos os compostos anfífilicos já testados e mesmo muitos não anfífilicos, levou Oliveira et al a concluir que tal aumento está relacionado a uma diminuição drástica na constante dielétrica da interface cabeça hidrofílica-água, que passaria de um valor bastante alto (por exemplo, próximo da constante dielétrica da água) para o valor de 6,4 que é estimado no estado condensado. Essa diminuição drástica foi relacionada, no nível molecular, à formação de uma rede de ligações de hidrogênio, que traz modificações consideráveis não só para o potencial como para a condução em filmes de Langmuir [69]. Uma interpretação alternativa para o aparecimento da área crítica, empregando argumentos na escala mesoscópica, é de que tal área corresponde à densidade de agregados em que se formam ilhas suficientemente grandes para serem detectadas pela prova de potencial, que tem dimensões

macroscópicas, de alguns cm^2 . Ou seja, acima da área crítica, a prova de potencial detectaria apenas a subfase, pois são pequenos os domínios que se sabe, a partir de microscopia no ângulo de Brewster [70], serem formados mesmo para áreas por molécula muito grandes.

Retornando para o caso do DPPC, também pode ser empregada a explicação para a observação de uma área crítica. Entretanto, a análise quantitativa do potencial medido não é possível porque são muitos os grupos na cabeça hidrofílica que podem contribuir para a componente normal do momento de dipolo. De fato, uma inspeção visual da fórmula estrutural do DPPC (Fig. 2.10) indica que as carbonilas e o dipolo iônico (zwitterion) podem exercer um papel preponderante. Há evidências na literatura [71] de que são as carbonilas os principais contribuintes, mesmo porque se acredita que o dipolo iônico esteja paralelo (ou quase) à superfície da água, orientação mais favorável energeticamente, e, portanto, não contribuiria para o potencial. Entretanto, a partir da avaliação do potencial de superfície de alguns fosfolípidios zwitteriônicos, Oliveira [33] concluiu que uma pequena contribuição do dipolo iônico não pode ser descartada, principalmente porque o momento de dipolo do dipolo iônico é de aproximadamente 20D, comparado com os valores costumeiros, da ordem de 1D, para os grupos polares. Uma outra dificuldade para o emprego do modelo DF é que a constante dielétrica do meio no qual estão embebidos os grupos polares pode não ser a mesma para as carbonilas e para o dipolo iônico, uma vez que este está inserido mais profundamente na subfase aquosa.

Conclui-se, portanto, que não podemos esperar ser capazes de analisar quantitativamente os resultados de potencial de superfície apresentados nesta tese, pois trataremos apenas de filmes de fosfolípidios, DPPC e DPPG. O que pode ser feito, todavia, são análises comparativas dos efeitos causados pela incorporação de substâncias biológicas e drogas. A seguir, alguns cenários são traçados para os possíveis efeitos nos potenciais de filmes de DPPC e DPPG. Começando com o DPPC que, sobre água pura, é neutro, e assim não apresenta dupla-camada elétrica. A incorporação de substâncias biológicas pode trazer os seguintes efeitos:

i) se as moléculas biológicas forem carregadas, como é o caso de algumas investigadas aqui, sua adsorção ao filme de Langmuir pode deixá-lo parcialmente carregado e assim haverá uma contribuição adicional da dupla-camada. Esta contribuição será positiva,

aumentando o potencial de superfície do DPPC, se a substância for positivamente carregada.

ii) como as substâncias empregadas também têm momento de dipolo, elas podem ter sua própria contribuição para o potencial de superfície, que dependerá da orientação delas, uma vez que só conta a componente normal à superfície da água. Tal contribuição poderá ser positiva ou negativa, e dependerá, também, da localização das moléculas da substância, pois há um gradiente da constante dielétrica efetiva para as diferentes partes do filme. Ou seja, uma molécula inserida na parte hidrofóbica do filme contribui mais para o potencial do que se estiver próxima à cabeça polar, pois esta última está num meio de maior constante dielétrica.

iii) as contribuições i) e ii) obviamente só serão significativas quando houver uma concentração apreciável de moléculas da substância biológica, a não ser que de alguma maneira sua presença, mesmo que em quantidades pequenas, possa afetar a componente normal do momento de dipolo das moléculas de DPPC. Ainda assim, como a concentração é baixa, poucas moléculas de DPPC seriam diretamente afetadas, e grandes alterações no potencial de superfície só ocorreriam se houver um efeito cooperativo entre as moléculas de DPPC. Como será mostrado no Capítulo 4, esta possibilidade acaba se confirmando.

Para os filmes de DPPG, as considerações ii) e iii) acima também se aplicam. Entretanto, como o DPPG é aniônico sobre água pura, ele já contém uma contribuição negativa da dupla camada. A incorporação de substâncias carregadas então alterará a densidade superficial de carga efetiva do filme, e com isso a contribuição da dupla camada. No caso de adsorção de moléculas positivamente carregadas, a carga superficial diminuirá, com a conseqüente diminuição da contribuição negativa da dupla-camada, fazendo com que o potencial de superfície medido aumente.

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais empregados

O DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina), o DPPG (dipamitoil fosfatidil glicerol, sal de amônia), o COL (colesterol), o DIP (dipiridamol), a CPZ (clorpromazina), a TFP (trifluoperazina), e a MEL (melatonina), fornecidos pela *Sigma Chemical Corporation*, foram utilizados como recebidos, assim como o clorofórmio com grau espectroscópico para cromatografia (da Mallinkrodt) e o metanol da Merck.

Procedimento

Uma massa de 2,5 mg de DPPC (M. M: 734) foi dissolvida em 5 mL de clorofórmio para gerar uma solução de 0,5 mg/mL ($6,8 \times 10^{-4} M$). Na Tabela 1 são mostradas as massas molares e as concentrações em mg/mL para quantidades equimolares¹ ao DPPC dos compostos restantes usados na preparação dos filmes de Langmuir. Para compostos anfifílicos (por exemplo, DPPC, DPPG, e COL), isto é, que possuem moléculas com uma extremidade atraída pela água (cabeça hidrofílica) com tendência à solvatação, e uma outra repelida pela água (cauda hidrofóbica), a tensão superficial da água (73 mN/m) favorece o espalhamento de películas sobre a superfície e a conseqüente formação de um filme molecular de Langmuir [72]. Na Fig. 3.1 são apresentadas as estruturas moleculares dos fosfolipídios DPPC e DPPG, e na Fig. 3.2 as estruturas da MEL, DIP, CPZ, TFP, e COL.

Composto	Massa molar	Concentração (mg/mL)
DPPG	740	0,5
MEL	232,2	0,16
COL	386,7	0,26
TFP	480,42	0,33
CPZ	355,3	0,24
DIP	504,6	0,34

Tabela 1. Massas molares e concentrações em mg/mL das drogas e biomoléculas empregadas na preparação das soluções usadas na obtenção das isotermas de pressão e potencial de superfície das misturas DPPC e DPPG.

¹ Duas soluções são equimolares se cada uma delas tem o mesmo número de moléculas em um volume fixo predeterminado.

Fig. 3.2. Estrutura molecular do DIP, TFP, COL, CPZ e MEL. O COL é a única molécula não solúvel na água. O DIP, a CPZ e a TFP são protonadas na água. A MEL e o COL são neutros.

Os filmes de Langmuir foram produzidos em uma cuba KSV 5000, com subfase de água ultrapura obtida de um sistema de purificação de água MILLI-Q UV PLUS. A temperatura da subfase é controlada por um sistema controlador com banho de circulação da Neslab, série RTE. Todas as isotermas foram efetuadas com a temperatura sob controle, em torno de 22°C, valor abaixo da temperatura de transição de fase dos fosfolipídios que é de 41°C [73].

No presente caso, pelo fato de utilizar concentrações em moles muito baixas das misturas biomoléculas/lipídios os procedimentos de limpeza foram muito rigorosos. Todas as vidrarias foram cuidadosamente esterilizadas. A limpeza da superfície interna da cuba centrossimétrica e das barreiras do sistema KSV foi feita por meio de lenços de papel embebidos em clorofórmio. Um processo, padrão e rigoroso, para a limpeza da cuba é descrito a seguir: Um banho é mantido à temperatura de 30°C, durante aproximadamente duas horas, trocando a água da cuba duas ou três vezes nesse intervalo, antes de iniciar as medidas. Fazendo uma compressão ou expansão da superfície limpa da subfase, sem espalhar as amostras, se após a varredura, a pressão e o potencial superficiais permanecerem constantes e muito próximos de zero teremos certeza de que a água está limpa. Caso contrário, usamos outro método de limpeza simples, que consiste em aspirar as partículas estranhas com um tubo capilar de plástico aderido a uma bomba aspiradora [72].

As medidas de pressão dos lipídios puros e das misturas foram realizadas empregando o método de Wilhelmy, em que a placa de Wilhelmy é um retângulo de 2cm x 1cm de papel de filtro, colocada em posição paralela às barreiras. As medidas de potencial foram realizadas usando o método da placa vibrante (frequência $\nu = 300$ Hz) com uma prova Kelvin da KSV, com o eletrodo de referência e a placa vibrante feitos de platina. Como as monocamadas de Langmuir de fosfolipídios são sensíveis a pequenas mudanças na temperatura [74], para obter resultados reprodutíveis colocamos um banho controlador [75] da temperatura na cuba de Langmuir, usando uma temperatura de 22°C, em todos os nossos experimentos. Colocamos na cuba 1000 mL de água ultrapura extraída de um sistema purificador [76] (Milli-Q) que garante alta qualidade à água usada nos experimentos. A resistividade final da água foi de 18,2 M Ω cm. Finalmente, depois de ter passado por um processo rigoroso de limpeza a cuba está pronta para começarmos os experimentos: as isotermas de pressão e as de potencial.

Procedimentos para a realização dos experimentos: O elevador do KSV é movido para mergulhar o papel de filtro aderido à balança eletrônica (deixando aproximadamente 2/3 da sua área dentro da subfase de água), e a prova de potencial é posicionada tal que a placa vibrante deva ficar a uns poucos milímetros da superfície da água. A seguir os valores da tensão e do potencial são zerados no mostrador do sistema de medida. No passo seguinte, a solução é espalhada na subfase com uma microseringa calibrada de 0 a 100 microlitros (μL)^{*}, no caso de depositar um só composto. Para fazer as misturas de dois ou mais materiais são empregadas duas ou mais seringas, uma para cada amostra. Os compostos são misturados nas suas devidas proporções, em um tubo volumétrico, previamente esterilizado e lavado com clorofórmio. Só então a nova solução é espalhada, empregando uma seringa. É interessante ressaltar que essas misturas são preparadas na hora de espalhar, a partir das soluções originais. *Para todos os sistemas estudados neste trabalho foi seguido o mesmo procedimento de preparação.* A seguir mostraremos um exemplo genérico para as misturas DIP/DPPC: para preparar as misturas DPPC90%+DIP10%, procede-se assim: um volume de 10 μL da solução do DIP é adicionado em 90 μL do DPPC, e a solução homogeneizada é espalhada na subfase. Para concentrações muito pequenas, em torno de 0,2% em mol do DIP, um volume de 0,4 μL do DIP é misturado a 200 μL do DPPC, e de imediato uma microseringa com 100 μL desta solução é depositada na interfase. Para se ter o controle adequado da dispersão das soluções na subfase, comumente, antes de se aplicar a gota seguinte, deixa-se evaporar o solvente (neste caso clorofórmio) que ainda resta da gota anterior [77, 78]. Assim que as misturas são preparadas, faz-se uma média das massas molares dos diferentes compostos.

No caso do DPPC90%+DIP10%, o cálculo da massa molar média foi feito sabendo-se que as soluções dos compostos originais são equimolares:

$$734 \bullet \frac{90\%}{100\%} + 504.6 \bullet \frac{10\%}{100\%} = 711.02.$$

Colocando-se a massa molar média da mistura e o volume total da solução nos parâmetros experimentais, a isoterma resultante será calculada em termos da área total do sistema analisado.

* Para preparar as soluções do DPPG usamos uma mistura de 9:1 de clorofórmio: metanol, para os demais compostos foi usado só o clorofórmio como solvente.

Fig. 3.3 - Duas isotermas de pressão e potencial para o DPPC, pura, preparadas em diluções diferentes e com soluções novas.

As isotermas de pressão e potencial superficial foram as principais medidas realizadas, e foram feitas para todos os sistemas. Algumas medidas de histerese também foram efetuadas, mas apenas com o intuito de se verificar a estabilidade das monocamadas. No caso específico das *isotermas de pressão*, conhecendo-se a posição onde ocorre o colapso, seleciona-se como uma condição inicial uma pressão alta como valor limite tal que este não possa ser ultrapassado. Estipula-se então cada valor correspondente às velocidades das barreiras (de adiantamento e retrocesso) que possibilitam a formação de monocamadas de boa qualidade. As velocidades de adiantamento e retrocesso das barreiras são de 10mm/min. Os intervalos das medidas, ou seja, os valores entre os quais devem variar a pressão e o potencial, também devem ser especificados como parâmetros iniciais nas medidas. Por fim, o experimento é iniciado movimentando as barreiras até que a monocamada atinja o colapso [79].

Antes de dar sequência à análise de resultados é pertinente explicar que medidas das isotermas de pressão e potencial de cada lipídio e das misturas são altamente reprodutivas, para exemplificar serão mostradas, na Fig. 3.3, duas isotermas de pressão e de potencial do DPPC puro, e na Fig 3.4, duas do DPPG, as duas isotermas para cada lipídio foram feitas em épocas e com soluções diferentes.

Fig. 3.3. Duas isotermas de pressão e potencial para o DPPC puro, preparadas em datas diferentes e com soluções novas.

Fig. 3.4. Duas isothermas de pressão e potencial do DPPG puro, preparadas com soluções novas e em idades diferentes

Quando o DPPG é espalhado sobre a água ele adquire uma forma altamente condensada, e não apresenta a transição de fase LE-1C, jáas se são introduzidas mudanças no ambiente, introduzindo-se um agente tensoativo (Fig. 3.5). Quando a concentração é aumentado (uma subfase básica é colocada) [105], então o formato da isoterma passa a ser similar ao do DTPC puro. As isothermas de pressão do DPPG em água obtidas neste trabalho, conforme Fig. 3.4, então em boa concordância com os resultados mostrados na Fig. 6.30. Na literatura temos um grande número de referências da isoterma de pressão do DPPG, ver por exemplo [39]

Fig.3.5. Isothermas de pressão do DPPG puro. (—) em água pura, (.....) em 1mM de NaCl, (-----) em 2mM de NaCl [105]

Capítulo 4

MISTURAS DIP

Para estabelecer uma conexão entre os mecanismos moleculares e a atividade fisiológica se requer um trabalho substancial em vários níveis. Devido à complexidade dos sistemas celulares, tenta-se obter informações investigando a interação de fármacos com membranas modelo. Neste contexto, as monocamadas [80, 81] são sistemas modelo de membranas biológicas bem fundamentados [82-84] assim como também a subfase aquosa que circunda a interface do lipídio. Por exemplo, as interações no nível molecular do dipalmitoil fosfatil colina (DPPC) com o DIP e com alguns dos seus derivados que diferem na sua hidrofobicidade já foram estudadas (as interações) pelas isotermas de pressão (π) e potencial (ΔV) superficiais [83, 85] como uma função da área molecular, A , de tais sistemas. Neste trabalho, foram combinadas refinadas medidas de π - A e ΔV - A com os resultados de microscopia de fluorescência e espectroscopia no infravermelho FTIR de reflexão-absorção *in situ*¹ para avaliar a associação do DIP com monocamadas do DPPC particularmente a baixas concentrações, demonstrando assim a alta afinidade da droga com a superfície da membrana e estimando sua localização com respeito à monocamada do lipídio.

Também serão estudadas neste Capítulo as isotermas de pressão e de potencial superfície para as misturas DIP/DPPG. As ligações moleculares entre o DIP e o DPPG são diferentes. Já que as membranas biológicas estão freqüentemente carregadas, se sabe que dependendo das concentrações das espécies carregadas e do conteúdo iônico dos meios que as rodeiam deverá ser gerada uma dupla camada de contra-íons ou cátions que muito bem poderiam ficar inseridos na matriz do lipídio ou próximos às espécies carregadas do fosfolipídio.

¹ Os resultados de microscopia de fluorescência e de FTIR foram realizados na Alemanha pelo doutorando Wilker Caetano do Instituto de Química de São Carlos como parte do seu trabalho de tese. Aqui serão mencionados para corroborar a interpretação das nossas medidas de pressão e potencial superficiais.

4.1. MISTURAS DIP/DPPC

A. Isotermas de pressão de superfície

Da Fig. 4.1 pode-se destacar que à medida que aumentamos a concentração de DIP a curva vai sendo deslocada para a região de área molecular média menor. O principal interesse desta parte do trabalho é o de estudar como o DIP se incorpora na monocamada do lipídio. Portanto o uso de um artifício matemático se faz necessário para permitir a comparação entre a isoterma do DPPC puro e as isotermas das misturas DIP/DPPC nas diferentes concentrações em moles. A curva do lipídio puro será usada como referência, e as curvas das misturas serão modificadas fazendo uma correção da área total para a área por lipídio. Logo, se nas curvas da Fig. 4.1 usávamos a massa em mol média da mistura e o volume total espalhado na interface, na Fig. 4.2 usaremos a massa em mol e o volume por DPPC puro. Por exemplo, para a mistura DIP10%+DPPC90%, na Fig. 4.1 foi empregada a massa em mol média: $504,6 \times 0,1 + 734 \times 0,9 = 711,026$ g/mol, e o volume total depositado=100 μ L. Já nas curvas corrigidas para área por lipídio foram usadas a massa em mol do DPPC, 734 g/mol, e o volume do DPPC, 90 μ L. Esse artifício só modifica a área por molécula, sem afetar a pressão superficial.

Fig.4.1. Isotermas de pressão superficial das misturas DIP/DPPC, área molecular média total.

Para se compreender melhor quais seriam os resultados que poderiam ser obtidos com essas correções, vejamos os três casos hipotéticos:

1. Se a isoterma resultante da correção fosse igual à isoterma do DPPC ocorreriam dois comportamentos possíveis: a) as moléculas de DIP se ligariam por baixo nas moléculas do DPPC, ou b) as moléculas de DIP iriam para a subfase e só teríamos DPPC na interface.
2. A área das isotermas corrigidas seria deslocada para uma região de área molecular média maior com respeito à área do DPPC puro, e nesse caso ocorreriam duas opções: a) o DIP se incorporaria na camada do lipídio, ou b) o DIP criaria uma repulsão entre as moléculas de DPPC, e por isso a área molecular média aumentaria.
3. A área das isotermas corrigidas seria deslocada para uma região de área molecular média menor com respeito à do DPPC puro, e neste caso poderia ocorrer: a) uma condensação² do filme. As moléculas de DIP propiciariam uma força atrativa entre as moléculas do lipídio e por isso a área por molécula ficaria menor, ou b) as moléculas de DIP iriam todas para a subfase e levariam consigo algumas moléculas do DPPC. O que, na verdade, acontece com as curvas das misturas DIP/DPPC, quando a área por lipídio é usada como referência, é que nenhuma das isotermas fica deslocada à esquerda, como mostrado na Fig. 4.2.

