**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

VANANÉLIA PEREIRA NUNES GERALDO

**Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes de Langmuir e Langmuir-
Blodgett contendo fosfolipídios**

**São Carlos
2013**

VANANÉLIA PEREIRA NUNES GERALDO

Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolipídios

Versão Corrigida
(original na unidade)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

**São Carlos
2013**

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

G354i Geraldo, Vananélia Pereira Nunes
 Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes
 de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolipídios
 / Vananélia Pereira Nunes Geraldo; orientador Osvaldo
 Novais de Oliveira Jr. São Carlos, 2013.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
 Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais e
 Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização
 e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
 Carlos; Instituto de Física de São Carlos; Instituto de
 Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
 2013.

 1. ibuprofeno. 2. capsaicina. 3. pimenta malagueta.
 4. monocamadas de Langmuir. 5. filmes de
 Langmuir-Blodgett. 6. PM-IRRAS. I. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação ao original defendido em 21 de março de 2013, seguindo as orientações da comissão julgadora, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, março de 2013.

Vananélia Pereira Nunes Geraldo

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho, Lucas,
pela oportunidade de conhecer
a forma mais pura do amor*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e pelo privilégio de poder continuar meus estudos.

Ao Professor Osvaldo Novais de Oliveira Jr, pela orientação e amizade.

Ao meu esposo, Daniel, pela paciência e por ter me incentivado em todos os momentos deste trabalho.

Aos meus pais, Angelo (*in memoriam*) e Vilma, pelo amor incondicional e exemplo de perseverança.

Ao meu irmão, Marcelo, aos meus (as) cunhados (as), meus sogros, Laélcio e Jemima, sobrinhos (as) e a toda minha família pela união e carinho.

Aos meus amigos de sala: Analine, Josiane, Rafaela, Adriana, Alexandre, Andrey, Lívia, Juliana, Valquiria, Washington, Yurika, Leonardo e aos demais do grupo, por compartilharem momentos de alegria.

Ao pessoal técnico do Grupo de Polímeros Bernhard Gross: Rosângela, Simone, Débora Balogh, Bruno, Felipe, Níbio, Ademir e Bertho pela convivência e auxílios prestados.

À CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus agradecimentos!

EPÍGRAFE

"Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente."

Isaac Newton

RESUMO

GERALDO, V. P. N. **Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolipídios.** (2013) 111p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O ibuprofeno é um antiinflamatório não esteróide, com baixa solubilidade em água, que apresenta diversos efeitos colaterais, incluindo lesão gástrica e intestinal. Esses efeitos podem depender da interação com a membrana celular, o que nos motivou a investigar, na primeira parte deste trabalho, a incorporação do ibuprofeno em monocamadas de Langmuir como modelos de membrana celular. Monocamadas de dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) co-espalhadas com o ibuprofeno ou depositadas sobre subfases contendo o fármaco foram estudadas por meio das isotermas de pressão e potencial de superfície. Foram observados efeitos significativos para monocamadas de DPPC, particularmente na transição de fase líquido-expandida para líquido-condensada, com modificações relevantes na elasticidade da monocamada. Esses efeitos aumentaram com a concentração do ibuprofeno. Para os dois tipos de fosfolipídios, o ibuprofeno pôde penetrar na região hidrofóbica, o que foi confirmado por espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), indicando assim a presença de interações hidrofóbicas. A análise por microscopia no ângulo de Brewster (BAM) mostrou que o ibuprofeno impede a formação de grandes domínios de DPPC, enquanto que não foram observadas alterações significativas para o DPPG. A interação entre o ibuprofeno e o DPPG também foi confirmada após a imobilização da monocamada mista em filmes LB com alterações na absorção no UV-Vis da molécula de ibuprofeno. No que diz respeito às implicações biológicas, a ação farmacológica que depende diretamente da interação com a membrana deve ocorrer primeiramente em regiões neutras via penetração do ibuprofeno na região hidrofóbica da membrana celular. A segunda parte deste trabalho foi dedicada à interação de capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta com monocamadas de Langmuir constituídas de DPPG e DPPC. A capsaicina é um potente analgésico de uso tópico, que pode causar dessensibilização no local de aplicação dependendo da dose e, portanto há interesse na sua incorporação em sistemas de liberação controlada, como os lipossomos. A técnica de Langmuir foi empregada para verificar essa possibilidade. Os capsaicinóides expandiram as monocamadas de DPPG e aumentaram sua elasticidade. As isotermas de potencial de superfície indicaram que os capsaicinóides provocam aumento de 10 % no momento de dipolo numa concentração de 30% em mol. Para os filmes mistos de DPPC e capsaicinóides, a área mínima diminuiu e a elasticidade da monocamada aumentou. De acordo com as isotermas de potencial, os momentos de dipolo diminuíram para as monocamadas de DPPC independentemente da concentração de capsaicinóides. Esses resultados sugerem que as moléculas de DPPC são solubilizadas para a subfase na presença do fármaco. A partir destes resultados, conclui-se que os capsaicinóides podem ser incorporados em estruturas lipídicas, constituídas principalmente de DPPG, o que é relevante para uso em sistemas de liberação de fármacos.

Palavras-chave: ibuprofeno, capsaicina, pimenta malagueta, monocamadas de Langmuir, filmes de Langmuir-Blodgett, PM-IRRAS.

ABSTRACT

GERALDO, V. P. N. **Interaction of ibuprofen and capsaicinoids with Langmuir and Langmuir-Blodgett films containing phospholipids.** (2013) 111p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Ibuprofen is a nonsteroidal anti-inflammatory drug, with low solubility in water, which exhibits side effects including gastric and intestinal injury, often irreversible. Some of these effects may depend on the interaction with the cell membrane, which motivated us to investigate the incorporation of ibuprofen in Langmuir monolayers as cell membrane models, in the first part of this thesis. Dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) or dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) monolayers co-spread with ibuprofen or deposited on ibuprofen-containing aqueous subphases were studied using surface pressure and surface potential isotherms. Significant effects were observed for DPPC monolayers, particularly at the liquid-expanded to liquid-condensed phase transition, with relevant changes in the elasticity of the monolayer. These effects increased with the ibuprofen concentration. For both types of phospholipids, ibuprofen could penetrate into the hydrophobic part of the monolayer, which was confirmed with polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS), thus indicating the presence of hydrophobic interactions. BAM images showed that ibuprofen prevents the formation of large domains of DPPC, while no significant changes were observed for DPPG. The interaction between DPPG-ibuprofen was also confirmed for deposited layers in the form of LB films, with changes in the ibuprofen UV-Vis absorption. As for the biological implications, the pharmacological action depending directly on the membrane interaction should occur primarily with zwitterionic regions of the membrane via penetration of ibuprofen in the hydrophobic part of the monolayer. The second part of this thesis is dedicated to the interaction of capsaicinoids, extracted from malagueta pepper, with Langmuir monolayers of DPPC and DPPG. Capsaicin is a powerful analgesic of topical use, which can cause desensitization in the application site depending on the dose, and therefore there is interest in its incorporation in drug delivery systems, such as liposomes. The Langmuir technique was employed to verify this possibility. The capsaicinoids expanded the DPPG monolayer and increased its elasticity. Surface potential isotherms indicated that the capsaicinoids increased the average dipole moment by 10 % for 30 mol % of capsaicinoids. For the mixed films of DPPC and capsaicinoids, the minimum area decreased and the elasticity increased. According to the surface potential isotherms, the dipole moments decreased for DPPC monolayers regardless of the capsaicinoid concentrations. These results suggest that the DPPC molecules are solubilized into the subphase in the presence of the drug. From these results, it is concluded that the capsaicinoids can be incorporated into structures as the liposomes constituted mainly of DPPG, which is relevant for use in drug delivery systems.

Keywords: ibuprofen, capsaicin, malagueta pepper, Langmuir monolayers, Langmuir-Blodgett films, PM-IRRAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo de mosaico fluido para membranas celulares. Adaptado de http://www.portalsaofrancisco.com.br	26
Figura 2 –	Esquema de uma molécula de fosfolípido – 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC). Adaptado de http://avantilipids.com	27
Figura 3 –	Representação esquemática do lipossomo. Adaptado de http://nanohoje.blogspot.com.br	29
Figura 4 –	Esquema da cuba de Langmuir: 1 – Reservatório de água; 2 – Barreiras móveis; 3 – Eletrobalança com sensor de Wilhelmy; 4 – Prova de potencial do capacitor vibrante	30
Figura 5 –	Formação do filme de Langmuir: (a) moléculas inicialmente dispersas; (b) comprimidas por barreiras móveis; (c) máxima orientação	31
Figura 6 –	Isoterma de π -A para uma monocamada de ácido esteárico	32
Figura 7 –	Arranjo experimental da placa de Wilhelmy: (a) vista frontal; (b) vista lateral	33
Figura 8 –	Representação de um capacitor de três camadas para uma monocamada condensada na interface ar/água	34
Figura 9 –	Deposição de um filme Langmuir-Blodgett do tipo Y	36
Figura 10 –	Deposição de filme de Langmuir-Blodgett do tipo X (a) e do tipo Z (b)	37
Figura 11 –	Estrutura química dos fosfolípidos DPPC e DPPG e do fármaco ibuprofeno	41
Figura 12 –	Minicuba de Langmuir	43
Figura 13 –	Isotermas de pressão de superfície (π -A) para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco	46
Figura 14 –	Módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco	47
Figura 15 –	Isotermas de potencial de superfície (ΔV) para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco	48

Figura 16 – Razão entre o momento de dipolo aparente do DPPG-Ibuprofeno (μ) e o DPPG puro (μ_0) vs baixas concentrações do ibuprofeno em diferentes pressões superficiais	49
Figura 17 – Isotermas de pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 5 e 25% em mol do fármaco. Inserção: Módulo de compressibilidade C_s^{-1} vs pressão de superfície	51
Figura 18 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 5 e 25% em mol do fármaco	52
Figura 19 – Razão entre o momento de dipolo aparente do DPPG-Ibuprofeno (μ) e o DPPG puro (μ_0) vs maiores concentrações do ibuprofeno em diferentes pressões superficiais	52
Figura 20 – Isotermas de pressão de superfície para as monocamadas de DPPG espalhadas sobre a subfase contendo várias concentrações do fármaco	53
Figura 21 – Módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para monocamadas de DPPG espalhadas sobre subfases contendo ibuprofeno	54
Figura 22 – Isotermas de potencial de superfície das monocamadas de DPPG espalhado sobre a subfase contendo várias concentrações do fármaco	55
Figura 23 – Razão entre o momento de dipolo aparente do DPPG-Ibuprofeno (μ) e do DPPG puro (μ_0) vs a concentração de ibuprofeno na subfase em diferentes pressões superficiais	55
Figura 24 – Isotermas de pressão de superfície para monocamadas de DPPG e DPPG-IBU espalhadas sobre subfase aquosa ácida (a) e alcalina (b)	57
Figura 25 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPG e DPPG-IBU espalhadas sobre subfase ácida (a) e alcalina (b)	59
Figura 26 – Isotermas de pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPC e ibuprofeno em uma faixa maior da concentração do fármaco	60
Figura 27 – Módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPC/Ibuprofeno em uma faixa maior de concentração do fármaco	61
Figura 28 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas mistas de DPPC e ibuprofeno para concentrações do fármaco entre 1 e 5 % em mol	62
Figura 29 – Razão entre o momento de dipolo para o DPPC/Ibuprofeno (μ) e DPPC puro (μ_0) versus concentração de ibuprofeno em diferentes pressões	62
Figura 30 – Isotermas de pressão de superfície das monocamadas de DPPC espalhadas sobre subfases contendo várias concentrações do fármaco	63

Figura 31 – Módulo de compressibilidade C_s^{-1} vs pressão superficial das monocamadas de DPPC sobre subfases contendo várias concentrações do fármaco	64
Figura 32 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPC sobre subfases contendo ibuprofeno	65
Figura 33 – Razão entre o momento de dipolo do DPPC sobre subfases contendo ibuprofeno (μ) e DPPC sobre subfase de água pura (μ_0) versus concentração de ibuprofeno em diferentes pressões	65
Figura 34 – Isotermas π -A para monocamadas de DPPC e DPPC-IBU sobre subfase ácida (a) e alcalina (b)	67
Figura 35 – Isotermas ΔV -A para monocamadas de DPPC e DPPC-IBU sobre subfase ácida (a) e alcalina (b)	68
Figura 36 – Curvas de compressão e descompressão para monocamada mista de DPPG e ibuprofeno 5% em mol formada sobre subfase aquosa. Velocidade da barreira de 10 mm min ⁻¹ . Total de 11 ciclos	69
Figura 37 – Curvas de compressão e descompressão para monocamada mista de DPPC e ibuprofeno 5% em mol sobre subfase aquosa. Velocidade da barreira de 10 mm min ⁻¹ . Total de 11 ciclos	70
Figura 38 – Micrografias das monocamadas de DPPC puro (esquerda) e monocamadas mistas de DPPC-ibuprofeno 5% mol (direita)	71
Figura 39 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC e DPPC-ibuprofeno 5% mol, em 30 mN m ⁻¹	73
Figura 40 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPG e DPPG-ibuprofeno 5% mol, em 30 mN m ⁻¹	75
Figura 41 – Espectro UV-vis para o ibuprofeno puro (2 mM) em água	76
Figura 42 – Espectro de UV-vis para o filme LB contendo uma monocamada de DPPG-ibuprofeno 5% em mol	77
Figura 43 – Espectros de FTIR para os filmes Langmuir-Blodgett contendo uma monocamada de DPPG puro e DPPG-ibuprofeno 5% em mol	78
Figura 44 – Estrutura química da capsaicina (a) e dihidrocapsaicina (b)	83
Figura 45 – Pimentas malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>)	85
Figura 46 – Isotermas π -A para os filmes mistos de DPPG e capsaicinóides	86