Fig. 4.2. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos DIP/DPPC, com a área por molécula de DPPC na abscissa.

² O termo condensação é usado aqui para mostrar como a presença da droga poderia fazer com o que no filme resultante cada molécula (droga/lipídio) ocupasse uma área molecular média menor nas isotermas de pressão quando comparada com a isoterma de pressão do DPPC puro.

Analisaremos o comportamento, no nível molecular, do DPPC quando adicionamos quantidades equimolares de DIP, principalmente as mudanças estruturais da monocamada, influenciadas pela presença da droga. Como parâmetro de referência usaremos as isotermas do DPPC puro, já que este fosfolípido tem sido muito estudado na forma de filmes de Langmuir. Comparamos nossas isotermas de pressão do DPPC com as da literatura [86-87] e estão em boa concordância.

Antes de dar sequência à análise de resultados é pertinente explicar que os resultados das isotermas de pressão de todas as misturas são altamente reprodutivos, para exemplificar serão mostradas na Fig. 4.1* as curvas de três isotermas de pressão para a mistura DIP 0,3% + DPPC 99,7% sendo uma destas a média das outras duas que feitas em épocas diferentes e com soluções diferentes.

As isotermas de pressão das monocamadas mistas DIP/DPPC, mostradas na Fig. 4.2, são ampliadas na Fig. 4.3 para visualizar a região da transição de fase LE-LC. Esta ampliação revela que concentrações minúsculas do DIP nas misturas, tão baixas como 0,2% molar com respeito ao DPPC, condensam³ a monocamada, enquanto para qualquer concentração acima de 0,3% molar a monocamada é re-expandida de tal forma que a 0,4% molar é observada a mesma isoterma que o DPPC puro. Para concentrações do DIP acima de 0,4% molar, a monocamada é mais expandida⁴ que para o filme do DPPC puro. A concentrações mais baixas que 0,2% molar do DIP as isotermas ficam próximas das isotermas do DPPC puro (esses resultados não serão mostrados aqui), isto ocorre nitidamente em uma área de $70 \text{ \AA}^2$. Um outro exemplo é mostrado na Fig. 4.4, em que é feito um gráfico da variação da pressão (π/π_0) contra a concentração do DIP para todas as misturas DIP/DPPC, no ponto da transição de fase LE-LC. A linha preta é usada como controle e equivale a $(\pi/\pi_0) = 1$. Nestas curvas de π/π_0 -versus-concentração, $\pi/\pi_0=1$ significa que a droga não afeta a pressão de superfície do fosfolípido. As duas

³ O termo condensam é usado aqui para mostrar que o DIP faz com que a pressão, na matriz do DPPC, seja abaixada na região da transição de fase LE-LC para as concentrações muito baixas, ou seja, se associa através de interações cooperativas.

⁴ O termo expandida é usado aqui da mesma forma, quando concentrações altas do DIP são misturadas ao DPPC na região do patamar, a pressão devida à presença do DIP é maior que a pressão no caso do DPPC puro.

características principais do patamar neste ponto são: 1) Para altas concentrações, entre 5 e 20%, a pressão aumenta suavemente entre 10 e 20% se comparada à do DPPC puro. Para concentrações baixas, ocorre uma diminuição da pressão, com um mínimo em DIP 0.3%. Quando uma pequena impureza está presente em um sistema formado por um grande número de moléculas, todas elas iguais, podem ocorrer várias coisas. Neste caso, a impureza abaixa o patamar, um indicativo de que a pequena quantidade de DIP interage fortemente. Mais adiante nesta seção será discutida a interação do DIP com o DPPC.

Fig. 4.3. Ampliação da Fig. 4.2 na região da transição de fase LE-LC.

Fig. 4.4. Variação da pressão de superfície no ponto da transição de fase LE-LC para as misturas DIP/DPPC.

A presença do DIP não afeta a pressão de colapso da monocamada. Depois de fazer diversas isotermas tanto do DPPC puro como das misturas com a droga, notamos que em 46 mN/m invariavelmente começa o colapso na monocamada, como mostrado nas Figs. 4.1 e 4.2. Na Fig.4.5 são apresentadas: a isoterma de pressão do DPPC puro e a curva da velocidade das barreiras ao longo da compressão da monocamada, podemos destacar que em 46 mN/m o movimento das barreiras deixa de ser totalmente uniforme e passa a ser oscilante, a monocamada depois de muita compactação perde a sua característica homogênea e forma outras estruturas diferentes. Em todos os experimentos no final a água transborda da cuba (como mostrado no Capítulo 2), ou seja, as moléculas escapam do espaço restrito que são obrigadas a ocupar. Para ratificar este resultado comparamos as isotermas de pressão e potencial do DPPC, o colapso evidente na curva de potencial começa invariavelmente em 46 mN/m, como mostrado na Fig. 4.6. Olhando com detalhe as Figs. 4.1 e 4.2 pode ser notado como a forma das monocamadas sofre uma mudança em 46 mN/m para quase todas as isotermas, exceção feita para as misturas a 15% e 20% onde o colapso não é atingido, devido à posição final das barreiras.

Fig. 4.5. Isotherma de pressão de superfície e curva da velocidade das barreiras (10 mm/min) para o DPPC puro, onde é mostrado o ponto em que inicia o colapso da monocamada (46 mN/m).

Fig. 4.6. Isotermas de pressão e de potencial de superfície para o DPPC puro, onde é mostrado o ponto em que inicia o colapso da monocamada (46 mN/m).

Influência da presença do DIP na formação da monocamada para diferentes pressões.

Na Fig. 4.7 são apresentadas as curvas A/A_0 (A é a área por lipídio de cada mistura e A_0 é a área do DPPC, a linha preta é usada como controle e equivale a $(A/A_0) = 1$) versus a pressão superficial para cada mistura DIP/DPPC. Nas curvas de A/A_0 -versus-pressão, e A/A_0 -versus-concentração (que serão mostradas mais adiante), $A/A_0=1$ significa que a presença da droga não afeta a área por molécula de fosfolipídio. Estas curvas mostram várias características: Para o DIP20% molar em 10mN/m ocorre a máxima expansão da monocamada de aproximadamente 20%, mas à medida que a compressão aumenta esta expansão diminui, e já em 35 mN/m é praticamente igual à expansão a 2% molar da droga. Em outras palavras, a camada do lipídio expulsa as moléculas do DIP à medida que a concentração aumenta, e são poucas as que ficam quando temos um filme organizado. Para 1% do DIP, o comportamento é similar ao das misturas a concentrações mais altas, mas aqui podemos destacar uma característica crítica da monocamada. Por exemplo, em 10 mN/m a expansão da monocamada começa nesta concentração, mas quando aumenta a compressão, o DIP vai sendo expulso do filme e já em 40 mN/m, não há DIP na monocamada e parece que temos uma perda mínima das moléculas do DPPC. Pelo contrário, no caso das concentrações abaixo de 1%, na fase condensada ou sólida, 40 mN/m, tem-se uma expansão do filme, um indicativo de que as moléculas do DIP se

associam na matriz do lipídio. A seguir serão mostrados os resultados obtidos, a partir da Fig. 4.7, para três pressões diferentes. 1) **Para 1mN/m**, nas concentrações muito baixas, entre 0,2-0,4% molar, se apresenta uma descontinuidade na forma de pico, cuja expansão não é maior que 1,5%. Este pico poderia ser tratado como um erro experimental se não fosse pelo fato de que existe outra medida (microscopia de fluorescência) que mostra que nesta região ocorre um rearranjo estrutural da matriz do DPPC causado pela presença da droga, como veremos mais adiante. Nas concentrações intermediárias 0,5-1% molar, se destaca como uma zona de ajuste, entre as expansões nas baixas e nas altas concentrações. Aqui as isotermas são praticamente iguais à do DPPC puro, dentro do erro experimental. Para concentrações entre 2-15% molar ocorre uma expansão nos filmes que não passa de 2% para uma concentração de 5% molar. Para 20% molar do DIP deve ser ressaltado um aumento pronunciado na expansão que chega a aproximadamente 5%, como mostrado na Fig. 4.8 (curva da razão A/A_0 versus a concentração molar para uma pressão de 1 mN/m).

2) **No ponto da transição de fase LE-LC**, para as concentrações muito baixas, entre 0,2-0,4% molar, ainda está presente a descontinuidade vista nas pressões muito baixas. Neste caso o pico aumenta em porcentagem, e é da ordem de 3%, confirmando, de novo, que este não é resultado de um artefato experimental e sim da ação do DIP na matriz do DPPC. Na concentração intermediária 0,5% molar, a isoterma é praticamente igual à do DPPC puro. De novo esta concentração é definida como uma de transição, mas diferentemente do caso de baixas pressões, esta isoterma está expandida, em uma porcentagem menor que 0,05% (quase desprezível), comparada com a do DPPC puro. Para concentrações entre 0,5-5% molar ocorre uma expansão nos filmes que não passa de 1,5% para uma concentração de 5% molar. Para as concentrações entre 5 e 15% molar a expansão começa a diminuir e já em 15% molar é igual à do DPPC puro. Para 20% molar do DIP a expansão aumenta novamente, mas aqui em uma porcentagem menor, 2,5% (como mostrado na Fig. 4.9, curva da razão A/A_0 versus a concentração molar no ponto da transição de fase LE-LC), se a comparamos com o caso das pressões muito baixas, onde a expansão chegava a 5%. **Para 30mN/m**, nas baixas concentrações, 0,1-0,5%, de novo tem-se a descontinuidade, mas aqui não como um pico, mas como uma oscilação em torno de 1,5% comparada com a área do DPPC. Mas para concentrações mais altas, entre 0,5 e 2% molar, a expansão aumenta com um máximo de 3% em porcentagem, para 2% molar do DIP. A partir de 2% e até 15%

molar a expansão diminui novamente e em 15% molar é de 1%. Já para uma concentração de 20% molar do DIP de novo acontece o máximo aumento na expansão da monocamada de aproximadamente 4%, como mostrado na Fig. 4.10 (curva da razão A/A_0 versus a concentração molar para uma pressão de 1 mN/m).

Fig. 4.7. Razão entre a área por molécula de DPPC das isotermas de pressão de superfície DIP/DPPC e a área do DPPC puro versus a pressão superficial.

Fig. 4.8. Razão entre a área por DPPC das isotermas de pressão de superfície DIP/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 4.9. Razão entre a área por DPPC das isotermas de pressão de superfície DIP/DPPC e a área do DPPC puro versus as concentração molar das misturas no ponto da transição de fase LE-LC.

Fig. 4.10. Razão entre a área por DPPC das isotermas de pressão de superfície DIP/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isotermas de potencial de superfície

As isotermas de potencial de superfície são apresentadas na Fig. 4.11 para várias concentrações do DIP, sendo A a área por molécula de DPPC, sem tomar em consideração o DIP. Os dados para o DPPC puro são consistentes com os resultados publicados [88-90]. Como no caso das isotermas de pressão, para concentrações do DIP entre 0,2-0,4% molar é

mostrada uma influência significativa nas isotermas ΔV -A, enquanto que para altos níveis do DIP, os dados são mais parecidos com aqueles do DPPC puro. Assim, para níveis abaixo de 0,5% molar, ΔV aumenta comparado com os valores observados para o filme do DPPC puro. Em particular, existe um aumento pronunciado de ΔV a grandes áreas para as baixas concentrações do DIP, tal que a área crítica, A_c , em que o potencial de superfície começa a subir, inicia a valores consideravelmente maiores. Para interpretar os resultados em termos da variação de momento de dipolo, mostraremos a seguir a forma como este foi obtido. O momento de dipolo foi calculado a partir da expressão:

$$\Delta V = \frac{\mu}{A \epsilon_0}$$

em que ΔV é o potencial de superfície, A é área por molécula, e ϵ_0 é a permissividade do vácuo. Ver por exemplo as Figs. 4.12, 4.13 e 4.14, com variação do momento de dipolo versus a concentração para 1 mN/m, 30 mN/m e no ponto da transição de fase LE-LC, onde é mostrado aumento do momento de dipolo na presença do DIP (nas baixas concentrações) nas diferentes pressões. Nestas curvas observamos que o aumento do momento de dipolo nas concentrações muito baixas é da ordem de 10%. E para as altas concentrações, a variação no momento de dipolo é menor que no caso do lipídio puro, em uma porcentagem de 7 e 10% para 1 mN/m e no patamar. Mas para 30 mN/m a variação no momento de dipolo vai diminuindo à medida que a concentração aumenta. O momento de dipolo das misturas é menor que para o lipídio puro em quase todas as concentrações. O fato de que o momento de dipolo seja menor e que diminua progressivamente a partir de 2% molar poderia ser um indicativo de que temos uma modificação na estrutura das moléculas das misturas. Talvez as moléculas do DIP que não se ligam no DPPC permanecem na parte mais superficial da água formando ligações de hidrogênio com as moléculas de água vizinhas a elas.

Fig. 4.11. Isotermas de potencial de superfície das misturas DIP/DPPC com a abscissa sendo a área por molécula de DPPC.

Fig. 4.12. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isotermas DIP/DPPC e o momento de dipolo do lipídio puro versus a concentração molar para cada um dos potenciais que corresponde a uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 4.13. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas DIP/DPPC e o momento de dipolo do lipídio puro versus a concentração molar para cada um dos potenciais que corresponde ao ponto da transição de fase LE-LC.

Fig. 4.14. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas DIP/DPPC e o momento de dipolo do lipídio puro versus a concentração molar para cada um dos potenciais que corresponde a uma pressão de 30 mN/m.

Discussão

Vários métodos sensitivos de caracterização de superfícies mostram consistentemente que o DIP afeta as propriedades físico-químicas da monocamada superficial do DPPC, na verdade, a concentrações extremamente baixas. Ainda mais surpreendente é o fato de que os efeitos são mais pronunciados no regime das baixas concentrações, ao passo que decrescem ou ainda são revertidos no caso de concentrações maiores do DIP. Isto é observado com diferentes técnicas, como será discutido depois. As duas observações, tanto nas altas quanto nas baixas concentrações, sugerem efeitos cooperativos em diferentes níveis. O impacto do DIP observado nas monocamadas do DPPC pode ser destacado em perspectiva: Se se especula sobre os detalhes moleculares da associação da droga com a monocamada superficial tem que ser explicado como é possível que uma molécula do DIP por 500 do DPPC (0,2% molar de DIP)⁵ possa levar às mudanças observadas nas propriedades do filme em uma escala macroscópica. A interação da droga com o DPPC poderia dar lugar a uma associação periférica do DIP com o lipídio na interface, entre a subfase e as cabeças do DPPC. Se for feita uma aproximação da geometria da molécula do DIP descrevendo-a como um disco plano de 10 Å isto implica que ele (o DIP) pode interagir com cerca de 5 moléculas de DPPC de cada vez. A cooperatividade entre as moléculas do lipídio deve ser introduzida aqui para explicar porque as interações de transporte em tal nível (0,2% molar do DIP) resultam em um efeito medido macroscopicamente. Poderá ser feita aqui uma similitude entre a cooperatividade do sistema DIP/DPPC com o efeito dominó: Quando as peças de um dominó são alinhadas uma atrás da outra (supondo que as peças são as 500 moléculas do DPPC), basta com que toquemos ligeiramente uma delas e todas as restantes sentirão a perturbação e começarão a cair em cascata (a perturbação será neste caso a introdução da molécula do DIP).

Regime das baixas concentrações do DIP

Os dados de pressão, potencial, e microscopia de fluorescência na superfície (estes últimos resultados não serão mostrados aqui) mostram consistentemente que o DIP altera o

⁵ Fazendo uma regra de três simples se poder chegar ao seguinte cálculo: 0,2% molar do DIP equivale a uma molécula da droga então os restantes 99,8% molar do DPPC equivalem a aproximadamente 500 moléculas do DPPC.

estado da monocamada do lipídio em concentrações tão baixas como 0,2% molar. Neste regime de concentrações, as monocamadas superficiais são condensadas pela droga como já foi deduzido das isotermas de pressão mostradas na Fig. 4.2 e 4.3 na região da transição de fase LE-LC. Este fato, na verdade, fornece alguma evidência relativa à intercalação da droga entre as moléculas do lipídio; já que esta condensação (devida à diminuição da pressão no lipídio na presença da droga) é consistente com um modelo que tem o DIP interagindo com mais de uma molécula de DPPC causando simultaneamente uma mudança na conformação, tal que o empacotamento das moléculas do DPPC passa a ser mais eficiente na monocamada superficial. Não obstante, se uma molécula do DIP pode interagir diretamente com 5 moléculas do DPPC, quando o DIP está presente na interface em uma concentração tão baixa como 0,2% molar, então somente uma de cada 100 moléculas do DPPC no filme pode ser afetada diretamente. Esta estimativa grosseira sugere que os lipídios que não interagem diretamente com a droga podem ser afetados indiretamente via interação cooperativa entre as moléculas de DPPC mais próximas no filme.

Um argumento similar é derivado de uma análise semiquantitativa dos dados de potencial de superfície. A forma convencional de interpretar as medidas de potencial foi descrita no Cap. 2. Uma monocamada do lipídio zwitteriônico DPPC na água pura não tem contribuição da dupla camada [83, 91]. Na molécula do DPPC, a principal contribuição de ΔV acredita-se que advém dos grupos carbonila na região entre as cadeias e a cabeça, uma vez que o dipolo do zwitterion está rodeado por um meio com uma alta constante dielétrica, ϵ_2 , e espera-se que o dipolo esteja preferencialmente orientado paralelo à superfície da água [92, 93]. Quando dados de potencial foram analisados para diferentes fosfolipídios zwitteriônicos, descobriu-se que a contribuição do zwitterion pode não ser completamente desprezada devido ao seu momento de dipolo extremamente alto (~ 20 D) em comparação com outros momentos de dipolo do grupo que são da ordem de 1 D [31, 40]. Isto implica que uma ligeira reorientação do grupo cabeça do PC com respeito à normal à superfície pode resultar em mudanças significativas de ΔV , [90, 93, 94] que é usado para avaliar o impacto das moléculas adsorventes em monocamadas que contêm o PC [90].

As alterações de 80-100 mV no potencial de superfície (Fig. 4.11) causadas por apenas 0,2% molar do DIP não podem ser atribuídas exclusivamente a uma contribuição da droga. Devem ser consideradas também as contribuições da reorientação da cabeça do

lipídio. A reorganização das cadeias alquílicas é desprezível, ou seja, não tem nenhuma influência na cooperatividade entre as moléculas vizinhas do DPPC. Se algumas moléculas de DPPC fossem afetadas, então a variação de ΔV não deverá ser tão grande. Portanto, os resultados das Figs. 4.12, 4.13 e 4.14 só podem ser explicados, pressupondo-se um efeito cooperativo entre as moléculas do DPPC.

A observação de que o ponto de subida nas isotermas ΔV -A muda a baixas densidades superficiais do lipídio (como mostrado na Fig. 4.11), implica que particularmente as moléculas de DPPC na fase LE são afetadas pela organização da suas cabeças. Pode ser concluído que a baixas pressões laterais a organização mesoscópica da estrutura de fases no regime de co-existência G-LE do DPPC, onde este forma o análogo bidimensional de uma espuma fluido/gasosa [95, 96], é alterada através da condensação lateral criada pelas moléculas do DIP. Isto pode levar às mudanças observadas no ponto da subida da curva. Em uma escala molecular, a organização das cabeças e/ou sua associação com as moléculas da água na fase LE também significa mudanças na adsorção da droga.

As medidas de microscopia de fluorescência mostraram [97] que não existe preferência da região na qual o DIP pode ser adsorvido, ele poderia se ligar na monocamada em qualquer uma das fases, ou na LE ou na LC, como foi visto nas curvas de expansão (A/A_0) contra a concentração, Figs. 4.8, 4.9 e 4.10. A admissão do DIP na solução espalhada causa, no entanto, mudanças sensíveis na morfologia dos domínios. A partir destes resultados ficaram claras as evidências de que a droga está presente na interface. A elongação (ou aumento, quando o DIP condensa as moléculas do DPPC, cada domínio novo ocupa uma área molecular média maior e como resultado são mostradas as expansões, A/A_0 , nas Figs. 4.8, 4.9 e 4.10) das fronteiras dos domínios com respeito à morfologia observada no DPPC puro é o resultado de uma redução na tensão superficial entre as duas fases e/ou um aumento da repulsão entre as componentes paralelas dos momentos de dipolo localizados nas moléculas [98-100]. Já que um rearranjo dos momentos de dipolo nas cabeças do lipídio parece provável, os resultados de pressão e potencial de superfície mostram a associação da droga na monocamada, condensando o filme (como mostrado na Fig. 4.3) e que particularmente a fase LE é afetada pela reorientação das cabeças (como mostrado na discussão das mudanças no potencial de superfície). Isto implica que a ordem molecular aumenta na fase LE, possivelmente

mostrando que esta é estruturalmente mais similar à fase LC que no caso de DPPC puro. (Deve ser notado, no entanto, que o ordenamento da cadeia não parece ser afetado por esta reorientação como foi deduzido dos resultados de FTIR) [97]. Parece que em ambas as fases aumenta a repulsão dipolar dentro da monocamada e diminui a linha de tensão como resposta aos efeitos observados.

Altas concentrações do DIP

Deve ser dada particular atenção aos efeitos da droga dependendo da concentração molar em monocamadas de fosfolipídios. As três quantidades investigadas –pressão de superfície, potencial de superfície e morfologia dos domínios –apontam a uma mesma conclusão, o DIP está presente na interface em uma configuração que interage fortemente com o lipídio a concentrações extremamente baixas. No entanto, aumentando a concentração da droga, acima de uma certa concentração crítica, ($c_{crit} \sim 0,5\%$ molar) esses efeitos não são apenas saturados, mas sim anulados ou revertidos (expansão nas monocamadas em lugar de condensação). Isto deve ser atribuído a um efeito cooperativo que atua em níveis completamente diferentes daqueles discutidos para as baixas concentrações. Pode ser postulado que a agregação do DIP na interface excede a c_{crit} . Para a discussão de tal auto-agregação da droga, se deve pensar que sua concentração na subfase equivalente à interface é extremamente alta: se as moléculas do DIP são confinadas dentro da camada da interface, 50 Å de espessura, uma concentração de 0,2% molar na superfície com respeito ao lipídio é equivalente a uma concentração de ~ 1 mmol/L. Na solução aquosa, a solubilidade do DIP é de só ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ [11].

A reversão dos efeitos nas baixas concentrações implica que a concentração do monômero no seu estado ativo na interface é reduzida abaixo da concentração para a qual são observados esses efeitos de associação, por exemplo, abaixo de 0,2% molar. A agregação pode ser tomada em conta para tal comportamento nas concentrações. O estado de agregação pode ser ou ligado ou dissociado da membrana: em qualquer caso sua interação com as moléculas do lipídio é tão fraca que os efeitos macroscópicos não são grandemente esperados. A agregação do DIP foi na verdade sugerida para explicar a expansão das isotermas de pressão, quando só concentrações acima de 1% são consideradas, por exemplo, a 20% molar do DIP a expansão é tão grande que se destaca entre as outras, como mostrado nas Figs. 4.2, 4.3 e 4.7.

Interpretação à escala molecular das interações do DIP com as monocamadas do DPPC

Os resultados de pressão e potencial de superfície e microscopia de fluorescência mostraram um efeito cooperativo em baixas concentrações de DIP, e que este está presente na interface. Nada pode ser dito sobre a localização do DIP, embora os resultados de pressão mostraram claramente que as moléculas de DIP são expulsas em altas pressões. Ou melhor, elas não contribuem para a área por molécula, ainda que estejam acopladas ao DPPC (talvez na região das cabeças hidrofílicas). A localização do DIP pôde ser determinada com precisão, entretanto, a partir de medidas de espectroscopia de FTIR ‘*in situ*’. Observou-se [97] que a introdução do DIP não afeta as bandas características das caudas hidrofóbicas, nem das carbonilas. Sabe-se que a vibração C=O é muito sensível a mudanças na hidratação [101]. Conclui-se, portanto, que o DIP não se intercala entre as cadeias alquílicas do DPPC.

O DIP só afetou as bandas de absorção do fosfato $\nu(\text{PO}_2^-)$, em 7 e 2 cm^{-1} para os modos assimétrico e simétrico, respectivamente. O deslocamento para energias mais altas implica um aumento da constante de força D [96] ($\tilde{\nu} \propto \sqrt{D/\mu}$, com μ sendo a massa reduzida do oscilador na aproximação harmônica), indicativo de que ocorre um aumento na intensidade da ligação P-O. Uma explicação para tal aumento pode ser uma mudança na conformação molecular que transfere o grupo fosfato a um ambiente menos polar onde este se envolve menos nas ligações de hidrogênio. ***Em vista da baixa concentração do DIP isto poderia implicar que a droga reduz cooperativamente a hidratação do fosfato em todas as moléculas do DPPC na monocamada, e não só dos vizinhos mais próximos diretamente associados com o DIP.***

Qual é o mecanismo de acoplamento do DIP na monocamada do lipídio? Da estrutura química da droga, como mostrado na Fig. 3.12 e dos experimentos de titulação [11] é inferido que as interações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio podem ser importantes. O DIP aceita um próton em um dos seus nitrogênios terciários em um meio levemente ácido ($\text{pK}=5,8$ [11]) próximo do pH da subfase aquosa de 5,6 (já que o CO_2 do ambiente é dissolvido na subfase aquosa), resultando em uma carga positiva localizada na molécula. Por outro lado, os grupos terminais hidroxílicos na periferia da molécula são potenciais doadores de ligações de hidrogênio. Isto explica porque a droga interage tão

fortemente com as cabeças do lipídio no estado desordenado (LE) onde as cabeças estão preferencialmente alinhadas paralelas à interface [102, 103] tal que o grupo fosfato é acessível à fase aquosa. Pode ser sugerido que a carga positiva na molécula do DIP procura a carga negativa do grupo fosfato de um DPPC enquanto seus grupos hidroxílicos da etanolamina formam ligações de hidrogênio com os 4 lipídios mais próximos. Isto pode levar a um forte acoplamento da droga na monocamada do lipídio, o que então explica a observação das mudanças nas propriedades da monocamada induzidas pelo DIP a concentrações excessivamente baixas da droga. As interações eletrostáticas – atração entre a molécula do DIP e o fosfato do DPPC, assim como também a repulsão entre o DIP e a colina- deverão reorientar o momento de dipolo das cabeças μ_2 (ver Cap 2), tal que sua componente vertical se altere aumentando o potencial superficial. O fosfato carregado negativamente é atraído para a subfase enquanto a colina carregada positivamente é puxada em direção ao compartimento hidrofóbico.

Conclusão

Podemos concluir que o DIP interage fortemente com o DPPC dentro da monocamada superficial na água e que as mudanças nas propriedades características da monocamada ocorrem a concentrações extremamente pequenas, 0,2% molar, com respeito ao lipídio, onde destacamos que a droga foi co-espalhada como descrito no capítulo da parte experimental. O efeito de condensação é mudado quando as concentrações são maiores. A partir de 1% molar do DIP as monocamadas são expandidas e ocorre uma reversão no comportamento das isotermas, com o DIP formando agregados no DPPC. Os experimentos de IR indicam que a droga interage perifericamente com a cabeça zwitteriônica do lipídio. Foi proposto aqui que o DIP pode interagir até com 5 moléculas do DPPC via ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. A reorganização resultante no lipídio é altamente cooperativa, tal que 1 molécula do DIP pode interagir até com 100 moléculas do DPPC. Este efeito é conhecido, no campo das forças intermoleculares, como a não aditividade das interações. Uma molécula não se limita a interagir com a sua vizinha mais próxima, mas o faz com várias e esta interação leva a uma perturbação em escala, que poderia se estender sucessivamente a outras moléculas.

4.2. MISTURAS DIP/DPPG

A. Isotermas de pressão de superfície.

As misturas DIP/DPPG, assim como as misturas TFP/DPPG e CPZ/DPPG, a serem mostradas no próximo capítulo, têm um ponto em comum: todas elas apresentam uma expansão muito grande e similar, >100%, nas altas concentrações e nas baixas pressões. Nas baixas pressões as monocamadas experimentam forças repulsivas muito grandes e as drogas são as responsáveis por este efeito, a carga líquida negativa do lipídio diminui nas misturas com os fármacos. O grau de aceitação do DPPG varia dependendo da droga quando as pressões são altas. Por exemplo, em 30 mN/m, a monocamada contendo a TFP ainda continua bastante expandida, a droga se liga no lipídio. A CPZ dá lugar a uma expansão média, parece que temos perda de uma parte das moléculas para a água, sem especificar se na parte superficial da água ou no volume. E o DIP praticamente não expande a monocamada do DPPG, isto quer dizer que quase todas as moléculas vão para a água, ver as Figs. 4.16 e 4.17.

Fig.4.15. Isoterma de pressão superficial das misturas DIP/DPPG, área por lipídio.

Fig. 4.16. Razão entre a área molecular média por DPPG das isotermas de pressão DIP/DPPG e a área do DPPG puro versus a pressão superficial.

Quando as concentrações do DIP são altas (20% molar), aparece a transição de fase nas isotermas de pressão e potencial, reflexo da neutralização do DPPG pelo DIP. Isso é mais bem ilustrado nas Figs. 4.18 e 4.19. Na primeira destas figuras, para uma pressão baixa de 1 mN/m, a expansão é quase linear para cada concentração, e já nas altas concentrações esta é bastante elevada, comparável à das misturas TFP/DPPG e CPZ/DPPG nessas mesmas condições. Na Fig. 4.19, para uma pressão maior, 30 mN/m, a expansão é praticamente insignificante se a comparamos com a das baixas pressões, um claro indício de que praticamente todas as moléculas do DIP vão para a água.

Fig. 4.17. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão DIP/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m

Fig. 4.18. Razão entre a área por molécula do DPPG das isothermas de pressão DIP/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m

B. Isothermas de potencial de superfície.

As isothermas de potencial de superfície DIP/DPPG, mostradas na Fig. 4.20, relacionam na abscissa a área por lipídio de cada mistura. A inserção da droga, que é catiônica no pH da água pura, propicia um aumento no potencial de superfície total.

As medidas do momento de dipolo, ver Figs. 4.21 e 4.22, são esclarecedoras e confirmam a expulsão do DIP no DPPG em altas pressões. Os valores do momento de dipolo relativos às misturas são grandes quando comparados com o do DPPG puro e quase constantes para todas as concentrações, em altas pressões. Ou seja, uma parte das moléculas do fármaco vai para a água, mas existe outra parte que poderia ligar-se por baixo no lipídio ou pelo menos próxima à interface para que o momento de dipolo superficial seja grande quando comparado com o momento de dipolo do lipídio puro. Conclusão: o DIP neutraliza o DPPG, diminuindo a contribuição negativa da dupla camada elétrica difusa. Os efeitos grandes no momento de dipolo ocorrem a concentrações relativamente baixas, 1 e 2% molar da droga. Nessas faixas o aumento no momento de dipolo da mistura relativo ao lipídio é bastante grande, tanto nas baixas quanto nas altas pressões. A partir daí o momento de dipolo da mistura relativo ao lipídio oscila, mas não aumenta monotonicamente, se mantém entre 40 e 50% acima do momento de dipolo do lipídio puro.

Fig. 4.19. Isothermas de potencial de superfície das misturas DIP/DPPC com a abscissa sendo a área por molécula de DPPG.

Fig. 4.20. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isothermas DIP/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Fig.4.21. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isothermas DIP/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m

Conclusão

As interações do DIP com o DPPG são muito fortes, a presença da dupla camada elétrica difusa faz com que as propriedades físico-químicas destes filmes sejam diferentes às encontradas nos casos dos filmes DIP/DPPC. Podemos notar das isothermas de pressão para todas as concentrações, existe uma expansão progressiva nas monocamadas, mas esta expansão diminui com o aumento da pressão superficial e para pressões altas desaparece. O DIP, protonado, modifica as ações devidas à dupla camada elétrica difusa originadas pelo DPPG na água, contrarrestando o efeito negativo e propiciando uma neutralidade do filme misto. As interações do DIP com o DPPG são de caráter iônico enquanto que com o DPPC são dipolares.

Capítulo 5

MISTURAS CPZ E TFP

A CPZ e a TFP são solúveis na água, mas aqui as forças de hidratação, que propiciariam uma repulsão entre as cabeças do lipídio (como mostrado no Cap. 2), parecem ser pouco significativas comparadas com o efeito hidrofóbico, que faz com que as moléculas polares da água possam se organizar na interface por meio de ligações de hidrogênio entre o lipídio e as drogas. É a chamada hidratação hidrofóbica. As moléculas catiônicas TFP e CPZ, no pH da água pura, mostradas na Fig. 3.2, também podem estar ligadas via íon-dipolo à parte dipolar da cabeça do lipídio, de tal modo que a ligação das drogas no DPPC daria lugar ao aumento na área por molécula. Para que possa ser formada uma idéia mais clara do exposto neste parágrafo é conveniente analisar os resultados das isotermas de pressão e potencial de superfície destas misturas. Neste capítulo, inicialmente serão apresentadas as isotermas de pressão de superfície das misturas CPZ/DPPC, CPZ/DPPG, TFP/DPPC e TFP/DPPG. Em seguida, serão mostradas as curvas de expansão com a pressão, e da expansão com a concentração, obtidas a partir das isotermas de pressão. Finalmente, serão mostradas as curvas da variação do momento de dipolo com a concentração molar, obtidas a partir das isotermas de potencial em conjunto com as isotermas de pressão.

5.1. MISTURAS CPZ/DPPC

A. Isotermas de pressão de superfície

Para as misturas CPZ/DPPC, Figs. 5.1 (isotermas de pressão de superfície, área por lipídio), 5.2 (ampliação da Fig. 5.19 na região da transição de fase LE-LC) e 5.3 (expansão versus pressão), temos uma expansão de todas as monocamadas quando comparadas com o lipídio puro. Mas esta expansão não é muito grande e atinge um máximo para uma concentração de aproximadamente 2% molar da CPZ, a partir dali é praticamente constante. De novo estamos frente a um caso de saturação. O DPPC aceita uma certa quantidade de moléculas da droga e o restante parece que vai para a água. Nas Figs. 5.4, 5.5, e 5.6 (curvas da expansão versus a concentração molar) mostramos, com maior clareza, a saturação da CPZ no DPPC para duas pressões superficiais diferentes, 1 e 30 mN/m, e no ponto da

transição de fase LE-LC. Para as concentrações muito baixas, entre 0,1-1% molar, ocorre um pico na expansão, nas três regiões de pressões diferentes: a 1 e 30 mN/m e no patamar. Novamente insistimos que estes picos não são resultado de nenhum artefato experimental e sim devidos ao efeito cooperativo, produto das ligações dipolares entre a molécula da CPZ (catiônica, mostramos a estrutura molecular na Fig. 3.2) e o DPPC. Como já foi discutido antes, esse efeito também ocorre no caso das misturas DIP/DPPC (Cap. 4).

Fig. 5.1. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos CPZ/DPPC, área por lipídio.

Fig. 5.2. Ampliação da Fig. 5.1 na região do patamar.

Fig. 5.3. Razão A/A_0 em que A é a área de cada mistura relativa ao lipídio e A_0 é a área do DPPC puro versus a pressão de superfície para as misturas CPZ/DPPC.

Fig. 5.4. Razão entre a área por lipídio das isotermas CPZ/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 5.5. Razão entre a área por lipídio das isothermas CPZ/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas no ponto da transição de fase LE-LC.

Fig. 5.6. Razão entre a área por lipídio das isothermas CPZ/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isothermas de potencial de superfície.

Na Fig. 5.7 são apresentadas as isothermas de potencial das misturas, CPZ/DPPC, na abscissa a área por lipídio de cada mistura. As curvas de potencial serão usadas neste contexto para calcular a variação do momento de dipolo das misturas relativo ao momento de dipolo do lipídio puro. Podemos notar nestas curvas que todas as isothermas das misturas são semelhantes à do DPPC puro. Dos resultados da variação do momento de dipolo, como

mostrado nas Figs. 5.7, 5.8 e 5.9, podemos destacar que a partir de 15% molar da CPZ temos uma diminuição do momento de dipolo da mistura relativo ao momento de dipolo do lipídio puro. De novo confirmando os nossos resultados de pressão de superfície, a partir de uma dada concentração molar são formados agregados ricos em CPZ, ainda que uma parte das moléculas da droga vai para a água. E nas concentrações baixas, entre 0,1-1% molar, a oscilação na variação do momento de dipolo poderia ser o resultado de flutuações, em cada monocamada do lipídio, devidas à presença da droga.

Fig. 5.7. Isotermas de potencial de superfície das misturas CPZ/DPPC com a abscissa sendo a área por molécula de DPPC.

Fig. 5.8. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isotermas CPZ/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig. 5.9. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas TFP/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem ao ponto da transição de fase LE-LC.

Fig. 5.10. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas TFP/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

A CPZ se associa no DPPC até uma concentração molar de 2%, efeito cooperativo, a partir dali ocorre uma saturação da monocamada mista. Para concentrações acima de 15% molar, o aumento no momento de dipolo decai, isto quer dizer que se originam agregados ricos em CPZ no filme do DPPC.