Figura 47 –	Área extrapolada em função da composição para monocamadas mistas de DPPG e capsaicinóides sobre subfase aquosa	87
Figura 48 –	Módulo de compressibilidade para as monocamadas mistas de DPPG e capsaicinóides	88
Figura 49 –	Isotermas ΔV -A para os filmes de DPPG contendo várias concentrações de capsaicinóides	89
Figura 50 –	Razão entre os momentos de dipolo dos filmes de DPPG-Caps (μ) e do filme de DPPG puro (μ_0) nas pressões de 10 e 30 mN m ⁻¹	90
Figura 51 –	Isotermas π -A dos filmes mistos de DPPC e capsaicinóides	91
Figura 52 –	Área extrapolada em função da composição para monocamadas mistas de DPPC e capsaicinóides sobre subfase aquosa	92
Figura 53 –	Módulo de compressibilidade para os filmes mistos de DPPC-Caps sobre subfase aquosa	93
Figura 54 –	Isotermas ΔV -A para os filmes de DPPC contendo várias concentrações de capsaicinóides	93
Figura 55 –	Razão entre os momentos de dipolo dos filmes de DPPC-Caps (μ) e do filme de DPPC puro (μ_0) nas pressões de 1, 5 e 30 mN m ⁻¹	94
Figura 56 –	Histerese da monocamada de capsaicinóides	95
Figura 57 –	Histereses das monocamadas de DPPG (a) e DPPC (b) contendo capsaicinóides (50 % em mol)	96
Figura 58 –	Espectro de UV-Vis para o filme LB de capsacinóides com três monocamadas	97
Figura 59 –	Espectro UV-Vis para o filme LB contendo três monocamadas de DPPG-Caps 50% em mol	98
Figura 60 –	Espectro de FTIR da oleoresina de capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta.	99
Figura 61 –	Espectros de FTIR para os filmes Langmuir-Blodgett de DPPG, Capsaicinóides e misto de DPPG-Caps	99

LISTA DE ABREVIATURAS

BAM – Microscopia no ângulo de Brewster

CAPS - Capsaicinóides

DPPC – Dipalmitoil fosfatidil colina

DPPG – Dipalmitoil fosfatidil glicerol

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

IBU - Ibuprofeno

LB – Langmuir-Blodgett

PM-IRRAS – Espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização

Π -A – Isoterma de pressão de superfície versus área

ΔV -A – Isoterma de potencial de superfície versus área

μ – momento de dipolo

Cs^{-1} – módulo de compressibilidade

SUMÁRIO

<i>APRESENTAÇÃO.....</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
A Membrana Celular	25
Modelos de Membrana Celular.....	28
Lipossomos.....	28
Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)	29
PARTE I.....	39
Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) contendo ibuprofeno e fosfolipídios.	39
O FÁRMACO IBUPROFENO	39
MATERIAIS E MÉTODOS	41
Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)	43
Espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)	44
Deposição dos filmes de Langmuir-Blodgett (LB)	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
Monocamadas de DPPG.....	45
Efeito do pH sobre o comportamento das monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno	56
Monocamadas de DPPC	59
Efeito do pH sobre o comportamento das monocamadas mistas de DPPC e ibuprofeno	66
Estabilidade dos filmes mistos de DPPG ou DPPC e ibuprofeno	68
Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)	70
PM-IRRAS dos filmes de DPPC e DPPG co-espalhados com o ibuprofeno.....	72
Filmes de Langmuir-Blodgett contendo DPPG e ibuprofeno	75
Implicações Biológicas.....	78
CONCLUSÕES	80
PARTE II.....	83
Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) contendo capsaicinóides e fosfolipídios	83
OBJETIVOS.....	83
CAPSAICINÓIDES	83
MATERIAIS E MÉTODOS	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
Monocamadas de DPPG.....	86
Monocamadas de DPPC	90
Filmes de Langmuir-Blodgett contendo DPPG e capsaicinóides.....	96
CONCLUSÕES	99
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	101
REFERÊNCIAS.....	103

APRESENTAÇÃO

Raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente entendido ao verificar que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, interpõe-se uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos) a serem vencidos para que se obtenha o efeito desejado. Além disso, devem ser considerados os efeitos colaterais provocados pelo medicamento. A inconveniência no uso do ibuprofeno, por exemplo, está frequentemente associada às complicações gastrointestinais. No caso da capsaicina, seu uso prolongado pode levar à dessensibilização ou lesão irreversível da fibra no local de aplicação.

A compreensão das interações moleculares na membrana é, portanto, o maior desafio, para o qual é essencial usar modelos de membrana. Vários sistemas têm sido usados para o estudo de tais interações, com destaque para os lipossomos e as monocamadas de Langmuir. Apesar de serem menos complexas que as membranas biológicas, as monocamadas lipídicas têm sido utilizadas como modelo no estudo de interações entre fármacos e membranas celulares. Dentre as vantagens da técnica de Langmuir destaca-se o fato de os filmes não possuírem curvatura, ao contrário dos lipossomos, além da possibilidade de aplicar, com facilidade, variações de composição e pressão lateral dos filmes.

Neste trabalho de doutorado foi utilizada a técnica de Langmuir e Langmuir-Blodgett para investigar as alterações provocadas pelo ibuprofeno e capsaicinóides em modelos de membrana celular constituídas de dois tipos de fosfolipídios, o dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e o dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC). A escolha desses fosfolipídios foi baseada em um trabalho prévio em que pretendíamos avaliar o efeito da carga do lipídio sobre a imobilização do ibuprofeno em lipossomos. A tese está dividida da seguinte forma: primeiramente foi feita uma revisão bibliográfica sobre os principais tópicos tratados neste trabalho. Em seguida, está descrita a metodologia para estudar a interação do ibuprofeno com monocamadas de DPPC e DPPG, além dos resultados e discussão. Na segunda parte estão apresentados os materiais e métodos para o estudo da interação entre capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta e os filmes de DPPC e DPPG, além dos resultados e discussão. Finalmente as conclusões e perspectivas deste trabalho e as referências.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Membrana Celular

A membrana biológica é um dos componentes estruturais e funcionais mais importantes da célula. Ela executa funções das seguintes naturezas:

- estrutural: ela circunda o citoplasma e dá forma à célula e suas organelas;
- barreira: permite passagem de íons, compostos de baixo peso molecular, proteínas, etc, para dentro ou para fora da célula;
- contato: realiza o contato entre células por meio de estruturas específicas;
- incorporação de receptores: é suscetível a diferentes sinais que provêm de seu ambiente externo por meio de proteínas específicas a ela incorporadas. Esses sinais podem ser luz, deformações mecânicas, substâncias específicas, etc.
- transporte: proporciona transporte ativo e passivo de íons, bem como de elétrons na mitocôndria.