5.2. MISTURAS CPZ/DPPG

A. Isotermas de pressão de superfície.

Novamente no caso das misturas CPZ/DPPG ocorre uma expansão enorme devida à presença da droga na matriz do DPPG, como mostram as Figs. 5.11 e 5.12. Esta expansão também aumenta linearmente com a concentração da droga. É maior nas baixas pressões (ver Fig. 5.13) e vai diminuindo com a compressão. Para as misturas CPZ/DPPG, quando as pressões são grandes a competição entre as forças presentes faz com que uma parte da droga seja transferida para a água, isto porque para uma pressão de 30 mN/m a expansão das monocamadas é maior que para o caso das misturas DIP/DPPG. Aqui podemos perceber uma parcial neutralização do lipídio na presença da droga, e, além disso, a CPZ também propicia o aparecimento de uma transição de fase à medida que a concentração aumenta, ver Fig. 5.11, mais pronunciado que no caso das misturas DIP/DPPG. Esta transição de fase é evidenciada nas medidas de potencial de superfície que serão estudadas mais adiante. Quando esta transição aparece, a neutralização do lipídio ocorre, como mostrado no Cap. 2.

Fig. 5.11. Isoterma de pressão superficial das misturas CPZ/DPPG, área por lipídio.

Na Fig. 5.12, para uma concentração de 20% molar da droga, a expansão da isoterma, similar ao caso das misturas DIP/DPPG, é da ordem de 120%, a uma pressão de 1 mN/m. Quando aumentamos a pressão a expansão é menor que no caso da TFP, da ordem de 10%, para as mesmas concentração e pressão.

Fig. 5.12. Razão entre área moléculas média por DPPG das isotermas de pressão CPZ/DPPG e a área do DPPG puro versus a pressão superficial.

Na Fig. 5.13 é apresentada uma curva que relaciona na abscissa as concentrações em moles de CPZ e na ordenada a razão, A/A_0 , para uma pressão de 1 mN/m. Novamente o comportamento é linear. Um indicativo de que a droga cria uma repulsão muito grande entre as moléculas do lipídio é a expansão da monocamada de 119% quando comparada ao do lipídio puro para uma concentração de 20% da CPZ. Para uma concentração de 2% molar, a expansão é de 13%. Na Fig. 5.14 mostramos a curva A/A_0 -vs-%mol para uma pressão maior, 30 mN/m. Neste caso pode-se destacar que para uma concentração de 20% molar da droga, a expansão novamente diminui com relação às baixas pressões, mas o seu valor ainda é relevante, de 14%. Já para uma concentração de 2% da droga, nessa mesma pressão a expansão é de 3%.

Fig. 5.13. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão CPZ/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 5.14. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão CPZ/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isotermas de potencial de superfície.

As isotermas de potencial de superfície CPZ/DPPG, mostradas na Fig. 5.15, relacionam na abscissa a área por lipídio de cada mistura, e assim como no caso das misturas DIP/DPPG, apresentam um aumento quando a droga é adicionada na matriz do DPPG.

Os resultados do momento de dipolo para duas pressões de 1 e 30 mN/m, ver as Figs. 5.16 e 5.17, são complementares. Nas baixas pressões, mostrados na Fig. 5.16, para as concentrações entre 1 e 2% molar temos um pico no momento de dipolo, com um máximo em 2% molar da droga. Nessa concentração o aumento no momento da mistura relativo ao momento de dipolo do lipídio puro é superior a 50%. Ou seja, o aumento é muito grande. De novo confirmando os resultados de que nas baixas concentrações ocorre uma ligação muito forte entre as moléculas do lipídio e as moléculas da droga (efeito cooperativo). Mas a partir de uma concentração de 2% molar da droga ocorre uma diminuição drástica no momento de dipolo, tanto que em 15% molar o momento de dipolo é menor que o momento de dipolo do lipídio puro. Isto pode ser explicado argumentando que nesta região molar ocorre uma reorientação ou redistribuição molecular acompanhada de uma perda de moléculas de CPZ para o volume da água deixando o lipídio com uma carga líquida total própria dele puro na água, similar ao caso das misturas TFP/DPPG. Entre 15 e 20% o momento de dipolo aumenta novamente, talvez porque o sistema chega a um estado de

saturação tão grande que todas as moléculas mesmo gostando da água não conseguem sair da região superficial. Por isso o momento de dipolo aumenta, uma vez que a CPZ blinda o DPPG, diminuindo sua carga superficial, como foi mostrado no Cap. 2. Para uma pressão superficial maior, 30 mN/m, a situação é similar ao caso das baixas pressões nas concentrações entre 1-5% molar da CPZ, ver Fig. 5.17. Mas a partir de 5% molar o aumento no momento de dipolo da mistura relativo ao do lipídio é praticamente constante, flutua entre 30 e 40% acima do momento de dipolo do lipídio puro. Isso confirma que a partir desta concentração a quantidade de moléculas da CPZ inseridas na matriz do DPPG ou bastante próxima dela é praticamente a mesma.

Fig. 5.15. Isotermas de potencial de superfície das misturas CPZ/DPPG com a abscissa sendo a área por molécula de DPPG.

Fig. 5.16. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isotermas CPZ/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig.5.17. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isotermas CPZ/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

Uma parte das moléculas da CPZ é inserida na matriz do DPPG, quando o filme está na sua fase sólida o condensada, ainda que a outra parte de moléculas vai para o volume ou fice nas cadamas mais superficiais da água. Dentre as três drogas estudadas podemos concluir que O DIP perde quase todas as suas moléculas para a subfase aquosa, a CPZ logra uma inserção moderada e a de maior associação com o lipídio DPPG é a TFP. A inserção do DIP nas duas matrizes lipídicas, DPPC e DPPG, é diferente. O DPPC limita mais a entrada de molécula da droga, enquanto que o DPPG as admite em melhor proporção.

5.3. MISTURAS TFP/DPPC

A. Isotermas de pressão de superfície.

Nas baixas concentrações ocorre uma condensação das monocamadas, ver as Figs. 5.18, 5.19 e 5.20, e nas altas concentrações é evidente uma expansão dos filmes. Parece que a TFP é dissolvida dentro da matriz do DPPC até uma determinada concentração, 1% molar. Além dessa concentração uma expansão da monocamada acontece, que vai diminuindo à medida que a pressão superficial aumenta. Na verdade temos um máximo da expansão a 5% molar da TFP. A partir dali a droga satura a matriz do DPPC. Para visualizar melhor este comportamento ver as Figs. 5.21, 5.22, e 5.23 para duas pressões diferentes, 1mN/m e 30 mN/m, e no ponto da transição de fase LE-LC (curvas da razão A/A_0 -vs-concentração molar da TFP). Na Fig. 5.21, para uma pressão de 1mN/m, pode-se destacar novamente que para as concentrações muito baixas da droga, 0,1-1% molares, há um efeito da condensação da monocamada. Esse efeito de condensação é semelhante ao que ocorre com o colesterol, como será visto no Cap. 6. A introdução da TFP na matriz do lipídio torna-o menos permeável à entrada de partículas. À semelhança da interação DIP/DPPC, há efeitos marcantes em baixas concentrações. A discussão sobre a cooperatividade introduzida no Cap. 4 também se aplica à TFP. É provável que o poder terapêutico da TFP seria facilitado quando a droga é inserida até uma certa quantidade limite. Poderíamos ir além e pensar que a droga teria a faculdade de transpor a membrana celular natural e com isso interagir diretamente no interior da célula, como o que ocorre com o colesterol que parece atravessar as membranas celulares [104]. Quando a quantidade da droga é aumentada a expansão das monocamadas poderia ser tomada como restrita, uma parte da droga permanece na interface e a outra vai para a água. Como será mostrado, no caso das misturas COL/DPPC, são admitidos, no DPPC, até aproximadamente 15% molar do COL. Para as misturas TFP/DPPC a restrição aumenta, e o DPPC só admite até 5% da droga. Além disso, o COL, a uma concentração a 20% molar, faz com que a transição de fase LE-LC desapareça no lipídio. Por que a TFP não faz isto? Porque o lipídio só admite até 5% da droga, e esta quantidade não é suficiente para que a transição seja atenuada ou eliminada. O comportamento da TFP nas baixas concentrações se repete tanto no ponto da transição de fase LE-LC como para pressões altas, 30 mN/m, ver as Figs. 5.22 e 5.23.

Fig. 5.18. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos TFP/DPPC, com a área por DPPC na abscissa.

Fig. 5.19. Ampliação da Fig. 5.18 na região do patamar.

Fig. 5.20. Razão A/A_0 em que A é a área de cada mistura relativa ao lipídio e A_0 é a área do DPPC puro versus a pressão de superfície para as misturas TFP/DPPC.

Fig. 5.21. Razão entre a área por lipídio das isotermas TFP/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 5.22. Razão entre a área por lipídio das isotermas TFP/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas no ponto da transição de fase LE+LC.

Fig. 5.23. Razão entre a área por lipídio das isotermas TFP/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isotermas de potencial de superfície.

Na Fig. 5.24 são apresentadas as isotermas de potencial das misturas, TFP/DPPC, na abscissa a área por lipídio de cada mistura. As curvas de potencial serão usadas neste contexto para calcular a variação do momento de dipolo das misturas relativo ao momento de dipolo do lipídio puro.

Nas Figs. 5.25, 5.26 e 5.27 são mostrados os gráficos da variação do momento de dipolo das misturas para duas pressões, 1 e 30 mN/m, e no ponto da transição de fase LE+LC. A partir de 10% molar da TFP começa a diminuição no momento de dipolo. Parece que a droga forma agregados ricos em TFP dentro da matriz do DPPC, além de que uma parte das moléculas da trifluoperazina vai para a água. Nas baixas concentrações pode-se notar que a variação do momento de dipolo apresenta um pico, com um máximo a 0,2% da droga, sendo que o aumento no momento de dipolo é de aproximadamente 7%. Tal pico apareceu nas misturas DIP/DPPC e também será visto nas misturas MEL/DPPC, COL/DPPG e TFP/DPPG. É fundamental ressaltar que o pico nas baixas concentrações não é um artefato experimental, pois em todas as concentrações foi feita uma média de várias medidas (como mostrado no Cap. 3). Pode ser que a ligação entre as moléculas que formam as misturas seja muito forte, talvez ocorra um rearranjo na distribuição dos dipolos das moléculas, resultante da incorporação das drogas na matriz dos lipídios, devida ao efeito cooperativo mostrado no Cap. 4 para as misturas DIP/DPPC. A oscilação de μ/μ_0 para valores maiores e menores que 1 mostra que o efeito cooperativo parece ser altamente sensível a pequenas mudanças na concentração. Esta drástica alteração de comportamento, para alterações tão pequenas na concentração, nunca foi relatada na literatura.

Fig. 5.24. Isothermas de potencial de superfície das misturas TFP/DPPC com a abscissa sendo a área por molécula de DPPC.

Fig. 5.25. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas TFP/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig. 5.26. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas TFP/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem ao ponto da transição de fase LE+LC.

Fig. 5.27. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isotermas TFP/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

A TFP modifica a estrutura da monocamada do lipídio em concentrações pequenas, condensando-o, expandindo-o e sendo similar à do DPPC puro à medida que compressão aumenta. A TFP satura a matriz do DPPC a partir de uma concentração molar de 5% da droga. O DPPC apresenta uma maior associação com a TFP que com o DIP e a CPZ, já que estas últimas duas drogas saturam a matriz do lipídio a 2% molar enquanto que a TFP o faz a 5% molar.

5.4. MISTURAS TFP/DPPG

A. Isotermas de pressão de superfície.

A Fig. 5.28 para as misturas TFP/DPPG mostra um aumento da expansão com a concentração da droga. Vale a pena destacar que esse aumento atinge valores muito grandes, por exemplo, para as altas concentrações, 20% molar, e para as baixas pressões, 1 mN/m, a expansão da monocamada relativa à do lipídio é superior a 100%, como ilustrado na Fig. 5.29 (curvas A/A_0 -vs-pressão). Para tentar entender o que ocorre nessas faixas de concentração e pressão superficial, primeiro se sabe que o DPPG é um lipídio aniônico, carregado negativamente, e que a TFP é uma droga catiônica, carregada positivamente, ambos no pH de água pura. Na Fig. 5.30 são mostradas as mudanças na ionização do DPPG para todos os pHs. Parece que na ligação desta mistura estão presentes diferentes forças: as forças eletrostáticas atrativas entre as cargas (uma parte das moléculas da TFP se liga a uma parte das moléculas do DPPG), e as forças repulsivas da dupla camada elétrica difusa. A camada formada pelo lipídio carregado negativamente atrai a atmosfera difusa dos cátions espalhados na parte mais superficial da água, mas as moléculas da TFP que conseguem ficar ligadas ao lipídio fazem com que as moléculas do PG sejam afastadas umas das outras a distâncias intermoleculares muito grandes. A área por molécula do lipídio quando puro é da ordem de $57 \text{ \AA}^2$ quando a pressão começa a subir, mas quando temos uma mistura a 20% da TFP, a pressão sobe a uma área duas vezes maior, $107 \text{ \AA}^2$. Quando as partes hidrofílicas da molécula, que interagem diretamente com a água, conseguem afastar-se uma das outras a expansão aumenta, consequência do efeito hidrofílico em que imperam as forças de hidratação repulsivas. O efeito da expansão das monocamadas já foi visto antes para o DPPG contendo sal [105]. Na água pura o lipídio está carregado negativamente e apresenta uma monocamada altamente condensada. Na presença da droga a monocamada adquire os atributos de uma expandida, ver Fig. 5.29. Existe uma dissociação ou redistribuição das cargas e o lipídio perde sua carga líquida negativa, e se aproxima da neutralidade, isto pela presença de carga oposta (devido aos contra-íons) que está muito próxima da interface ou ligada na parte polar do DPPG.

Fig. 5.28. Isoterma de pressão superficial das misturas TFP/DPPG, área por lipídio.

Fig. 5.29. Razão entre área moléculas média por DPPG das isotermas de pressão TFP/DPPG e a área do DPPG puro versus a pressão superficial.

Fig. 5.30. Representação esquemática do estado de ionização do DPPG como função do pH na interface plana. As zonas hachuradas representam os domínios de protonação-deprotonação do grupo ionizado, supondo que a ionização ocorre 2 unidades de pH em ambos lados da zona hachurada que corresponde ao pK intrínseco¹. A linha vertical preta grossa representa o pK intrínseco médio para o PG [35].

Já na Fig. 5.31 é mostrada a interação da TFP com o DPPG em uma pressão de 1 mN/m, no eixo x é relacionada a concentração molar da TFP e no eixo y a razão, A/A_0 , da área por molécula de cada mistura usando a área por lipídio, A , e a área do DPPG puro, A_0 . A partir de uma concentração 2% da droga temos um aumento quase linear da expansão da monocamada relativa ao lipídio. Por exemplo, para uma concentração a 2% da droga a expansão é da ordem de 17%, e para uma concentração maior, 20%, a expansão é da ordem de 107%. A pressões maiores, 30 mN/m, o comportamento é similar, mesmo que a expansão seja menor, ver a Fig. 5.32. Para uma concentração a 2% da droga a expansão está ao redor de 6%, e para uma concentração a 20%, a expansão é da ordem de 31%. Isto poderia ser um indicativo de que a inserção da droga, TFP, cria uma repulsão de proporções impressionantes entre as moléculas do DPPG [105]. Para 30 mN/m (fase sólida, S, da monocamada) a expansão molecular diminui, mas ainda é bastante grande. Isto ocorre porque na competição entre as forças atrativas e repulsivas as moléculas da TFP logram inserir-se na matriz do DPPG, ver como tanto na fase líquida (Fig. 5.31) quanto na fase sólida (Fig. 5.32) a expansão é quase linear.

Examinando cuidadosamente a Fig. 5.31 podemos notar que nas concentrações muito baixas há um pico não muito grande, e mesmo para a fase sólida também podemos apreciar uma ligeira descontinuidade na forma reta da Fig. 5.32. Nessa região, de concentrações muito baixas, acontece uma ligação muito forte entre as moléculas da TFP e do PG resultado do efeito cooperativo discutido no Cap. 4 para as misturas DIP/DPPC.

¹ O pK intrínseco é o valor do pH na superfície água lipídio onde metade das moléculas está protonada.

Fig. 5.31. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão TFP/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 5.32. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão TFP/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isotermas de potencial de superfície.

As isotermas de potencial de superfície TFP/DPPG, mostradas na Fig. 5.33, relacionam na abscissa a área por lipídio de cada mistura. Como no caso das misturas DIP/DPPG, a presença da TFP propicia um aumento no potencial de superfície, e para interpretar estes resultados será calculada a seguir, a variação do momento de dipolo das misturas relativo ao momento de dipolo do lipídio puro.

As medidas da variação do momento de dipolo fornecem informação sobre a ligação entre as moléculas da mistura TFP/DPPG, ver as Figs. 5.34 e 5.35, para 1 e 30 mN/m, respectivamente. Nas baixas pressões, para 1 mN/m, Fig. 5.34, o momento de dipolo apresenta um pico em 0,2% molar da TFP é de aproximadamente 20%, não desprezível. Nas concentrações intermediárias entre 1-5% molar há uma oscilação no efeito cooperativo que traz grandes mudanças. Menciona-se que tal “oscilação” não é artefato experimental, ou seja, uma pequena variação na concentração da TFP causa grandes mudanças com a inversão do sinal, $(\mu - \mu_0) < 0$. Para as altas pressões, 30 mN/m, Fig. 5.35, o pico no momento de dipolo é superior a 40% em 0,2% molar da TFP. Portanto, nas concentrações muito baixas temos um pico no momento de dipolo das misturas relativo ao do lipídio quando comparado com o momento de dipolo do DPPG puro. Voltando à Fig. 5.34, para concentrações acima de 2% molar da droga o momento de dipolo da droga relativo ao lipídio é menor que o momento de dipolo do lipídio puro. A explicação aqui é que existem forças repulsivas muito grandes nas baixas pressões (as forças de hidratação) pela presença da TFP. Para as altas pressões, ver a Fig. 5.35, na mesma região molar ocorre um aumento praticamente linear do momento de dipolo com a concentração, em que se propicia uma agregação da droga na matriz do DPPG. Esta agregação não chega a saturar a matriz do lipídio a concentrações relativamente altas, 20% molar da droga. Deve-se destacar que as medidas de pressão mostravam uma grande expansão nas baixas pressões, interpretada como sendo devida à neutralização do lipídio induzida pela presença da droga catiônica. Os nossos cálculos de momento de dipolo confirmam esta hipótese. O aumento de μ (ou do potencial) é primordialmente devido à diminuição da carga líquida negativa devida ao potencial da dupla camada (negativo), à medida que o filme vai sendo neutralizado.

Fig. 5.33. Isotermas de potencial de superfície das misturas TFP/DPPG com a abscissa sendo a área por molécula de DPPG.

Fig. 5.34. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isotermas TFP/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig. 5.35. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isoterma TFP/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

Como no caso das misturas DIP/DPPG e CPZ/DPPG, ocorre uma enorme expansão das monocamadas mistas produzida pela presença das drogas, nas pequenas pressões, mas vai diminuindo à medida que o filme vai sendo comprimido e para altas pressões, a expansão é praticamente nula no caso do DIP, moderada no caso da CPZ e relativamente grande para a TFP. Das três drogas a TFP é a que apresenta uma maior associação com o DPPG, quando o filme esta na sua fase sólida. As mudanças nas isoterma de pressão e potencial para as três drogas: DIP, CPZ e TFP, são similares, aparece uma transição de fase quando as concentrações molares dos fármacos são aumentadas, principalmente no caso da CPZ e do DIP. E as isoterma de potencial dos três sistemas mostram com maior clareza como aparece a transição de fase. O filme puro é negativamente carregado e os filmes mistos passam a serem neutros à medida em que vai sendo aumentada a concentração molar das drogas. O efeito cooperativo propicia a redistribuição das moléculas que conformam os sistemas estudados. A TFP interage mais forte com o DPPG que com o DPPC.

Capítulo 6

MISTURAS MEL E COL

MELATONINA

A melatonina (5-metoxi-N-acetiltryptamina), derivada do aminoácido triptofano, é o hormônio mais importante secretado pela glândula pineal. Este hormônio não tem ação específica, e sua participação tem sido estudada em vários processos fisiológicos, interagindo com diversos tipos de tecidos e células [106]. Embora algumas de suas funções sejam conhecidas, a maneira como a melatonina interage com as células dos tecidos não é ainda compreendida. Especula-se se a interação acontece através de um carregador que a transporta pelo fluxo sanguíneo, ou se ela se apresenta livre e interagindo diretamente com a membrana celular, ou com a intervenção de um receptor. Um estudo detalhado da influência da melatonina no nível molecular requer, portanto, a utilização de técnicas apropriadas.

O estudo da interação de melatonina com monocamadas de fosfolípidios pode vir a confirmar resultados encontrados por outras técnicas. Por exemplo, devido à solubilidade de melatonina em meio aquoso, possivelmente não é necessário um carregador para transportá-la no fluxo sanguíneo, e ainda algum mecanismo que permita ao hormônio atravessar a membrana celular e interagir com o núcleo, como sugerido por Shida et al. [107]. Não encontramos na literatura nenhum estudo de interações de melatonina com fosfolípidios através da técnica de filmes de Langmuir. Outras técnicas de estudo foram empregadas, tais como espectroscopia de RPE (ressonância paramagnética eletrônica) e espectroscopia de fluorescência estática [108]. No presente trabalho foram estudadas isotermas de pressão e potencial superficial ($\pi \times A$ e $V \times A$) de filmes de Langmuir dos fosfolípidios *DPPC* (dipalmitoil fosfatidil colina) e *DPPG* (dipalmitoil fosfatidil glicerol) puro e misto com melatonina (MEL/*DPPC*, MEL/*DPPG*) variando-se a porcentagem de melatonina na solução, de 0,1 a 20%.

A seguir serão apresentados os resultados experimentais e a discussão das medidas de pressão e potencial de superfície para as misturas MEL/*DPPC*, MEL/*DPPG*.

6.1. MISTURAS MEL/DPPC

A. Isotermas de pressão de superfície

Inicialmente serão apresentadas as isotermas de pressão das misturas MEL/DPPC. Em seguida, serão mostradas as figuras da expansão com a pressão, e da expansão com a concentração molar, curvas estas obtidas a partir das isotermas de pressão. Em um pH amplo a melatonina é neutra, ver Fig. 3.2, ou seja, as interações da MEL com o DPPC não são de caráter iônico e sim dipolo-dipolo. As isotermas de pressão das misturas MEL/DPPC são apresentadas na Fig. 6.1, em que na abscissa é representada a área por DPPC.

Fig. 6.1. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos MEL/DPPC, com a área por DPPC.

Observa-se que à medida que aumenta a concentração de MEL, a área por molécula de DPPC também aumenta. Isto indica que dois comportamentos são possíveis: a) a MEL se incorporaria na camada do lipídio, ou b) a MEL cria uma repulsão (por exemplo, eletrostática) entre as moléculas de DPPC, aumentando a área molecular média. Vale a pena destacar que para as pressões em 15, 20, 30, e 40 mN/m, a expansão da monocamada permanece praticamente constante para todas as misturas MEL/DPPC (ver Fig. 6.2). Isto significa que a droga se incorpora na matriz do lipídio e mesmo que tenhamos o filme no seu máximo estado de compressão, a quantidade de moléculas de MEL ligadas ao DPPC permanece praticamente a mesma. É sabido [109] que o colesterol produz uma expansão na monocamada do DPPE (dipalmitoil fostafatidil etanolamina) e que esta expansão propicia

uma separação das cabeças hidrofílicas (aminas) do lipídio. Além disso, a origem dessa separação é considerada uma consequência da presença de duas forças: uma eletrostática atrativa e outra devida às ligações de hidrogênio. A inserção do colesterol no fosfatidil etanolamina produz um incremento no raio das bicamadas, ordena as cadeias de hidrocarbonetos (induzindo-as à forma trans) e em geral reduz a fluidez da membrana [109]. Voltando às misturas MEL/DPPC e usando a analogia das misturas COL/DPPE, onde também ocorre uma expansão das monocamadas, podemos concluir que a MEL também fica inserida no DPPC, isto pode ser confirmado revisando a Ref. do Reiter [150] quem afirma que a MEL é capaz de proteger a membrana contra a redução da fluidez, em outras palavras, a MEL propicia uma expansão na membrana celular, a deixa mais fluida. A partir dos nossos resultados experimentais, ver Fig. 6.2, onde são relacionadas a pressão versus a razão A/A_0 para cada mistura, nota-se um aumento quase linear da expansão com a concentração a partir de 5% molar da droga. Parece que se trata de uma agregação equitativa das moléculas que partilham a monocamada MEL/DPPC.

Fig. 6.2. Razão A/A_0 , em que A é a área de cada mistura relativa ao lipídio e A_0 é a área do lipídio puro versus a pressão superficial para as misturas MEL/DPPC. Note que $A/A_0 > 1$ em todos os casos, ou seja, a MEL sempre causa expansão no filme de DPPC.

Fig. 6.3. Razão entre a área molecular média por DPPC das isothermas MEL/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m

Nas Figs. 6.3 e 6.4 são mostrados os gráficos da expansão das isothermas de pressão das misturas MEL/DPPC, em que são relacionados no eixo x a concentração da MEL e no eixo y, a razão A/A_0 , entre a área de cada mistura, A , e a área do lipídio puro, A_0 , para uma pressão superficial de 1 mN/m (LE) e no ponto da transição LE-LC. Nas duas curvas nota-se uma expansão da monocamada em todas as concentrações em moles da droga. A partir de uma concentração de 5% molar da MEL observa-se um aumento quase linear com a concentração. A concentrações muito baixas, 0,1-0,5% molar, ocorre uma descontinuidade, um pico na expansão. Este fenômeno, que não é o resultado de um artefato experimental¹, parece ser o resultado de um rearranjo de moléculas propiciado pela presença da MEL, o efeito cooperativo mencionado nos capítulos 4 e 5. A região entre 0,5-5% molares é uma região de transição. Ela separa os efeitos da melatonina nas altas e nas baixas concentrações. Para uma pressão de 30 mN/m (S), ver Fig. 6.5, nota-se o mesmo comportamento observado nas baixas pressões. O que se pode concluir neste caso é que a MEL fica na monocamada do lipídio tanto nas concentrações baixas quanto nas altas pressões. O comportamento nas altas pressões dá indícios de que a ligação, consequência da expansão, é maior à medida que aumentamos a concentração de MEL. Como já foi relatado na literatura, e mostrado antes nesta seção, também ocorre uma expansão das

¹ Ocorre em vários sistemas estudados neste trabalho, como foi mostrado nos Caps. 4 e 5 e ainda será mostrado mais adiante neste Capítulo para outras misturas.

misturas COL/DPPE, resultado da ligação do colesterol na matriz do lipídio. Ou seja, a melatonina tem uma afinidade maior com o lipídio (efeito hidrofóbico²) que com a água, já que a MEL fica ligada ao DPPC. O estudo das isotermas de pressão é limitado quanto à forma na qual a MEL se incorpora no DPPC, mas em primeira instância fornece uma informação relevante: a MEL não é dissolvida na água, se liga no lipídio. Note-se, porém, que as tentativas de obtenção de filmes de MEL pura não foram bem-sucedidas, pois a pressão de superfície não se alterava quando as barreiras eram fechadas. Isso parece indicar que toda a MEL espalhada foi dissolvida, como seria de se esperar, pois a MEL é solúvel em água [107].

Fig. 6.4. Razão entre a área molecular média por DPPC das isotermas MEL/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas no ponto da transição de fase LE-LC.

² As principais forças que atuam em lipídios neutros (zwitteriônicos) são as forças devidas às interações hidrofóbicas (devidas às ligações de hidrogênio) e as forças de hidratação estérica.

Fig. 6.5. Razão entre a área molecular média por DPPC das isothermas MEL/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isothermas de potencial de superfície

Na continuação serão mostradas as curvas do potencial de superfície e as curvas da variação do momento de dipolo com a concentração molar, obtidas a partir das isothermas de potencial em conjunto com as isothermas de pressão. A Fig. 6.6 mostra as isothermas de potencial para as misturas MEL/DPPC, em que na abscissa aparece a área por molécula de DPPC. Apresentamos nas Figs. 6.7, 6.8 e 6.9 a dependência com a concentração molar de MEL da razão entre o momento de dipolo dos filmes mistos e o do DPPC puro. Isto é feito para duas pressões superficiais diferentes (1 e 30 mN/m) e no ponto da transição de fase LE-LC (na Fig. 2.3 são esquematizadas as diferentes fases por que passa a monocamada à medida que o filme vai sendo comprimido).

Fig. 6.6: Isotermas de potencial de superfície MEL/DPPC com a abscissa sendo a área por molécula de DPPC.

Da Fig. 6.7 pode-se destacar 3 regiões de interesse: 1) para concentrações entre 0,1 e 0,5%, ocorre um aumento máximo, de aproximadamente 8%, do momento de dipolo em 0,3% de MEL, relativo ao dipolo do DPPC puro. 2) Para concentrações acima de 5% molar da MEL, o momento de dipolo é maior do que o momento de dipolo do DPPC. 3) Mas para concentrações entre 0,5 e 5% de MEL o momento de dipolo é menor do que para o DPPC puro. Isto também é evidente nas Figs. 6.8 e 6.9, que correspondem ao ponto da transição da fase LE-LC e a uma pressão de 30 mN/m, respectivamente. Pode-se concluir, portanto, que a presença de MEL na matriz do DPPC modifica o momento de dipolo: aumentando-o para as concentrações baixas e altas, mas diminuindo-o para as concentrações intermediárias. Isto parece indicar que a MEL se incorpora de forma diferente (tanto na sua orientação como nas interações) ao filme de DPPC, dependendo da sua concentração, embora as razões pelas quais isso acontece ainda não sejam conhecidas. Nas curvas da variação do momento de dipolo estudadas para as pressões 1 e 30 mN/m e na região da transição da fase LE-LC para as misturas MEL/DPPC aprecia-se uma característica em comum a partir de 5% molar da MEL: o momento de dipolo aumenta quase linearmente com a concentração, uma agregação de droga e que o aumento da quantidade de MEL é proporcional à concentração da droga.

Fig. 6.7. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas MEL/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig. 6.8. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas MEL/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais no ponto da transição da fase LE para a fase LE+LC.

Fig. 6.9. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isotermas MEL/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

A MEL permanece na interface e ligada no lipídio, DPPC, como foi mostrado a partir dos estudos das isotermas de potencial. O ordenamento molecular da MEL é igual em todas as fases de compressão do filme misto. As medidas de potencial confirmam a ligação da MEL na matriz do DPPC, deixando a matriz do lipídio mais fluida.

6.2. MISTURAS MEL/DPPG

A. Isotermas de pressão de superfície.

Na Fig. 6.10 são apresentadas as isotermas de pressão das misturas MEL/DPPG, usando a área por DPPG em cada caso. Para comparar o efeito de MEL na matriz do lipídio é mostrada a Fig. 6.11 onde no eixo x temos a pressão e no eixo y a razão, A/A_0 , entre a área por molécula de cada mistura relativa ao lipídio, A, e a área do DPPG puro, A_0 , para as misturas MEL/DPPG de 0 até 20% da droga. A baixas pressões, 1 mN/m, a expansão das monocamadas varia entre 7 e 10%, ver Fig. 6.12. Esta expansão vai diminuindo à medida que a monocamada é comprimida e já para uma pressão de 30 mN/m, a expansão varia entre 2 e 6%, conforme a Fig 6.13. A explicação para isto poderia ser que parte das moléculas de MEL vai para a subfase quando a compressão da monocamada aumenta, já que poderia ocorrer uma saturação de MEL no lipídio. Ou seja, a monocamada de lipídio

aceita uma certa quantidade de melatonina, até 5% da droga, a partir dali a expansão fica praticamente constante, e, portanto, o restante de MEL parece que vai para a água. Um efeito contrário ao das misturas MEL/DPPG acontece no caso das misturas MEL/DPPC, pois ao analisar resultados para várias pressões (1-40 mN/m), a MEL permanece na monocamada do DPPC (vide resultados na seção 6.1.A).

Fig. 6.10. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos MEL/DPPG, na abscissa é representada a área por molécula de DPPG.

Fig. 6.11. Razão entre a área molecular média por DPPG das isotermas de pressão MEL/DPPG e a área do DPPG versus a pressão superficial das misturas.

Fig. 6.12. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão MEL/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 6.13. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão MEL/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

Uma primeira conclusão que podemos tirar das isotermas de pressão das misturas MEL/DPPG é que a afinidade atinge um máximo para uma determinada concentração e que a partir daí parte da droga vai para a água. Poderiam intervir as forças de hidratação, as moléculas da melatonina gostam mais da água do que do lipídio carregado negativamente).

Já para o caso das misturas MEL/DPPC a inserção da droga no lipídio é praticamente fixa durante toda a compressão. Por exemplo, para uma concentração da droga de 20% molar, em uma pressão fixa de 1 mN/m, temos uma expansão da monocamada de aproximadamente 7% para as misturas MEL/DPPG e uma expansão da ordem de 10% para as misturas MEL/DPPC. Já em uma pressão fixa de 30 mN/m ocorre uma expansão da monocamada, relativa ao lipídio puro, de aproximadamente 2% no caso das misturas MEL/DPPG e de aproximadamente 10% no caso das misturas MEL/DPPC. Para concentrações a 5% da droga ou menores o comportamento é diferente. A afinidade da droga com o DPPG atinge um máximo de expansão da ordem de 5% para uma concentração a 5% molar de MEL o que não ocorre com a mistura MEL/DPPC na mesma concentração, onde a expansão é um pouco maior que 1%. Para as concentrações menores a expansão das misturas MEL/DPPG é maior que para o caso das misturas MEL/DPPC. Portanto, outra conclusão é que a interação de MEL com o DPPG é maior para concentrações até 5% de que com o DPPC.

O que podemos também concluir das isotermas de pressão das misturas MEL/DPPG é que a expansão é muito menor que a causada pela TFP (para 1 mN/m), quase 10 vezes menor.

B. Isotermas de potencial de superfície.

Na Fig. 6.14 são apresentadas as isotermas de potencial das misturas, MEL/DPPG, na abscissa a área por lipídio de cada mistura. Para estudar a variação do dipolo nas diferentes concentrações relativas ao lipídio, na Fig. 6.15 são mostradas na ordenada a razão, μ/μ_0 , entre o momento de dipolo de cada mistura relativo ao lipídio, μ , e o momento de dipolo do lipídio puro, μ_0 , e na abscissa a concentração molar de cada mistura para uma pressão de 1 mN/m. Ao adicionar a MEL ao DPPG ocorre um aumento significativo no momento de dipolo na região entre 0,2 e 5% molar de MEL, com um máximo em 2% molar. Aqui o momento de dipolo da mistura relativo ao lipídio é da ordem de 35% maior. Para concentrações entre 5 e 15%, o momento de dipolo vai diminuindo, chegando a um valor mínimo a 15% molar de MEL. Para essa concentração o dipolo da mistura é ligeiramente menor que o dipolo do lipídio puro. Mas no caso da mistura a 20% de MEL o momento de dipolo aumenta drasticamente, atinge um valor aproximadamente 40% maior

do que para o DPPG puro. Este comportamento é similar ao mostrado no caso das misturas CPZ/DPPG para uma pressão de 1 mN/m, ver Fig. 5.16.

Fig. 6.14. Isothermas de potencial de superfície das misturas MEL/DPPG com a abscissa sendo a área por molécula de DPPG.

Fig.6.15. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isothermas MEL/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Para uma pressão maior, 30 mN/m, ver Fig. 6.16, o momento de dipolo das misturas varia entre 20 e 35% acima daquele do DPPG puro. A distribuição da carga total líquida na interface água/cabeças hidrofílicas nas baixas pressões, é diferente nas altas. Parece que nas baixas pressões, ver Fig. 6.15, para as concentrações em moles da MEL entre 2 e 15%, ocorre uma redistribuição molecular produto das forças repulsivas, já nas altas pressões, ver Fig. 6.16, a variação no momento de dipolo é quase constante. Mas a variação é aproximadamente igual nas concentrações muito baixas, 0,2-2%, tanto nas baixas pressões quanto nas altas. Este é um indicativo de que parte das moléculas de melatonina, neutra em todos os pHs, permanece na interface ou diretamente ligada ao lipídio por baixo, principalmente devido à interação eletrostática dipolo-íon (não pode ser esquecido que o lipídio está carregado negativamente). As forças de hidratação devidas ao efeito hidrofílico propiciam perdas da MEL para o volume da água.

Fig. 6.16. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isotermas MEL/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

A MEL se liga fortemente no DPPG, nas baixas concentrações, mas nas altas ocorre uma saturação, uma parte das moléculas de MEL vai para o volume aquoso, a outra pode ficar nas camadas mais superficiais da água, e o restante ligado no lipídio, simular ao comportamento do sistema CPZ/DPPG. A MEL se associa no DPPC melhor que no DPPG.