A membrana celular é um sistema complexo intimamente ligado às funções celulares. Um modelo para sua estrutura foi proposto por SINGER e NICHOLSON (1972), chamado de “mosaico fluido”, cuja representação é mostrada na Figura 1, ressaltando que é um modelo bastante simplificado comparado ao sistema real, cuja composição é mais diversificada e dinâmica. As membranas plasmáticas são constituídas predominantemente por diversos tipos de fosfolipídios e proteínas em proporções variáveis e pequena fração de açúcares, na forma de oligossacarídeos. Na grande maioria das células animais, a parte exterior da membrana celular é rica em glicídeos: o glicocálice (LODISH *et al.*, 2008), responsável pelo reconhecimento químico intercelular, além de impedir que alguns vírus ou bactérias se anexem à célula.

Figura 1 – Modelo de mosaico fluido para membranas celulares. Adaptado de <http://www.portalsaofrancisco.com.br>

Os lipídios das membranas celulares pertencem predominantemente ao grupo dos fosfolipídios, formados por três grupos de moléculas menores: um álcool, geralmente o glicerol, duas moléculas de ácidos graxos e um grupo fosfato. Um esquema de uma molécula de fosfolipídio está na Figura 2. A proporção de fosfolipídios varia muito: compõe cerca de 50% da membrana plasmática e 90% da membrana mitocondrial. A estrutura das membranas deve-se primariamente a essa bicamada de fosfolipídios, que são moléculas longas com uma extremidade hidrofílica e cadeia hidrofóbica. O grupo fosfato está situado nas lâminas externas da estrutura trilaminar. A parte situada entre as lâminas fosfatadas é composta pelas cadeias hidrofóbicas. As membranas animais possuem ainda o colesterol, importante para o controle da fluidez das membranas.

Figura 2 – Esquema de uma molécula de fosfolipídio – 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC). Adaptado de <http://avantilipids.com>

Todos os componentes da membrana são reciclados várias vezes num ciclo de vida da célula. O tempo de vida dos fosfolipídios depende da função da membrana. Por exemplo, é de dois meses para a fosfatidilcolina numa membrana de mielina, enquanto que em mitocôndria, onde os processos oxidativos são intensos, o tempo de vida é somente duas semanas (HIANIK, 2006). Nas condições fisiológicas a bicamada lipídica geralmente se encontra no estado líquido-cristalino, com espessura entre 5-10 nm, consideravelmente menor que as dimensões da célula (tipicamente alguns μm). As dimensões da membrana variam principalmente em função das proteínas integrais, periféricas e estruturais bem como devido à presença de lipopolissacarídeos e glicopolissacarídeos (NAGLE; TRISTRAM-NAGLE, 2000).

As proteínas são os principais componentes funcionais da membrana celular, pois proporcionam funções específicas. A maioria delas está mergulhada na bicamada de fosfolipídios, interrompendo sua continuidade – as *proteínas integrais*. Alguns exemplos dessas proteínas são os canais iônicos ou as que proporcionam transporte iônico ativo – as ATPases. Há também as *proteínas periféricas* que se localizam na superfície da membrana por meio de interações eletrostáticas ou podem conter cadeias hidrofóbicas curtas que permitem ancoragem na membrana. O citocromo C é um exemplo de proteína periférica

(TAFANI et al., 2002). Algumas proteínas atuam no transporte de substâncias através da célula, por exemplo, as glicoproteínas. A membrana celular pode conter também proteínas receptoras de moléculas específicas, os receptores de membrana, que servem para regular o comportamento da célula (ALBERTS et al., 2008), (LODISH et al., 2008).

As interações entre a célula e seu ambiente são governadas por processos que dependem da membrana plasmática. Essa dependência está diretamente associada à diversidade dos lipídios que compõe a membrana cuja especialização e diversidade desempenham papel importante na funcionalidade e diferenciação celular (ALBERTS et al., 2008). Isso ajuda a explicar, por exemplo, porque a entrega de medicamentos às células ocorre via diferentes processos na membrana plasmática de diferentes células.

Modelos de Membrana Celular

O estudo de propriedades físicas das biomembranas é intrincado devido ao pequeno tamanho da célula (tipicamente alguns μm), pequena espessura (5-10 nm), sua heterogeneidade e anisotropia. Além disso, também é difícil estudar separadamente as propriedades das bicamadas lipídicas e a influência que sofrem das proteínas. Por esse motivo estudos biofísicos das propriedades da membrana vêm sendo realizados em diversos sistemas modelo. Os mais empregados são as dispersões esféricas multi ou unilamelares – os lipossomos (LASIC; PAPAHAADJOPOULOS, 1995) - e as monocamadas de Langmuir formadas por lipídios, mistura de lipídios, polissacarídeos e proteínas (BROCKMAN, 1999), (HOLMSEN, 2008). As monocamadas lipídicas foram os primeiros modelos de membrana que desempenharam papel importante no estabelecimento da natureza de bicamada das biomembranas no século XX. As bicamadas lipídicas estáveis foram reportadas em 1962 por MUELLER e colaboradores (1963). Em 1965 BANGHAM e colaboradores (1965) descobriram os lipossomos que se tornaram os mais usados no estudo das propriedades físicas de biomembranas.

Lipossomos

Um lipossomo ou vesícula, mostrado na Figura 3, é formado a partir de dispersões

lipídicas em meio aquoso. Dependendo do método de formação obtêm-se lipossomos unilamelares ou multilamelares de diferentes tamanhos (SZOKA JR.; PAPAHAADJOPOULOS, 1980). Tipicamente uma quantidade desejada de lipídios é dissolvida em clorofórmio ou em mistura de clorofórmio-metanol. Em seguida o solvente é evaporado sob fluxo de nitrogênio em rotaevaporador para formar um filme fino de lipídio na superfície do balão. O filme é então hidratado pela adição de água ou tampão. A dispersão de lipídio em água é agitada vigorosamente por vários minutos em temperatura acima da de transição de fase dos lipídios. Desta maneira obtêm-se lipossomos multilamelares com diâmetros da ordem de 1 μm .

Figura 3 – Representação esquemática do lipossomo. Adaptado de <http://nanohoje.blogspot.com.br>.

Dentre as inúmeras aplicações de lipossomos destacam-se o seu uso como sistemas de liberação controlada de princípios ativos, como ferramenta em diversas disciplinas científicas incluindo matemática e física teórica (topologia e superfícies bi-dimensionais), biofísica (propriedades de membranas celulares e canais), química (catálise, conversão de energia, fotossíntese), ciência dos colóides (estabilidade, termodinâmica de sistemas finitos), bioquímica (funções das proteínas de membrana) e biologia (excreção, função celular, entrega de genes) (BARANI; MONTAZER, 2008).

Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

Na década de 1910 o cientista Irving Langmuir desenvolveu as bases para elucidar os

fenômenos relacionados à formação de filmes em superfícies aquosas. Um filme de Langmuir é uma camada de material anfifílico (molécula com regiões polar e apolar) disposta na interface líquido-ar, normalmente água-ar. Para formar um filme de Langmuir, uma pequena quantidade de solução do composto em solvente volátil e imiscível com a água é espalhada sobre a superfície do líquido contido em recipiente confeccionado por um material inerte, conhecido como cuba de Langmuir, esquematizada na Figura 4 (ROBERTS, 1990), (FERREIRA et al., 2005).

Figura 4 – Esquema da cuba de Langmuir: 1 – Reservatório de água; 2 – Barreiras móveis; 3 – Eletrobalança com sensor de Wilhelmy; 4 – Prova de potencial do capacitor vibrante.

Essa cuba possui barreiras móveis que permitem a diminuição da área ocupada pelo filme. No estágio inicial, o filme está na fase gasosa, e com a compressão atinge-se a fase líquido-expandida, na qual as moléculas começam a interagir. Com a subsequente diminuição da área, as moléculas são forçadas a um arranjo regular, mostrado na Figura 5, num filme condensado (fase líquido-condensada). Se o filme for comprimido além do ponto de máxima compactação, as moléculas começam a se agrupar desordenadamente, o que é chamado de colapso.

Figura 5 – Formação do filme de Langmuir: (a) moléculas inicialmente dispersas; (b) comprimidas por barreiras móveis; (c) máxima orientação.

Além das barreiras móveis, a cuba também comumente possui sensores de pressão e potencial de superfície. A pressão de superfície (π) é definida como a diferença da tensão superficial entre uma subfase com água pura (γ_0) e uma subfase com água e o filme (γ), ou seja, $\pi = \gamma_0 - \gamma$. À medida que é comprimida sobre a superfície aquosa, a monocamada sofre várias transformações de fases, análogas às dos gases, líquidos e sólidos tridimensionais. As mudanças de fase podem ser prontamente identificadas pelo monitoramento da pressão de superfície em função da área ocupada pelo filme. Isto é o equivalente bidimensional da isoterma de pressão versus volume para gás/líquido/sólido. Uma curva π -A modelo, do ácido esteárico, é mostrada na Figura 6. A área por molécula, a , é obtida dividindo-se a área do filme A pelo número total de moléculas sobre a superfície aquosa segundo a Equação (1):

$$a = \frac{AM}{CN_A V} \quad (1)$$

onde M é a massa molecular da substância, C é a concentração da solução espalhada em massa por unidade de volume, V é o seu volume e N_A é o número de Avogadro. Na *fase gasosa* (G), as moléculas estão muito distantes e as forças exercidas entre elas são muito pequenas. Conforme a área de superfície da monocamada é reduzida, as cadeias hidrofóbicas começam a interagir. O estado líquido é geralmente chamado de *fase líquido-expandida* (LE). As cadeias hidrofóbicas das moléculas do filme não estão ordenadas. À medida que a área molecular é progressivamente reduzida, a *fase líquido-condensada* (LC) começa a aparecer. A emergência de cada fase condensada pode ser acompanhada por regiões de pressão constante

na isoterma, como nos casos de um gás se condensando em líquido e um líquido se solidificando. No estado condensado, as moléculas estão intimamente empacotadas e alinhadas com a cadeia hidrofóbica apontando para fora da superfície aquosa. A área por molécula nesse estado é similar à secção transversal da área de uma cadeia hidrocarbônica, aproximadamente $19 \text{ \AA}^2$. As monocamadas podem ser comprimidas até pressões consideravelmente maiores do que a pressão de equilíbrio. A pressão de superfície continua a aumentar com a diminuição da área até um ponto em que não é mais possível aumentá-la e a área do filme diminui se a pressão for mantida constante, ou a pressão diminui se o filme é mantido em área constante. Isso é conhecido como *colapso*. As forças que atuam sobre a monocamada nesse ponto são bastante elevadas (PETTY, 1996).

Figura 6 – Isoterma de π -A para uma monocamada de ácido esteárico.

A estabilidade dos filmes de Langmuir pode ser estimada comprimindo-os até uma pressão desejada e observando-se a queda de pressão com o tempo. A pressão de superfície pode ser obtida medindo-se a força por unidade de comprimento numa placa de Wilhelmy, que é feita de material hidrofílico inerte às substâncias depositadas na interface (geralmente papel de filtro). A placa intercepta a superfície ar-água, sendo suportada no braço de uma balança eletrônica, como mostra a Figura 7. As forças que agem sobre o papel de filtro são a da gravidade e a tensão superficial para baixo, e a força de empuxo, devido à água deslocada, para cima (PETTY, 1996).

Figura 7 – Arranjo experimental da placa de Wilhelmy: (a) vista frontal; (b) vista lateral.

Para uma placa retangular de dimensões l , w e t de material de densidade ρ_W imerso a uma profundidade h em um líquido de densidade ρ_L , a força líquida F para baixo é

$$F = \rho_W g l w t + 2\gamma (t+w) \cos\theta - \rho_L g t w h \quad (2)$$

onde γ é a tensão de superfície do líquido, θ é o ângulo de contato sobre o papel e g é a aceleração da gravidade. O procedimento mais usual é escolher uma placa que seja completamente umedecida pelo líquido (i.e., $\theta = 0$) e medir a mudança de F para uma placa estacionária. A mudança na força ΔF está relacionada à mudança na tensão de superfície $\Delta\gamma$ por:

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2(t+w)} \quad (3)$$

Se a placa é muito fina, então $t \ll w$

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2w} \quad (4)$$

Além da pressão de superfície, outra grandeza física importante na caracterização de filmes de Langmuir é o potencial de superfície. Denotado por ΔV , o potencial de superfície é determinado pela diferença de potencial entre uma superfície com filme e a subfase aquosa (ΔVII), menos a diferença de potencial entre a superfície sem o filme e o interior aquoso (ΔVI), ou seja, $\Delta V = \Delta VII - \Delta VI$. O potencial pode ser medido por uma prova Kelvin (um capacitor vibrante), na qual uma das placas do capacitor vibra milímetros acima da superfície aquosa. A diferença de potencial (ΔV) advém de dipolos elétricos permanentes do material que compõe o filme e da dupla camada formada nas proximidades dos grupos polares do

material anfílico, se esses forem carregados, e da reorientação das moléculas de água ao redor do filme (ROBERTS, 1990).

O potencial de superfície de filmes de Langmuir tem sido interpretado utilizando-se o modelo de capacitores de Demchak e Fort ou de Vogel-Möbius (DYNAROWICZ-ŁĄTKA; DHANABALAN; OLIVEIRA JR., 2001), em que a monocamada é considerada como um capacitor de três ou duas camadas, como mostrado na Figura 8. Estes modelos são empregados na análise do potencial de superfície resultante da orientação de grupos substituintes nas monocamadas de lipídios.