COLESTEROL

Para entender os mecanismos que operam entre o colesterol e a membrana celular é fundamental conhecer a importância do colesterol na biologia humana, ou seja, compreender o que a célula de mamíferos, a membrana do plasma, o sistema biliar, entre outros, requerem do colesterol para seu funcionamento normal. Por outro lado, é importante investigar como o colesterol pode chegar a ser letal, já que o seu excesso no organismo pode propiciar o desenvolvimento de patologias, principalmente de origem cardíaca [110]. Desvendar os mistérios por trás desta dupla função do colesterol tem sido motivo de muito estudo e provavelmente continuará a ser por muitos anos. Mostraremos brevemente os avanços na investigação da interação do colesterol com lipídios, na forma de monocamadas de Langmuir, bicamadas (por exemplo, vesículas), e filmes Langmuir-Blodgett (LB). Nos últimos trinta anos tem sido desenvolvida uma pesquisa extensiva sobre a influência, no nível molecular, do colesterol na matriz de lipídios das membranas celulares. Um dos efeitos principais da presença do colesterol nas membranas celulares é que ele reduz ou elimina a transição de fase do estado líquido expandido (LE) para o estado líquido condensado (LC) na monocamada de Langmuir [111-116]. Nas bicamadas, o interesse tem sido focalizado principalmente na investigação da assim chamada fase líquido-ordenada (lo) das misturas de colesterol com os fosfolipídios [117-120]. Recentemente foi publicado um estudo que abrange os progressos no entendimento da associação entre o colesterol e as membranas celulares [121]. Já a produção de filmes de Langmuir-Blodgett (LB) de colesterol/fosfolipídios não é tão grande assim. Podemos destacar que foram preparados filmes LB destas misturas que poderiam vir a ser usados como dispositivos eletro-óticos [122]; também foi mostrado como a cristalização do colesterol é reduzida pela presença do lipídio [123] nos filmes LB. Em um outro trabalho, grupos ésteres (chamados de poli (3-colesteril-6-isocianohexanoato)) foram adicionados a polímeros e copolímeros para facilitar a transferência do filme da água para o substrato sólido [124].

A seguir apresentaremos os resultados experimentais e a discussão para as medidas de pressão e potencial de superfície para as misturas COL/DPPC e COL/DPPG.

6.3 MISTURAS COL/DPPC

A. Isotermas de pressão de superfície.

Inicialmente serão apresentadas as isotermas de pressão das misturas COL/DPPC. Em seguida, serão mostradas as curvas da expansão com a pressão, da expansão com a concentração molar, obtidas a partir das isotermas de pressão, e finalmente, curvas da variação do momento de dipolo com a concentração molar, obtidas a partir das isotermas de potencial em conjunto com as isotermas de pressão.

A estrutura química da molécula do COL foi mostrada na Fig. 3.2. O colesterol é uma molécula neutra em todos os pHs, suas interações com o DPPC neutro são dipolo-dipolo.

As isotermas de pressão das misturas COL/DPPC são apresentadas na Fig. 6.17 (empregando a área total conforme citado no Cap. 4). A partir de 5% do COL a transição de fase LE-LC vai sendo alargada. Para uma concentração do COL de 20% molar esta transição praticamente desaparece. Neste caso o colesterol elimina a fase gelatinosa do DPPC, e as moléculas do lipídio misturadas às do COL passam a se organizar em uma nova fase: a fase líquido-ordenada (lo) [125]. Na Fig. 6.18 são mostrados os resultados das isotermas de pressão do DPPC puro e da mistura a 20% molar do COL (área total) da literatura [114]. Estes resultados se mostram em boa concordância com os que foram obtidos neste trabalho, o início das curvas a 20% molar do COL e o do DPPC praticamente coincidem em 70 e 94 Å², respectivamente, assim como também o formato das curvas, e principalmente o desaparecimento da transição de fase para uma concentração a 20% molar do COL.

Fig. 6.17. Isoterma de pressão superficial das misturas COL/DPPC, área total.

Fig. 6.18. Isotermas de pressão superficial do DPPC puro e da mistura COL20%+DPPC80%. Figura tomada da referência [114].

Na Fig. 6.19, área por lipídio, ressalta-se que para concentrações até 5% molar do COL as monocamadas são condensadas [126]. O colesterol condensa a monocamada do DPPC, mas não faz o mesmo com outros lipídios [127]. Isto poderá ser verificado mais adiante com as isotermas COL/DPPG. Esta condensação é atribuída à presença de forças eletrostáticas atrativas entre a molécula catiônica do nitrogênio que está inserida entre os carbonos da molécula do DPPC, e o ânion formado pelo grupo fosfato da molécula do

DPPC [128]. Estes dois grupos funcionais formam um momento de dipolo permanente na cabeça do lipídio. A inserção do colesterol no lipídio não modifica substancialmente a cabeça do DPPC, não ocorrendo repulsão entre as cabeças [129, 130]. Isso pode ser verificado em nossas isotermas de pressão: até 5% molar do COL as monocamadas não sofrem expansão, como mostrado na Fig. 6.19. Por outro lado, existem estudos de espectroscopia no infravermelho e de Raman que determinam, ainda que com certa controvérsia, que o colesterol afeta a região da carbonila do DPPC [131, 132]. Além disso, o colesterol tende a alinhar na forma trans as caudas de lipídios, sempre que o comprimento da cauda não ultrapasse 16 carbonos. O COL se posiciona perpendicularmente à superfície da monocamada, melhor dizendo paralelamente às cadeias alquílicas [133, 134].

Fig. 6.19. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos COL/DPPC, com a área por molécula de DPPC na abscissa.

Na Fig. 6.20 mostramos as curvas que relacionam a pressão superficial versus a razão A/A_0 (A é a área por lipídio em cada isoterma das misturas COL/DPPC e A_0 é a área do lipídio puro) e destacamos novamente a ocorrência da diluição do colesterol no DPPC até uma concentração limite de 5% em mol do COL. Depois de 5% molar do COL as monocamadas passam a ser expandidas na fase sólida da isoterma, 30 mN/m, a expansão observada é devida à formação de agregados moleculares [135, 133], já que acima desta concentração começam a se formar regiões ricas em colesterol. Portanto temos uma ruptura da solubilidade do COL no DPPC (ver a Fig. 6.21 [136] na qual mostramos uma simulação

computacional da formação das regiões moleculares nas misturas COL/DPPC acima de 5% molar).

Fig. 6.20. Razão A/A_0 , em que A é a área de cada mistura relativa ao lipídio e A_0 é a área do lipídio puro versus a pressão superficial para as misturas COL/DPPC.

A condensação que o colesterol cria no DPPC pode ser vista nas Figs. 6.22, 6.23 e 6.24 para duas pressões superficiais diferentes, 1 e 30 mN/m, e no ponto da transição de fase LE-LC (curvas razão A/A_0 -vs-concentração molar do COL). Para uma pressão de 1 mN/m, e ainda, na transição LE-LC, a condensação ocorre até 5% molar do colesterol. A partir de 5% molar a transição de fase LE-LC vai sendo atenuada pela presença do COL. Para uma pressão maior, 30 mN/m, a condensação vai até 5% molar do COL. Pode-se notar para esta última pressão que a partir de 5% molar a expansão das monocamadas é aproximadamente linear. Isto quer dizer que o colesterol continua na matriz do DPPC. É sabido que para 20% molar do COL a monocamada tem grandes regiões ricas em colesterol com as moléculas de DPPC no seu entorno. Observar o caso na Fig. 6.21.

Fig. 6.21. Simulação computacional da agregação do colesterol no DPPC para concentrações em moles acima de 5% do COL [137].

Fig. 6.22. Razão entre a área molecular média por DPPC das isotermas COL/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 6.23. Razão entre a área molecular média por DPPC das isotermas COL/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas no ponto da transição de fase LE-LC.

Observando-se a Fig. 6.24 (curva A/A_0 -vs-concentração para 30 mN/m), a linearidade entre 5 e 15% molar do COL diminui bastante entre 15 e 20% do COL. As conclusões que podem ser tiradas destes resultados são:

1. até 5% o COL é diluído dentro da matriz do DPPC.
2. entre 5 e 15% o COL propicia uma expansão quase linear no PC.
3. a partir de 15% esta expansão quase linear tende a diminuir.

Analisando os itens 2 e 3, a primeira questão a ser colocada é: por que ocorre a linearidade nessas concentrações? Uma possível explicação para este comportamento é a de que o PC

está admitindo na sua matriz mais colesterol do que o esperado e a quase linearidade ocorre porque as zonas ricas em colesterol ainda não são suficientemente grandes para saturar a matriz do lipídio. Outra questão se refere ao item 3. Por que a quase linearidade começa a diminuir a partir de 15% do COL? Isso provavelmente está ocorrendo porque as zonas ricas em colesterol aumentam em número e em tamanho, saturando a matriz do PC e formando agregados enormes e, portanto, apresenta-se uma não homogeneidade da membrana modelo. Isto ratifica os resultados da literatura em que o DPPC aceita uma certa quantidade máxima de COL a 5% molar, ver item 1. Para ter funcionalidade o que o colesterol deve fazer na membrana é diminuir a sua fluidez e com isso dar a ela uma certa dureza ou rigidez [138], que evitaria a penetração de pequenas moléculas na monocamada do PC [139, 114]. Se isto não ocorre, então ele perde a sua funcionalidade na matriz mista.

Fig. 6.24. Razão entre a área molecular média por DPPC das isotermas COL/DPPC e a área do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isotermas de potencial de superfície

As isotermas de potencial de superfície COL/DPPC, mostradas na Fig. 6.25, relacionam na abscissa a área por lipídio de cada mistura. As curvas do potencial de superfície serão usadas para calcular o momento de dipolo para as misturas COL/DPPC.

As curvas para a variação do momento de dipolo (Figs. 6.26, 6.27 e 6.28) que correspondem às pressões de 1 e 30 mN/m e ao ponto da transição de fase LE+LC são mostradas a seguir. Para as concentrações entre 0,1-1% molar devemos destacar um pico invertido, ou seja, o momento de dipolo para cada uma dessas misturas é menor que o

momento de dipolo do lipídio puro. Novamente aqui está presente o efeito de cooperatividade, as moléculas do COL condensam as moléculas do DPPC e este efeito se estende sucessivamente até muitas e muitas moléculas do DPPC. Para as concentrações entre 2 e 15 % molares do colesterol temos um aumento praticamente linear do momento de dipolo com a concentração. A razão para este comportamento poderia ser que o DPPC admite uma certa quantidade do COL, superior à requerida, na sua matriz e o aumento da concentração propicia um aumento linear no momento de dipolo, já que existe uma certa homogeneidade na agregação do COL nas monocamadas (ver Fig. 6.22). Aqui a mistura tem regiões regulares das duas componentes. Isto parece dizer que a partição entre o COL e o DPPC tem um máximo e esse máximo chega a 15% molar do COL. Além desta concentração crítica o colesterol já não desempenha seu papel de componente fisiológico da matriz (temos uma perda da afinidade mútua entre as duas substâncias dentro da monocamada [138]). Ele passa a formar grupos isolados no lipídio cada vez maiores e perde a sua funcionalidade. A partir de 15% molar do COL o momento de dipolo diminui. Uma explicação para esta observação é que neste caso temos uma formação de agregados de colesterol. A quantidade de moléculas de colesterol ligadas entre si sobe substancialmente, e o momento de dipolo da molécula de colesterol é menor que o momento de dipolo do DPPC puro [114].

Fig. 6.25. Isotermas de potencial de superfície das misturas COL/DPPC com a abscissa sendo a área por molécula de DPPC.

Fig. 6.26. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas COL/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig. 6.27. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas COL/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem ao ponto da transição de fase LE-LC.

Fig. 6.28. Razão entre o momento de dipolo por DPPC das isothermas COL/DPPC e o momento de dipolo do DPPC puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

Conclusão

O COL condensa a matriz do DPPC até uma concentração de 5% molar. A inserção do colesterol ocorre na parte hidrofóbica do lipídio. A partir de 5% molar do COL a monocamada forma agregados ricos em colesterol, esta agregação deixa de ser homogênea e satura o lipídio. A MEL expande a monocamada do DPPC, o deixa fluido, e o COL o condensa, deixando-o rígido.

A seguir serão apresentados os resultados e a discussão para as medidas de pressão e potencial superficial para a mistura do COL com outro lipídio, o DPPG, e o roteiro seguido na análise dos resultados será o mesmo usado para as misturas COL/DPPC.

6.4. MISTURAS COL/DPPG

A. Isotermas de pressão de superfície.

Fig. 6.29. Isotermas de pressão de superfície para os filmes mistos COL/DPPG, com a área por molécula de DPPG na abscissa.

A expansão das monocamadas nas isotermas de pressão das misturas COL/DPPG é maior do que para o caso das misturas COL/DPPC, e neste caso todas as monocamadas são expandidas, ver Fig. 6.29. Isto se deve à competição entre duas ou mais forças intermoleculares. Estão presentes as forças eletrostáticas atrativas entre as cargas (as cargas do lipídio aniônico e as cargas positivas ou catiônicas provenientes da subfase que podem se ligar ao lipídio ou ficar próximas das interface), devidas à dupla camada elétrica difusa (Fig. 2.5 do Cap. 2). Há forças repulsivas devidas à hidratação, pois os grupos hidrofílicos da cabeça do DPPG tendem a gostar das moléculas da água e se repelem entre eles, portanto a ocuparem áreas moleculares médias maiores na monocamada. E o efeito hidrofóbico, em que o colesterol ao estar em contato com as moléculas de água procura rapidamente afastar-se delas, e para isso tenta achar um espaço adequado para se instalar, nesse caso passa por entre a cabeça do lipídio e se aloja na parte hidrofóbica do DPPG.

Nas misturas COL/DPPG parece que as cabeças são perturbadas (forças de hidratação) em maior escala que no caso das misturas COL/DPPC. A separação entre cada molécula da cabeça do glicerol é maior que para as colinas e a introdução do colesterol no lipídio requer uma energia maior [114], mas o aumento não é drástico. Como já foi visto, ocorre uma expansão de grandes proporções para a mistura do DPPG com algumas drogas. O destacável aqui é que a inserção do COL no DPPG acontece. Além de todas as isotermas das misturas ficarem expandidas, estas expansões não modificam a estrutura das isotermas, ocorre um deslocamento das curvas, mas o formato não muda e é igual ao do DPPG puro. Por outro lado, a expansão aumenta quase linearmente com a concentração do COL. Na Fig. 6.30, que relaciona a pressão versus a razão A/A_0 , o aumento da expansão, a partir de 1%, pode ser apreciado com maior clareza, sendo diretamente proporcional ao aumento da concentração.

Fig. 6.30. Razão entre a área média por molécula der DPPG das isotermas de pressão COL/DPPG e a área do DPPG puro versus a pressão superficial.

Uma outra característica de destaque na Fig. 6.30 é que para cada mistura a expansão da monocamada é praticamente uniforme ao longo da compressão. Isto quer dizer que o colesterol entra na matriz do DPPG e se liga ao lipídio de uma forma quase constante durante toda a compressão do filme. A expansão das isotermas aumenta com o aumento da concentração do COL. Para uma pressão de 1 mN/m a expansão é um pouco maior do que para o restante das pressões, mas isto poderia ser explicado argumentando que existe uma faixa, ou região, de acoplamento das moléculas do colesterol e das moléculas do DPPG

entre 1 e 5 mN/m. Depois desse intervalo a interação entre as moléculas praticamente não muda ao longo da compressão.

Na Fig. 6.31 é mostrada a curva que relaciona no eixo x as diferentes concentrações do colesterol, e no eixo y a razão, A/A_0 , entre a área de cada mistura, usando a área por DPPG, A , e a área por molécula do DPPG puro, A_0 , para uma pressão de 1 mN/m. Ocorre uma expansão para todas as misturas, mas à medida que a concentração do colesterol aumenta, também aumenta a expansão relativa ao DPPG. Para 1 mN/m a expansão, a uma concentração 2% molar do COL, é de aproximadamente 8%, e para uma pressão maior, 30 mN/m, a expansão é de aproximadamente 4%. Já para uma concentração de 20% do COL a expansão é da ordem de 29%, pressão de 1 mN/m. Para uma outra pressão, 30 mN/m, ver Fig. 6.32, o comportamento da curva é similar. A expansão aumenta com a concentração do colesterol, sendo de aproximadamente 24% para 20% do COL. Uma observação relevante destas duas últimas figuras é que a expansão aumenta de uma forma quase linear com a concentração. Isto poderia ser explicado dizendo que a inserção das moléculas de COL na matriz do DPPG dá lugar não a forças de caráter repulsivo, mas sim à ligação das moléculas do COL na monocamada do DPPG, como no caso do DPPC na sua parte hidrofóbica. Mas a diferença entre as misturas COL/DPPC e COL/DPPG está em que o COL condensa a matriz do DPPC até uma certa concentração molar e que a partir dali cria uma expansão nas monocamadas até um limite de aceitação entre 15-20% molar, e no DPPG ocorre uma expansão em todas as misturas, e mesmo até uma concentração de 20% do COL. Ou seja, o COL condensa o DPPC e cumpre a sua função, mas dilata o DPPG e com isto propicia uma expansão da membrana modelo que poderia dar lugar a vacâncias ou sítios intersticiais por entre os quais íons pequenos poderiam entrar. É apreciável neste caso um aumento na permeabilidade do lipídio. A expansão continua linear com a concentração e existe um balanço entre as regiões ricas em COL no DPPG, ver o caso similar das misturas MEL/DPPC, mesmo em concentrações relativamente altas, como mostram as Figs. 6.31 e 6.32. Nas concentrações muito baixas, entre 0,2-1% molar do COL, temos um pico na expansão, isto é evidente tanto nas baixas quanto nas altas pressões. Parece que nestas misturas o COL cria uma forte ligação com as moléculas do lipídio. A seguir serão estudadas as variações do momento de dipolo e poderá ser obtida informação adicional sobre como poderiam ser as ligações moleculares nas monocamadas mistas COL/DPPG.

Fig. 6.31. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão COL/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 1 mN/m.

Fig. 6.32. Razão entre a área por molécula do DPPG das isotermas de pressão COL/DPPG e a área do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para uma pressão de 30 mN/m.

B. Isotermas de potencial de superfície

Na Fig. 6.33 são apresentadas as isotermas de potencial das misturas, COL/DPPG, na abscissa a área por lipídio de cada mistura. Como no caso de todas as misturas com o DPPG o potencial sobe quando a COL é adicionada na monocamada.

Fig. 6.33. Isotermas de potencial de superfície das misturas COL/DPPG com a abscissa sendo a área por molécula de DPPG.

Nas Figs. 6.34 e 6.35 são mostradas as variações do momento de dipolo para duas pressões, 1 e 30 mN/m, com o dipolo aumentando quase linearmente a partir de 5% molar do COL. Ao serem comparadas estas últimas figuras com aquelas para as misturas COL/DPPC, existe uma diferença. Naquelas em 20% ocorria uma diminuição do momento de dipolo, pois se formavam zonas ricas em colesterol que propiciavam a diminuição do momento de dipolo. Para as misturas COL/DPPG, mesmo com 20% o momento de dipolo continua aumentando. A explicação neste caso é que a distribuição do COL dentro da matriz do DPPG é mais homogênea, quer dizer, existe um balanço entre as regiões de COL e de DPPG. Para as concentrações muito baixas o momento de dipolo tem um pico enorme, com um máximo a 0,5% molar do COL, similar ao mostrado no caso das misturas TFP/DPPG, Figs. 5.34 e 5.35. Já nas Fig. 6.31 e 6.32 foi destacado este pico, que não era tão pronunciado como aqui.

Fig. 6.34. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isotermas COL/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 1 mN/m.

Fig. 6.35. Razão entre o momento de dipolo por DPPG das isotermas COL/DPPG e o momento de dipolo do DPPG puro versus a concentração molar das misturas para cada um dos potenciais que correspondem a uma pressão fixa de 30 mN/m.

A presença do COL faz com que o momento de dipolo aumente aproximadamente em 70% quando comparado com o momento do lipídio puro. Isto confirma os nossos resultados: para as concentrações muito pequenas o COL se liga no lipídio e de uma forma muito forte, devido ao efeito cooperativo entre as moléculas do COL e do DPPG. Uma zona de transição é evidenciada para as concentrações entre 1-5% molar do COL, o momento de dipolo das misturas relativo ao lipídio é praticamente igual ao do DPPG puro. Mas a partir de 5% ocorre um aumento quase linear do momento de dipolo das misturas comparado com o momento de dipolo do lipídio puro, um outro indicativo da agregação de moléculas do COL no DPPG. As ligações entre as moléculas do colesterol e do DPPG nas baixas concentrações são tremendamente grandes, o momento de dipolo da mistura relativo ao momento de dipolo do DPPG puro comparado com o momento de dipolo do lipídio puro é enorme, isto porque o COL se liga na forma de íon-dipolo no lipídio carregado. Devemos destacar que isto ocorre tanto nas altas quanto nas baixas pressões.

Conclusão

O COL se liga homogeneamente no DPPG: A expansão nas monocamadas aumenta linearmente com a concentração molar do COL. As isotermas das misturas são similares em forma à isoterma do DPPG puro, ou seja, o COL não modifica a conformação do filme misto, ele se agrega e acondiciona seguindo as características do DPPG. Nas baixas concentrações aparece um pico muito pronunciado produto da forte ligação do COL no DPPG, o efeito cooperativo funciona aqui da mesma maneira que nos outros sistemas estudados. O COL condensa o DPPC e expande o DPPG,

Capítulo 7

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Para sumarizar as principais conclusões obtidas neste trabalho de tese, iniciamos com uma análise comparativa dos efeitos de expansão (ou condensação) de filmes de Langmuir de DPPC e DPPG, causados pelas cinco substâncias investigadas, DIP, CPZ, TFP, MEL e COL, bem como sua influência no potencial de superfície.

De maneira geral, a interação dessas substâncias classifica-as em dois grupos distintos. Os fármacos DIP, CPZ e TFP (todos são moléculas carregadas positivamente na água pura) têm ação similar sobre filmes de DPPC e DPPG. Já a MEL e COL (moléculas neutras no pH da água) são diferentes. Sabemos pela literatura que o COL se liga na parte hidrofóbica dos lipídios, parece que a MEL faz o mesmo com o DPPC, e com o DPPG (em uma forma mais restrita).

Conclusões gerais

Um resultado observado para todas as substâncias investigadas, tanto na interação com DPPC e DPPG, foi o efeito considerável nas isotermas de pressão e de potencial em concentrações muito baixas das substâncias, tipicamente menores do que 0,4 ou 0,5 mol% [146, 147]. Com quantidades tão pequenas de substâncias, as mudanças induzidas nas propriedades das monocamadas só são possíveis a partir de um efeito cooperativo, segundo o qual as (poucas) moléculas de fosfolipídio que interagem diretamente com uma determinada substância acabam influenciando suas vizinhas. Em alguns casos particulares, o interessante é que nessa região de baixas concentrações, pequenas mudanças na quantidade de substância provocavam até uma inversão da tendência de aumento (ou diminuição) do momento de dipolo. É como se houvesse uma instabilidade no arranjo substância/fosfolipídio, uma vez que adição de um pouco mais de substância chega a inverter seu efeito. Como já enfatizado na Introdução, a correlação entre os efeitos de substâncias biológicas em filmes de fosfolipídios e sua ação fisiológica não é direta. Entretanto, sabe-se que nos sistemas fisiológicos substâncias, como os fármacos, agem eficientemente mesmo quando em minúsculas concentrações. Por exemplo, uma dose de fármaco representaria no organismo humano uma concentração muitíssimo menor do que as utilizadas nos experimentos realizados aqui. Uma possibilidade para essa constatação é que proteínas participam da ação farmacológica, e, portanto, a interação com o fosfolipídio seria amplificada numa membrana real. Os resultados obtidos aqui, entretanto, mostram que um efeito cooperativo entre as moléculas de fosfolipídio também pode ser responsável por esta amplificação de efeitos. Note, por exemplo, que em alguns casos de interação estudados as maiores mudanças nas propriedades dos

filmes de Langmuir de DPPC ou DPPG se deram nas concentrações de 0,2 – 0,4 %, apesar de terem sido investigadas concentrações de até 20%.

A interação das substâncias foi diferente para os filmes de Langmuir de DPPC e DPPG, como talvez pudesse ser esperado, uma vez que sobre água pura o DPPC é neutro e o DPPG é carregado negativamente. Os fármacos DIP, CPZ e TFP interagiram apenas com a cabeça do DPPC, e são expulsos – em quase toda sua totalidade – sob altas pressões. Há um limite máximo de droga que afeta a monocamada, após o qual as moléculas da droga devem ir para a subfase. As alterações no momento de dipolo, causadas pela incorporação de drogas, devem estar ligadas principalmente à mudança na contribuição do dipolo iônico (zwitterion). A MEL e o COL logram inserir-se na membrana modelo, não havendo saturação nos efeitos induzidos para concentrações de até 20% (máxima investigada). O COL apresenta a peculiaridade de condensar a camada de DPPC em baixas concentrações. Quanto ao potencial de superfície, para o COL há o efeito adicional da formação de ilhas ricas em colesterol, que faz com que haja uma reversão da tendência no aumento do momento de dipolo quando se adiciona mais COL para altas concentrações. Para o DPPG, não há saturação, com a concentração, do efeito das drogas DIP, CPZ e TFP, uma vez que estas estão positivamente carregadas. Em altas pressões, há perdas de moléculas para a subfase na ordem crescente de TFP, CPZ e DIP. Os efeitos no potencial de superfície são basicamente devidos à compensação da carga aniônica do DPPG, o que faz com que o potencial aumente em virtude do decréscimo da contribuição (negativa) da dupla camada. O COL também não tem saturação de seu efeito com a concentração. Já a MEL surpreendentemente apresenta tal saturação, ao contrário do que ocorria com o sistema MEL/DPPC.

É importante ressaltar a originalidade dos trabalhos realizados aqui. Embora a interação de substâncias biológicas com filmes de fosfolípidios venha sendo estudada há décadas (ver, por exemplo, [148]), o estudo minucioso de isotermas de pressão e potencial de superfície, para várias substâncias, não tem precedentes. A começar pela abordagem escolhida de co-espalhamento da substância com o fosfolípido, em vez da adsorção a partir de material dissolvido na subfase [149]. O co-espalhamento tem a vantagem de que fornece a quantidade exata de substância que está interagindo com o filme de Langmuir.

Para os compostos já investigados anteriormente, como o DIP e o COL, o presente trabalho se destaca ao apresentar resultados inéditos principalmente em uma região de concentrações muito baixas, entre 0,1-0,5% molar. Assim, mesmo para estes compostos fica garantido o ineditismo. Para as demais substâncias, os resultados são quase todos inéditos.

Os objetivos de longo prazo dessa área de pesquisa, que talvez pudesse ser classificada como pertencendo à biofísica molecular, estão diretamente relacionados às tentativas de descobrir

os mecanismos de interação de fármacos, com as membranas celulares. Esses objetivos ainda não podem ser atingidos, com o estado atual de desenvolvimento de filmes de Langmuir, pois falta bastante para mimetizar membranas reais no laboratório. E ainda que seja possível controlar todos os parâmetros e condições experimentais, a fim de produzir filmes de Langmuir que possam simular em uma forma mais realista uma membrana natural, faltaria ainda interpretar os resultados de tal forma que seja possível chegar a entender o que o ocorre no nível molecular nas interações entre as membranas naturais e, por exemplo, alguns fármacos. Um passo importante nessa direção, entretanto, é empregar sistemas simplificados que dão uma idéia qualitativa do que poderia acontecer na natureza. Desse ponto de vista, não temos dúvida em afirmar que os estudos apresentados aqui representam as contribuições mais avançadas para a compreensão da interação de substâncias biológicas com filmes de fosfolípidios. Isso se deve não só ao trabalho diretamente envolvido nesta tese, mas também à colaboração com outros grupos de pesquisa, que permitiram a utilização de variadas técnicas experimentais de caracterização. Por exemplo, poder afirmar que uma substância se acopla a um determinado grupo da cabeça hidrofílica do fosfolípido, como pudemos fazê-lo para o sistema DIP/DPPC, ainda não é uma possibilidade real em trabalhos da literatura.

Menciona-se também a importância da constatação dos efeitos cooperativos, que dão informação de como quantidade muito pequenas de uma biomolécula interagindo com membranas modelo propiciam uma reação em cascata na matriz do lípido, de tal forma que uma biomolécula poderia chegar a afetar umas 100 moléculas de lípido e assim modificar em uma escala macroscópica os valores medidos da pressão e do potencial superfície, assim como a morfologia dos domínios estruturais via microscopia de fluorescência. Poderia ocorrer condensação ou expansão dos filmes de Langmuir devido à cooperatividade.

Perspectivas

Já foi possível determinar a localização do DIP e a TFP (as medidas com a TFO são recentes) na matriz do DPPC, ver anexo I, mas para isto foi preciso além do uso das isotermas de pressão e potencial de Langmuir, usar outras técnicas de caracterização *in situ*, como, por exemplo, a microscopia de fluorescência que permite distinguir os tamanhos dos domínios com ou sem moléculas biologicamente ativas na matriz dos lípidios. Neste trabalho foram estudados 10 sistemas biomoléculas/lípidios. Uma perspectiva para o futuro é de se caracterizar via microscopia de fluorescência e de outras técnicas, tais como, FTIR, refletividade e difração de raios X usando incidência rasante, os sistemas restantes para saber com exatidão em que posição na monocamada de lípidios as drogas se alojam.

Referências

- [1] E. Wajsborg, M. Tabak, P. A. Nussenzveig, C. M. B. Lopes e S. R. W. Louro, *Biochim. Biophys. Acta*, **944**(1988)185.
- [2] G. P. Borissvitch, M. Tabak, I. E. Borissevitch, e O. N. Oliveira Jr., *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, **7** (1996) 69.
- [3] G. P. Borissevitch, M. Tabak, e O. N. Oliveira Jr. *Biochim. Biophys. Acta*, **1278** (1996) 12.
- [4] G.A. Fitzgerald, *N. Engl. J. Med.*, **316** (1987) 1247.
- [5] D. Steinberg, J.A. Berliner et al., *Circulation*, **85** (1992) 2338.
- [6] H.X. Chen, U. Bamberger, A. Heckel, X. Guo e Y.C. Cheng, *Cancer Res.*, **53** (1993) 1974.
- [7] N. Ramu e A. Ramu, *Int. J. Cancer*, **43** (1989) 487.
- [8] L.P. Davies e V. Huston, *Eur. J. Pharmacol.*, **73** (1981) 209.
- [9] I.E. Borissevitch, C.P.F. Borges, V.E. Yushmanov e M. Tabak, *Biochim. Biophys. Acta*, **1238** (1995) 57.
- [10] I.E. Borissevitch, C.P.F. Borges, G.P. Borissevitch, V.E. Yushmanov, S.R.W. Louro e M. Tabak, *Z. Naturforsch.*, **51C** (1996) 578.
- [11] C.P.F. Borges, I.E. Borissevitch e M. Tabak, *J. Luminesc.*, **65** (1995) 105.
- [12] P.M. Nassar, L.E. Almeida e M. Tabak, *Biochim. Biophys. Acta*, **1328** (1997) 140.
- [13] P.M. Nassar, L.E. Almeida e M. Tabak, *Langmuir* **14** (1998) 6811.
- [14] E. von Gerlach, B. Deuticke e F.W. Koss, *Arzneim. Forsch.*, **15** (1965) 558.
- [15] L. Iuliano, F. Violi, A. Ghiselli, C. Alessandri e D. Bolsano, *Lipids*, **24** (1989) 430.
- [16] L. Iuliano, D. Praticò, A. Ghiselli, M. Bonavita e F. Violi, *Lipids*, **27** (1992) 349.
- [17] L. Iuliano, A.R. Colavita, R. Leo, D. Praticò e F. Violi, *Free Rad. Biol. Med.*, **22** (1997) 999.
- [18] M.F. Nepomuceno, A. Alonso, L. Pereira-da-Silva e M. Tabak, *Free Rad. Biol. Med.*, **23** (1997) 1046.
- [19] M.F. Nepomuceno, M.E.O. Mamede, D.V. Macedo, A. A. Alves, L. Pereira-da-Silva e M. Tabak, *Biochim. Biophys. Acta*, **1418** (1999) 285.
- [20] E. Wajsborg, M. Tabak, P. A. Nussenzveig, C. M. B. Lopes e S. R. W. Louro, *Biochim. Biophys. Acta*, **944**(1988) 185.
- [21] W. Y. Cheung. *Science*, **207** (1980) 19.
- [22] Baldessarini RJ (1985). Em: Gilman AG, Goodman LS, Tal TW e Murad F (Editores), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McMillan Publishing Co., New York, 387-397].
- [23] Asari, H., Anasi, D., e Bachuaroff, R. *J. Transplantation*, **37** (1984) 113-114.
- [24] Reiter, R. *J. Endocrine Rev.* **12** (1991) 151-180.
- [25] Binkley, S. (1988). Em: *The Pineal Endocrine and Neuroendocrine Function*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- [26] Vivien-Roels, B. e Pevet, P. *Experientia* **49** (1993) 642-647.
- [27] Poeggeler, B., Balzer, I., Hardland, R. e Lercht, A. *Gonyaulax polydras. Naturwissenschaften* **78** (1991) 268-269.
- [28] Manchester, L. C., Poeggeler, B. Alvares, F. L., Ogden, G. B. e Reiter R. *J. Cell. Mol. Biol. Res.* **41** (1995) 391-395.
- [29] Tilden, A. R., Becker, M. A., Amma, L. L., Arceniega e J. E McGaw, A. K. *J. Pineal Res.* **22** (1997) 102-106.
- [30] Hattori, A., Migitaka, H., Masayake, I., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T. and Reiter, R. *J. Biochem. Mol. Biol. Int.* **35** (1995) 627-634.
- [31] Murch, S. J., Simmons, C. B. e Saxena, P. K. *Lancet* **350** (1997) 1598-1599.
- [32] Pratt, W. B. Taylor, P., Eds. Em: *Principles of Drug Action; The Basis of Pharmacology*, 3rd. Ed. Churchill Livingstone, New York, 1990.
- [33] O. N. Oliveira Jr. PhD Thesis, Bangor, Reino Unido, 1990.
- [34] A. Cavalli, Tese de Doutorado, São Carlos, Brasil, 1997.
- [35] J. F. Tocanne e J. Teissié, *Biochim Biophys. Acta*, **1031** (1990) 187.
- [36] R. J. Demchak e T. J. Fort, *J. Coll. and Interf. Sci.*, **46** (1974) 191.
- [37] G. Gouy, *Phys. J.*, **9** (1910) 457.
- [38] J. T. Davies e E. K. Rideal, *Interfacial Phenomena*, Academic Press Inc. San Diego, EUA, 1962.
- [39] A. J. Hulbert, e P. L. Else, *J. theor. Biol.*, **199** (1999) 257.

- [40] M. Kates, E. L. Pugh, e G. Ferrante, Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. Em: *Biomembranes*, vol. 12: *Membrane Fluidity* (M. Kates, e L. A. Manson, eds.), p. 379-395. New York: Plenum Press.
- [41] A. L. Leikin, e R. R. Brenner, *Biochim. Biophys. Acta*, **1005** (1989) 187.
- [42] Z. G. Wang e S. A. Rice, *J. Chem. Phys.*, **88** (1988) 1298.
- [43] G. A. Hawkins e G. B. Benedek, *Phys. Rev. Lett.*, **32** (1974) 524.
- [44] B. Stoeckly, *Phys. Rev. A.*, **15** (1977) 2550.
- [45] J. Popielawski e S. A. Rice, *J. Chem. Phys.*, **88** (1988) 1279.
- [46] C. M. Roland e M. J. Zuckermann, *J. Chem. Phys.*, **86** (1987) 5852.
- [47] S. Ohki, *J. Theor. Biol.*, **15** (1967) 346.
- [48] J. L. Firpo, J. J. Dupin, G. Albinet, A. Bois, L. Casalta e J. F. Baret, *J. Chem. Phys.*, **68** (1978) 1369.
- [49] J. P. Bareman, G. Cardini e M. L. Klein, *Phys. Rev. Lett.*, **60** (1988) 2152.
- [50] F. A. M. Leermakers e J. M. H. M. Schoutjens, *J. Chem. Phys.*, **89** (1988) 3264.
- [51] D. Andelman, F. Brochard e J. F. Joanny, *J. Chem. Phys.*, **86** (1987) 3673.
- [52] J. P. Legre, G. Albinet e A. Caillé, *Can. J. Phys.*, **60** (1982) 893.
- [53] B. Y. T. Yue, C. M. Jackson, J. A. G. Taylor, J. Mingins e B. A. Pethica, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1**, **72** (1976) 2685.
- [54] J. A. G. Taylor, J. Mingins e B. A. Pethica, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1**, **72** (1976) 2694.
- [55] J. Mingins, J. A. G. Taylor, B. A. Pethica, C. M. Jackson, J. e B. Y. T. Yue, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1**, **78** (1982) 223.
- [56] A. Fischer, M. Lösche, H. Möhwald, e E. Sackmann, *Thin Solid Films*, **45** (1984) L785.
- [57] W. M. Heckl, A. Müller e H. Möhwald, *Thin Solid Films*, **159** (1988) 125.
- [58] M. Lösche, C. Helm, H. D. Mattes e H. Möhwald, *Thin Solid Films*, **133** (1985) 51.
- [59] M. Lösche e H. Möhwald, *Rev. Sci. Instrum.*, **55** (1984) 1968.
- [60] J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen e M. J. Zuckermann, *Can. J. Chem. Phys.* **91** (1989) 1855.
- [61] P. E. Forsyth, S. Marcelja D. J. Mitchell e B. W. Nihnam, *Biochim. Biophys. Acta*, **469** (1977) 335.
- [62] J. M. Boggs, *Biochim. Biophys. Acta*, **906** (1987) 353.
- [63] J. A. Cohen e M. Cohen, *Biophys. J.*, **36** (1981) 623.
- [64] D. E. Amory, e J. E. Dufey, *Bioenerg. Biomembr.*, **17** (1985) 151.
- [65] H. Hauser, *Biochim. Biophys. Acta*, **772** (1984) 37.
- [66] M. M. Sacré e J. F. Tocanne, *Chem. Phys. Lipids*, **18** (1977) 334.
- [67] O. N. Oliveira Jr., A. Riul Jr., G. F. L. Ferreira, *Thin Solid Films*, **242-244** (1992) 239.
- [68] O. N. Oliveira Jr., D. M. Taylor e H. Morgan, *Thin Solid Films*, **210** (1992) 76.
- [69] V. B. P. Leite, A. Cavalli e O. N. Oliveira Jr. *Phys. Rev. E.*, **57**: (1998) 6835.
- [70] S. V. Melo, Tese de Doutorado, São Carlos, Brasil, 1999.
- [71] M. Sinenski, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, *J. Biol. Chem.*, **254** (1979) 9135.
- [72] G. G. Roberts, *Langmuir-Blogett Films*, ed. Plenum Press, New York, 1990.
- [73] J. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, Academic Press, Seg. Ed., Califórnia, USA, 1992, p. 378.
- [74] O. Albrecht, H. Gruler e E. Sackmann, *Phys. J.*, **39** (1978) 301.
- [75] Manual de Instruções do Banho de Circulação Refrigerado, Serie RTE.
- [76] Manual de Manutenção e Operação do Sistema Compacto MILLI-Q UV PLUS.
- [77] R. J. Archer e V. K. LaMer, *J. Phys. Chem.*, **59** (1954) 807.
- [78] J. B. Bateman e G. T. Barnes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45** (1959) 1274.
- [79] J. H. Broock e A. E. Alexander, *J. Phys. Chem.*, **66** (1962) 1851.
- [80] M.C. Philips e D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, **163** (1968) 301.
- [81] O. Albrecht, H. Gruler e E. Sackmann, *J. Physique (France)*, **39** (1978) 301.
- [82] W.M. Heckl, M. Lösche, H. Scheer e H. Möhwald, *Biochim. Biophys. Acta*, **810** (1985) 73.
- [83] G.P. Borissevitch, M. Tabak e O.N. Oliveira Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **1278** (1996) 12.
- [84] M. Weygand, B. Wetzler, D. Pum, U.B. Sleytr, K. Kjaer, P.B. Howes e M. Lösche, *Biophys. J.*, **76** (1999) 458.
- [85] G.P. Borissevitch, M. Tabak, I.E. Borissevitch e O.N. Oliveira Jr., *Colloids Surf. B*, **7** (1996) 69.
- [86] R. Mendelsohn, J.W. Brauner and A. Gericke, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **46** (1995) 305.
- [87] D.A. Cadenhead, F. Müller-Landau e B.M.J. Kellner, Em *Ordering in Two Dimensions*, S.K. Sinha (Eds.), Elsevier North Holland, Amsterdam 1980, 73.
- [88] V.L. Shapovalov, E.A. Kotova, T.I. Rokitskaya e Y.N. Antonenko, *Biophys. J.*, **77** (1999) 299.