Figura 8 – Representação de um capacitor de três camadas para uma monocamada condensada na interface ar/água.

Davies e Rideal (apud DYNAROWICZ-ŁĄTKA; DHANABALAN; OLIVEIRA JR., 2001) propuseram o modelo de três camadas. Oliveira e colaboradores obtiveram parâmetros que explicavam os resultados e consideravam a mudança no potencial interfacial devido à presença da monocamada como somatória de termos independentes (OLIVEIRA JR. et al., 1989). No modelo é levada em conta a contribuição dos dipolos da água reorientada na vizinhança das cabeças polares dos lipídios, dos dipolos da cabeça polar e das cadeias hidrofóbicas que se posicionam na interface com o ar. Os valores de momento de dipolo e das constantes dielétricas independentes são atribuídos a cada uma dessas regiões. Então, o potencial de superfície ΔV é dado por:

$$\Delta V = \frac{1}{A\epsilon_0} \left(\frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\mu_3}{\epsilon_3} \right) + \Psi_0 \quad (5)$$

onde A é a área média por molécula, ϵ_0 é a permissividade no vácuo ($8,854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$), μ_1 é a componente vertical do momento de dipolo devido à reorientação das moléculas de água induzidas pelas moléculas do filme, μ_2 é a contribuição referente ao grupo hidrofílico e μ_3 é a contribuição da cauda hidrofóbica. Ψ_0 é a contribuição da dupla camada elétrica de Gouy-Chapman (TOCANNE; TEISSIÉ, 1990), que só aparece se a monocamada estiver pelo menos parcialmente ionizada.

Portanto, o potencial de superfície da membrana, ΔV , é a soma de um termo dependente de cargas elétricas, Ψ_0 , e um termo de polarização ΔV_P . Ψ_0 pode variar com o sinal e o número de cargas das cabeças polares do fosfolípido, com a densidade de carga superficial σ , e com a quantidade de íons na solução. Em monocamadas que não têm carga elétrica líquida (por exemplo, lipídios zwitteriônicos como o DPPC), Ψ_0 é zero. As medidas de potencial de superfície são utilizadas para analisar o comportamento das monocamadas, orientação dos dipolos moleculares, agregações e interações entre as moléculas numa monocamada mista.

Os filmes de Langmuir possuem vantagens em relação a outros modelos de membrana, mas há desvantagens também. A maioria destas está relacionada à sua espessura monomolecular, que permite simular apenas metade da membrana. Essa arquitetura prejudica, por exemplo, o estudo de transporte de moléculas através da membrana, pois um filme de Langmuir possui uma das superfícies em ambiente hidrofóbico (ar), ao contrário de uma membrana celular real cujas superfícies, interna e externa, estão em ambientes aquosos (FERREIRA et al., 2005). Apesar dessa peculiaridade, o filme de Langmuir é vantajoso para estudar interações moleculares na superfície da membrana celular, por não possuir curvatura, ao contrário de lipossomos. Há evidência de experimentos e estudos teóricos para a similaridade da estruturação da monocamada com o arranjo de uma membrana. Por exemplo, um filme de Langmuir de fosfolípidios comprimido à pressão de 30-35 mN m⁻¹ possui moléculas ocupando a mesma área, com alinhamento e compactação bastante similares às moléculas de uma membrana celular real. Outra vantagem é a possibilidade de aplicar, com facilidade, variações de composição e pressão lateral aos filmes.

Na década de 1930, Katherine Blodgett realizou os primeiros trabalhos de transferência dos filmes monomoleculares da superfície da água para a superfície de suportes sólidos, originando os filmes agora chamados de Langmuir-Blodgett (LB) (ROBERTS, 1990). A técnica LB baseia-se na deposição do filme de Langmuir através do movimento vertical de um substrato sólido através da interface ar/água. A pressão de superfície e a temperatura da monocamada devem ser controladas de modo que o filme orgânico esteja em estado condensado estável (usualmente entre 20 e 40 mN m⁻¹). Com este tipo de deposição é possível obter estruturas com espessuras extremamente finas e controladas. A Figura 9 mostra a forma mais comum de deposição de um filme LB. O substrato é hidrofílico e a primeira monocamada é transferida enquanto o substrato é retirado da subfase. O substrato deve, portanto, ser colocado na subfase antes que a monocamada seja espalhada.

Subsequentemente, uma monocamada é depositada em cada passagem pela interface ar/água. Como mostrado, forma-se um padrão cauda-cauda e cabeça-cabeça, chamado de filme tipo Y.

Figura 9 – Deposição de um filme Langmuir-Blodgett do tipo Y.

Embora esta seja a situação mais comum, casos em que a monocamada é transferida somente com a inserção do substrato (deposição do tipo X) ou somente com a sua remoção (deposição do tipo Z), são também observados (PETTY, 1996), como mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Deposição de filme de Langmuir-Blodgett do tipo X (a) e do tipo Z (b).

A transferência do filme é caracterizada pela taxa de transferência (TR), determinada pela diminuição da área ocupada pela monocamada (mantida a uma pressão constante) sobre a superfície aquosa dividida pela área recoberta do substrato sólido, isto é, $TR = A_L/A_S$

onde A_L é a diminuição da área ocupada pela monocamada sobre a superfície aquosa e A_S é a área recoberta do substrato sólido. Se forem usados substratos assimétricos então é improvável que a TR seja idêntica em ambas as superfícies. Taxas de transferências diferentes de valores entre 0,95 e 1,05 caracterizam um filme não homogêneo.

Enquanto os filmes de Langmuir possibilitam o estudo de interações entre moléculas no nível molecular, os filmes LB possuem a vantagem de permitir aplicação de maior número de técnicas de caracterização (FERREIRA et al., 2005) e possibilitar construção de dispositivos com aplicação em óptica, fotônica, eletrônica, sensores e biossensores (OLIVEIRA JR. et al., 2001).

Comparados com membranas lipídicas na forma de bicamadas, os filmes lipídicos monomoleculares podem ser estudados com uma variedade de técnicas experimentais. Vários estudos sobre a interação entre alguns fármacos e monocamadas de Langmuir têm sido realizados (CORVIS et al., 2006); (KORCHOWIEC et al., 2007), (NAYAL; HONIG, 2006). Foi estudada a interação entre diversos antiinflamatórios e fosfolipídios da mucosa gástrica humana (KIVINEN; VIKHOLM; TARPILA, 1994) e fosfolipídios de diversas células

eucarióticas (LYGRE; MOE; HOLMSEN, 2003). A técnica de Langmuir também foi usada para investigar o mecanismo das desordens gastrointestinais provocadas pelo diclofenaco (SOUZA et al., 2004).