- [89] V. Vogel e D. Möbius, *Thin Solid Films*, **159** (1988) 73.
- [90] R. Cseh e R. Benz, *Biophys. J.*, **77** (1999) 1477.
- [91] J.-F. Tocanne e J. Tessié, *Biochim. Biophys. Acta*, **1031** (1990).
- [92] J.G. Petrov, E.E. Polymeropoulos e H. Möhwald, *J. Chem. Phys.*, **100** (1996) 9860.
- [93] B. Bechinger e J. Seelig, *Biochemistry*, **30** (1991) 3923.
- [94] K.A. Dill e D. Stigter, *Biochemistry* **27** (1988) 3446.
- [95] M. Lösche, E. Sackmann e H. Möhwald, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **87** (1983) 848.
- [96] M. Dennin e C.M. Knobler, *Phys. Rev. Letters*, **78** (1997) 2485.
- [97] W. Cactano, M. Ferreira, M. Tabak, M. I. Mosquera Sanchez, O. N. Oliveira Jr., P. Krüger, M. Schälke, e M. Lösche, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, submetido para publicação.
- [98] P. Krüger, *Phys. Rev. E* (2000) submitted.
- [99] R.M. Weis e H.M. McConnell, *Nature*, **310** (1984) 47.
- [100] D.J. Keller, H.M. McConnell e V.T. Moy, *J. Phys. Chem.*, **90** (1986) 2311.
- [101] C.R. Flach, J.W. Brauner e R. Mendelsohn, *Biophys. J.*, **65** (1993) 1994.
- [102] G. Büldt, H.U. Gally, J. Seelig e G. Zaccari, *J. Mol. Biol.*, **134** (1979) 673.
- [103] M. Schälke, P. Krüger, M. Weygand e M. Lösche, *Biochim. Biophys. Acta*, **1464** (2000) 113.
- [104] G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**(1990) 382.
- [105] M. M. Sacré e J. F. Tocanne, *Chem. Phys. Lipids*, **18** (1977) 334.
- [106] R. J. Reiter, *Bioessays*, **14** (1992) 169.
- [107] C. S. Shida, A. M. L. Castrucci, e M. T. Lamy Freund, *Journal of Pineal Research*, **16**, (1994) 198.
- [108] C. S. Shida, Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Instituto de Física de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- [109] P.L. Yeagle em "Cholesterol and the Cell Membrane", ed. por P.L. Yeagle, (CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1988, p. 213).
- [110] P. L. Yeagle, *Biochim. Biophys. Acta*, **822** (1985) 267.
- [111] O. Albrecht, H. Gruler, e E. Sackmann, *J. Colloid Interface*, **79** (1980) 319.
- [112] S. Subramaniam e H. M. McConnell, *J. Phys. Chem.*, **91** (1987) 1715.
- [113] M. J. Gálvez-Ruiz e M. A. Cabrerizo-Vílchez, *Thin Solid Films.*, **210/211**(1992) 127.
- [114] H. Mozaffary, *Thin Solid Films.*, **244** (1994) 874.
- [115] J. M. Smaby, M. M. Momsen, H. L. Brockman, e R. E. Brown, *Biophys. J.*, **73** (1997) 1492.
- [116] L-A. D. Worthman, K. Nag, P. J. Davis, e K. M. W. Keough, *Biophys. J.*, **72** (1997) 2569.
- [117] T. J. McIntosh, *Biochim. Biophys. Acta*, **513** (1978) 43.
- [118] J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström e M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta*, **905** (1987) 162.
- [119] K. Tu, M. L. Klein, e D. J. Tobias, *Biophys. J.*, **75** (1998) 2147.
- [120] C. Gliss, O. Randel, H. Casalta, E. Sackmann, R. Zorn, e T. Bayerl, *Biophys. J.*, **77** (1999) 331.
- [121] T. P. W. McMillen, e R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1** (1996) 83.
- [122] A. Simmer e ^a Offenhäusser, *Thin Solid Films*, **327-329** (1998) 753.
- [123] S. Lafont, H. Rapaport, G. J. Sömjén, A. Renault, P. B. Howes, K. Kjaer, J. Als-Nielsen, L. Leiserowitz, e M. Lahav, *J. Phys. Chem.*, **B. 102** (1998).
- [124] M. N. Teerenstra, E. J. Vorenkamp, A. J. Schouten, R. J. M. Nolte, C. A. van Walree, J. F. van der Pol, e J. W. Zwikker, *Thin Solid Films*, **210/211** (1992) 496.
- [125] K. Tu, M.L. Klein, e J. Tobias, *Biophys. J.*, **75** (1998) 2147.
- [126] S.W. Hui em "The Spatial Distribution of Cholesterol in Membranes", ed. por P.L. Yeagle, (CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1988, p. 213).
- [127] P.L. Yeagle em "Cholesterol and the Cell Membrane", ed. por P.L. Yeagle, (CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1988, p. 213).
- [128] M. F. Brown e J. Seelig, *Biochemistry*, **17** (1978) 381.
- [129] J. C. Shepherd e G. Buldt, *Biochim. Biophys. Acta*, **558** (1979) 41.
- [130] S. F. Bush, H. Levin e I. W. Levin, *Chem. Phys. Lipids*, **27** (1980) 101.
- [131] E. B. Brown e K. G. Brown, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94** (1980) 638.
- [132] M. G. Taylor, T. Akiyama e I. C. P. Smith, *Chem. Phys. Lipids*, **29** (1981) 327.
- [133] D. A. Cadenhead e F. Muller-Landau, *Chem. Phys. Lipids*, **25** (1979) 329.
- [134] T. N. Estep, D. B. Mountcastle, R. L. Biltonen e T. E. Thompson, *Biochemistry*, **17** (1978) 1984.
- [135] G. Smurzer, B. Crawford e P. L. Yeagle, *Biochim. Biophys. Acta*, **862** (1986) 361.
- [136] K. E. Bloch, *CRC Crit. Ver. Chem.*, **249** (1974) 4267.

- [137] B. Snyder e E. Freire, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **77** (1980) 4055.
- [138] R. A. Demel, K. R. Bruckdorfer e L. L. M. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta.*, **255** (1972) 321.
- [139] D. Papahadjopoulos, S. Nir e S. Ohki, *Biochim. Biophys. Acta*, **266** (1971) 561.
- [140] E. Burlakova, *Herald of the Russian Academy of Sciences*. **64** (1994) 205.
- [141] N. P. Pal'mina, E. L. Mal'tseva, N. V. Kurnakova e E.B. Burlakova, *Biochemistry*. **59** (1994) 135.
- [142] A. Doisy, J. E. Proust, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, e J. L. Dubois, *Langmuir* **12** (1996) 6098.
- [143] A. Seelig, *Biochim. Biophys. Acta*. **899** (1987) 9.
- [144] R. J. Reiter, *Progress in Neurobiology*, **56** (1998) 359.

Anexo 1

As drogas (DIP, CPZ e TFP, catiônicas) interagem diretamente com o grupo fosfato (negativo) que está ubicado na cabeça do fosfolípido DPPC. Os resultados das isotermas de Langmuir são consistentes com os resultados de FTIR e microscopia de difração. Os resultados de FTIR e microscopia com a CPZ e a TFP são recentes. As medidas de FTIR indicam que o DIP, a concentrações baixas, interage diretamente com a cabeça do DPPC, mas a concentrações altas, quase todo vai para o volume e uma pequena parte fica nas camadas mais superficiais da água. Por outro lado, os resultados de FTIR indicam que a TFP e a CPZ interagem com a cabeça do lipídio, nas baixas e nas altas concentrações. Para determinar a localização das drogas no filme do DPPC são necessarias as isotermas de Langmuir, para saber se existe interação, as de FTIR, para saber com que grupo do DPPC interagem as drogas e as medidas de microscopia de fluorescência, para saber a morfologia da monocamada mista, que é diferente daquela do filme do lipídio puro. A seguir será mostrada uma figura esquematizada da ubicação das drogas no DPPC.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1- Esquema de uma molécula anfifílica..... 7

Fig. 2.2- Diagrama esquemático da cuba de Langmuir..... 9

Fig. 2.3- Isoterma de pressão do DPPC puro..... 10

Fig. 2.4- Isoterma de pressão do DPPG puro..... 11

Fig. 2.5- Esquema de um arranjo de lipídios aniônicos ionizados..... 15

Fig. 2.6- Isoterma de potencial do DPPC puro..... 18

Fig. 2.7- Isoterma de potencial do DPPG puro.....18

Fig. 3.1- Estruturas químicas do DPPC e DPPG.....23

Fig. 3.2- Estruturas químicas do DIP, TFP, COL, CPZ e MEL.....24

Fig. 3.3- Isotermas de pressão e potencial do DPPC puro.....27

Fig. 3.4- Isotermas de pressão e potencial do DPPG puro.....28

Fig. 3.5- Isoterma de pressão do DPPG puro, referência.....28

MISTURAS DIP/DPPC

Fig. 4.1- Isotermas de pressão, área total.....30

Fig. 4.2- Isotermas de pressão, área por lipídio..... 31

Fig. 4.3- Ampliação na transição de fase LE-LE da Fig. 4.1.....33

Fig. 4.4- Variação da pressão de superfície no potno da transição de fase LE+LC.....33

Fig. 4.5- Uma isoterma de pressão e a curva de velocidade para o DPPC puro,	34
Fig. 4.6- Isotermas de pressão e potencial do DPPC puro mostrando o colapso da monocamada.....	35
Fig. 4.7- Expansão versus pressão.....	37
Fig. 4.8- Expansão versus concentração para 1 mN/m.....	37
Fig. 4.9- Expansão versus concentração no ponto da transição de fase LE-LC	38
Fig. 4.10- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	38
Fig. 4.11- Isoterma de potencial de superfície.....	40
Fig. 4.12- Variação do momento de dipolo para 1 mN/m.....	40
Fig. 4.13- Variação do momento de dipolo no patamar.....	41
Fig. 4.14- Variação do momento de dipolo para 30 mN/m.....	41
MISTURAS DIP/DPPG	
Fig. 4.15- Isoterma de pressão área por lipídio.....	48
Fig. 4.16- Expansão versus pressão DIP/DPPG.....	49
Fig. 4.17- Expansão versus concentração, 1 mN/m DIP/DPPG.....	49
Fig. 4.18- Expansão versus concentração, 20mN/m DIP/DPPG.....	50
Fig. 4.19- Isotermas de potencial de superfície.....	51
Fig. 4.20- Variação do momento de dipolo das misturas DIP/DPPG (1mN/m).....	51
Fig. 4.21- Variação do momento de dipolo das misturas DIP/DPPG (30mN/m).....	52
MISTURAS CPZ/DPPC	
Fig. 5.1- Isotermas de pressão de superfície	54

Fig. 5.2- Ampliação da figura 5.1.....	54
Fig. 5.3- Expansão versus pressão.....	55
Fig. 5.4- Expansão versus concentração para 1 mN/m.....	55
Fig. 5.5- Expansão versus concentração no ponto da transição de fase LE-LC	56
Fig. 5.6- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	56
Fig. 5.7- Isoterma de potencial de superfície.....	57
Fig. 5.8- Variação do momento de dipolo para 1 mN/m.....	57
Fig. 5.9- Variação do momento de dipolo no patamar.....	58
Fig. 5.10- Variação do momento de dipolo para 30 mN/m.....	58
MISTURAS CPZ/DPPG	
Fig. 5.11- Isotermas de pressão de superfície, área por lipídio.....	59
Fig. 5.12- Expansão versus pressão.....	60
Fig. 5.13- Expansão versus concentração (1 mN/m).....	60
Fig. 5.14- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	60
Fig. 5.15- Isotermas de potencial de superfície.....	62
Fig. 5.16- Variação do momento de dipolo, 1 mN/m.....	62
Fig. 5.17- Variação do momento de dipolo, 30 mN/m.....	63
MISTURAS TFP/DPPC	
Fig. 5.18- Isotermas de pressão de superfície, área por lipídio.....	65
Fig. 5.19- Ampliação da Fig. 5.19 na região do patamar.....	65

Fig. 5.20- Expansão versus pressão.....	66
Fig. 5.21- Expansão versus concentração para 1 mN/m.....	66
Fig. 5.22- Expansão versus concentração no ponto da transição de fase LE-LC	66
Fig. 5.23- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	68
Fig. 5.24- Isoterma de potencial de superfície.....	68
Fig. 5.25- Variação do momento de dipolo para 1 mN/m.....	69
Fig. 5.26- Variação do momento de dipolo no ponto da transição de fase LE-LC.....	69
Fig. 5.27- Variação do momento de dipolo para 30 mN/m.....	70

MISTURAS TFP/DPPG

Fig. 5.28- Isotermas de pressão de superfície, área por lipídio.....	72
Fig. 5.29- Expansão versus pressão (1 mN/m).....	72
Fig. 5.30- pH na interface água/lipídio para a molécula de DPPG.....	73
Fig. 5.31- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	74
Fig. 5.32- Isotermas de potencial de superfície.....	74
Fig. 5.33. Isotermas de potencial de superfície.....	76
Fig. 5.34-Variação do momento de dipolo,1 mN/m.....	76
Fig. 5.35- Variação do momento de dipolo, 30 mN/m.....	77

MISTURAS MEL/DPPC

Fig. 6.1- Isotermas de pressão de superfície	79
Fig. 6.2- Expansão versus pressão.....	80
Fig. 6.3- Expansão versus concentração para 1 mN/m.....	81

Fig. 6.4- Expansão versus concentração no ponto da transição de fase LE-LC	82
Fig. 6.5- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	83
Fig. 6.6- Isoterma de potencial de superfície.....	84
Fig. 6.7- Variação do momento de dipolo para 1 mN/m.....	85
Fig. 6.8- Variação do momento de dipolo no ponto da transição de fase LE-LC.....	85
Fig. 6.9- Variação do momento de dipolo para 30 mN/m.....	86

MISTURAS MEL/DPPG

Fig. 6.10- Isotermas de pressão de superfície, área por lipídio.....	87
Fig. 6.11- Expansão versus pressão.....	87
Fig. 6.12- Expansão versus concentração (1 mN/m).....	88
Fig. 6.13- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	88
Fig. 6.14- Isotermas de potencial de superfície.....	90
Fig. 6.15- Variação do momento de dipolo, 1 mN/m.....	90
Fig. 6.16- Variação do momento de dipolo, 30 mN/m.....	91

MISTURAS COL/DPPC

Fig. 6.17- Isotermas de pressão de superfície, área total.....	94
Fig. 6.18- Isotermas de pressão de superfície, área total (referência).....	94
Fig. 6.19- Isotermas de pressão de superfície, área por lipídio.....	95
Fig. 6.20- Expansão versus pressão.....	96
Fig. 6.21- Simulação computacional de agregados de colesterol no DPPC.....	96
Fig. 6.22- Expansão versus concentração para 1 mN/m.....	97

Fig. 6.23- Expansão versus concentração no ponto da transição de fase LE-LC	97
Fig. 6.24 Expansão versus concentração (30 mN/m).....	98
Fig. 6.25- Isoterma de potencial de superfície.....	99
Fig. 6.26- Variação do momento de dipolo para 1 mN/m.....	100
Fig. 6.27- Variação do momento de dipolo no ponto da transição de fase LE-LC.....	100
Fig. 6.28- Variação do momento de dipolo para 30 mN/m.....	101
MISTURAS COL/DPPG	
Fig. 6.29- Isotermas de pressão de superfície, área por lipídio.....	102
Fig. 6.30- Expansão versus concentração (1 mN/m).....	103
Fig. 6.31- Expansão versus concentração (30 mN/m).....	105
Fig. 6.32- Isotermas de potencial de superfície.....	105
Fig. 6.33- Isotermas de potencial de superfície.....	106
Fig. 6.34-Variação do momento de dipolo,1 mN/m.....	107
Fig. 6.35- Variação do momento de dipolo, 30 mN/m.....	107
Esquema da localização das drogas DIP e TFP na monocamada do DPPC no Anexo 1	