PARTE I

Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) contendo ibuprofeno e fosfolipídios

O principal objetivo desta primeira parte do trabalho é investigar os efeitos de um agente antiinflamatório, o ibuprofeno, em modelos de membrana celular constituídos por um fosfolipídio zwitteriônico (DPPC) e um fosfolipídio aniônico (DPPG) pela técnica de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Pretende-se verificar o modo de ação do ibuprofeno quanto à dependência da concentração pelo emprego de baixas e altas porcentagens do fármaco e também quanto ao modo de incorporação nas monocamadas de Langmuir via subfase ou co-espalhamento.

O FÁRMACO IBUPROFENO

O ibuprofeno é um antiinflamatório de origem não esteroideal (AINES), com baixa solubilidade em água ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ a 25 °C) (WEAST; ASTLE, 1985), cujo uso prolongado provoca diversos efeitos colaterais. A inconveniência no uso do ibuprofeno, por exemplo, está associada às complicações gastrointestinais, pois de 15 a 30% dos pacientes que usam o fármaco por longo período têm úlceras gastrointestinais e hemorragias, além de disfunção renal (HAWKEY, 2000). Dentre as estratégias para reduzir os efeitos colaterais provocados pelos AINES está sua incorporação em carreadores, como os lipossomos que podem reduzir efeitos nocivos de fármacos, pois aumentam a eficácia farmacêutica de agentes encapsulados (ZHANG et al., 2008). Em estudo prévio verificou-se que o tempo de liberação do ibuprofeno encapsulado em lipossomos constituídos de DPPG e POPG é maior do que com o fármaco livre (GERALDO et al., 2011).

Os AINES são inibidores da prostaglandina H sintetase, conhecida como ciclo-oxigenase (COX). Há duas isoformas para a COX: COX-1 constitutiva, presente em diversos tecidos e estimulante da produção fisiológica de prostaglandinas (PGs), e COX-2 induzível, expressa em resposta a um estímulo inflamatório. Sabe-se que a COX-1 e a COX-2 são

proteínas monotópicas de membrana (SPENCER et al., 1998), (PICOT; LOLL; GARAVITO, 1994). A localização interfacial da COX-2 deve ser importante não somente para a catálise das reações de síntese, mas também para sua inibição pelos AINES, uma vez que esses compostos se partilham preferencialmente nas membranas para acessar o sítio ativo da COX (MIRAFZALI et al. 2006). De fato, a COX está localizada no retículo endoplasmático e, em menor extensão, na membrana nuclear. A enzima contém dois sítios ativos: o sítio ciclo-oxigenase e o sítio peroxidase. O sítio ativo ciclo-oxigenase localiza-se no final de um canal lipofílico, e o canal tem sua abertura na parte interna da membrana. O sítio ativo peroxidase também se encontra no final de um canal lipofílico, mas este canal tem sua abertura no lado luminal da enzima. Portanto, os AINES devem atravessar a membrana celular e, adicionalmente, adentrar a membrana endoplasmática para atingir a enzima.

Um melhor entendimento do processo de inibição da COX relacionado à membrana pode ser obtido por meio de estudos com modelos lipídicos. Os AINES são compostos hidrofóbicos com baixa solubilidade em água que se partilham da fase aquosa para a fase lipídica. O coeficiente de partição estudado com vesículas unilamelares pequenas preparadas a partir de uma mistura de dimiristoil fosfatidil colina (um lipídio zwiteriônico com cabeça polar mais volumosa) e dimiristoil fosfatidil glicerol (um lipídio aniônico com cabeça polar relativamente menor) variou com diferentes AINES. Observou-se que o meloxicam, o lornoxicam e o nimesulida aumentam a fluidez de modelos de membrana de maneira dependente da concentração. Foi proposto que as alterações induzidas na dinâmica de lipídios podem modular a atividade de enzimas inflamatórias (FERREIRA; et al., 2005). De fato, dependendo do empacotamento da membrana, a conformação das enzimas e as interações entre as enzimas e os substratos ligados à membrana podem ser modificadas (RUAN; et al., 2005).

Por sua vez, o primeiro nível de interação dos AINES, antes que atinjam o sítio ativo da COX, depende de diversos parâmetros da membrana. Para se ligar a seus alvos, esses fármacos devem atravessar a membrana e, portanto suas interações com biomembranas são essenciais na determinação de suas ligações com as COXs. Os resultados com micelas como modelo de membrana indicam que, em células vivas, as membranas permitem acesso seletivo de oxicam AINES ao sítio ativo da COX (CHAKRABORTY; BANERJEE; SARKAR, 2003). Alguns estudos indicaram importância crucial das cargas na superfície de sistemas miméticos tais como micelas sobre a interação de oxicam AINES com COX. Para biomembranas que não possuem carga líquida em sua superfície, propôs-se que o efeito hidrofóbico é essencial

para guiar AINES aos seus alvos (CHAKRABORTY; ROY; SARKAR, 2005).

Nesta primeira parte da tese investigamos a interação do ibuprofeno com monocamadas de Langmuir para melhor compreensão tanto do mecanismo pelo qual este fármaco adentra a membrana celular quanto sobre sua incorporação em bicamadas lipídicas (lipossomos) visando à liberação controlada.

MATERIAIS E MÉTODOS

O sal de sódio do dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e o dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) foram comprados na Avanti Polar Lipids; o clorofórmio e o metanol da Merck. O ibuprofeno (ácido α -metil-4-(2-metilpropil) benzenoacético) da mais alta pureza disponível foi adquirido da Sigma. A Figura 11 mostra a estrutura química dos principais materiais empregados.

DPPC, $pK_a = 1,7$ (grupo fosfato), $pK_b = 11$ (sal quaternário de amônio)

DPPG, $pK_a = 1,7$ (grupo fosfato)

Ibuprofeno, $pK_a = 4,6$ (ácido carboxílico)

Figura 11– Estrutura química dos fosfolipídios DPPC e DPPG e do fármaco ibuprofeno.

Duas metodologias foram usadas para verificar a interação entre os fosfolipídios e o

ibuprofeno. A primeira foi o co-espalhamento de dois componentes na mesma solução, o que permite verificar se o fármaco é capaz de interagir com o fosfolipídio e ser incorporado em lipossomos como carregadores para a liberação de ibuprofeno (GERALDO et al., 2011). O DPPC e o ibuprofeno foram dissolvidos em clorofórmio, enquanto que uma mistura de metanol:clorofórmio (1:9 v:v) foi empregada para dissolver o DPPG em uma concentração igual a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Inicialmente, $40 \text{ }\mu\text{L}$ de soluções contendo um fosfolipídio puro ou misturas de fosfolipídio/ibuprofeno numa taxa de 0,1 a 25,0% em mol de ibuprofeno foram espalhadas sobre a superfície para obter monocamadas de Langmuir. Água ultrapura, utilizada como subfase, foi fornecida por um purificador Milli-RO acoplado a outro purificador Milli-Q. A resistividade da água purificada foi $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, o pH 6,2 e a tensão de superfície foi de $72,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Após o espalhamento aguardou-se 10 minutos para que o solvente evaporasse. Adicionalmente, foi estudado o comportamento das monocamadas de DPPC e DPPG puras e mistas com ibuprofeno 5% em mol em subfases ácidas e alcalinas. O pH da subfase aquosa foi ajustado pela adição de HCl ou NaOH.

Na segunda metodologia, foi avaliado se o ibuprofeno se incorpora nas monocamadas fosfolipídicas com o fármaco na subfase nas seguintes concentrações: 12,5; 25,0 e $53,0 \text{ }\mu\text{M}$. Esses valores foram escolhidos com base na solubilidade do ibuprofeno ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A atividade superficial do ibuprofeno foi estudada na ausência de fosfolipídio com a compressão da barreira para observar algum acréscimo na pressão superficial. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes para verificar a reprodutibilidade.

O cuidado nos detalhes experimentais é necessário no trabalho com monocamadas de Langmuir. Uma redução significativa no número de partículas do ar próximo à subfase deve ser feita com a localização da cuba de Langmuir em sala limpa.

Os experimentos de pressão e potencial de superfície foram realizados em uma mini cuba da KSV Instruments (Finlândia) com uma área total de 23.625 mm^2 , mostrada na Figura 12, localizada em uma sala limpa (classe 10.000) com temperatura ($20,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade ($50 \pm 1\%$) controladas. A pressão superficial π foi determinada utilizando-se o método de Wilhelmy, sendo a placa de Wilhelmy obtida de papel de filtro ($10 \times 20 \text{ mm}$) molhado em água ultrapura. As isotermas de potencial de superfície, ΔV , foram obtidas pelo método da placa vibrante usando uma prova Kelvin da KSV, um eletrodo vibrante com frequência de 300 Hz localizado 1-2 mm acima da superfície aquosa e um segundo eletrodo de platina colocado dentro da subfase entre os quais o potencial foi medido. A compressão do filme foi realizada por meio de duas barreiras que se movem simetricamente em velocidade constante de 10 mm min^{-1} . O sistema é controlado por computador com aquisição simultânea das isotermas de

pressão superficial (π -A) e potencial de superfície (ΔV -A).

Figura 12 – Minicuba de Langmuir.

Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)

A morfologia do filme foi estudada com um microscópio no ângulo de Brewster (BAM), modelo BAM2Plus System da Nanofilm Technologies (NFT – Alemanha), montado sobre a cuba de Langmuir. O princípio da técnica de BAM é baseado na não reflexão de um feixe de luz com polarização p se ele incidir sobre a superfície aquosa no ângulo de Brewster. Portanto, nenhuma luz alcança uma câmera localizada na direção do feixe refletido. O ângulo de Brewster é determinado pelo índice de refração dos dois meios que formam a interface, por exemplo, água e ar; para uma superfície de água pura esse ângulo é igual a 53° (NOBRE et al, 2010); (HÖENING; MOEBIUS, 1991); (HÉNON; MEUNIER, 1991). Se um filme de Langmuir é formado, essa nova interface altera o índice de refração, produzindo reflexão da luz em direção à câmera. Uma imagem da estrutura interfacial do filme é formada pelo contraste entre as regiões sem filme (regiões escuras – sem reflexão) e regiões onde a superfície aquosa está coberta com moléculas do filme (regiões claras – reflexão).

Espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

A espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação por polarização (PM-IRRAS) foi realizada com o Professor Luciano Caseli no Laboratório de Pesquisa em Biologia Química da Universidade Federal de São Paulo com um instrumento KSV PMI550 (KSV – Finlândia). Nesse experimento foram obtidas monocamadas de Langmuir pelo espalhamento de misturas dos fosfolípidios com 5% em mol de ibuprofeno sobre a subfase aquosa. A cuba de Langmuir foi configurada para que o feixe de luz atingisse a monocamada em um ângulo de incidência fixo de 80°. Como a entrada de luz foi continuamente modulada entre as polarizações *s* e *p* em alta frequência, o espectro pôde ser medido nas duas polarizações simultaneamente. Os dois canais de processamento do sinal detectado fornecem o espectro de refletividade diferencial $\Delta R = (R_p - R_s) / (R_p + R_s)$, onde R_p e R_s são respectivamente as refletividades polarizadas nas direções paralelas e perpendiculares ao plano de incidência. A absorção do feixe de luz polarizado paralelamente ao plano de incidência é sensível principalmente aos dipolos orientados verticalmente, enquanto que o feixe polarizado perpendicularmente é sensível àqueles orientados horizontalmente. Assim, a diferença dos dois espectros fornece informações sobre a orientação dos dipolos constituintes das moléculas na interface, porque as regras de seleção garantem especificidade do sinal da superfície, já que as moléculas na subfase apresentam orientações aleatórias. Como os espectros foram medidos simultaneamente e o espectro de IR foi dividido pelo espectro correspondente da subfase, o efeito do vapor de água foi reduzido (PAVINATTO et al., 2009). No ângulo usado neste trabalho, as bandas positivas indicam momento de dipolo preferencialmente no plano da superfície, enquanto que as bandas negativas indicam orientação preferencial perpendicular à superfície.

Deposição dos filmes de Langmuir-Blodgett (LB)

A transferência das monocamadas de Langmuir contendo DPPG e DPPG-Ibuprofeno 5% em mol sobre suportes sólidos foi realizada numa pressão de superfície constante de 40 mN.m⁻¹ e velocidade de deposição de 1 mm.min⁻¹, o que resultou em taxa de transferência próxima de um, valor característico de deposição homogênea. Os suportes para deposição foram o quartzo, para espectroscopias no UV-vis, e silício para medidas de FTIR. Nessas

condições foi possível produzir filmes LB com somente uma monocamada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo das interações entre fármacos e modelos de membranas pode fornecer informações em nível molecular sobre possíveis ações relacionadas à sua atividade fisiológica. Os dois modos de ação mais importantes são a penetração na membrana, alterando o empacotamento da bicamada lipídica (SEEMAN, 1972); (FERREIRA et al., 2005), e mudanças na elasticidade da membrana induzidas pelo fármaco (WIECLAW, 2009). Obviamente, o simples acoplamento do fármaco sobre a superfície da membrana também pode ter um efeito, mas isso provavelmente não deve ser tão importante quanto os dois outros modos de ação. Dentre os vários fatores que afetam a interação com o fármaco está a carga da membrana, razão pela qual se utilizam fosfolipídios zwitteriônicos e aniônicos para comparação. Na maioria dos casos, a interação é maior com lipídios carregados (ABE; SHAYMAN, 2009). Nesta análise, consideramos somente situações onde a ação farmacológica depende diretamente da membrana e não do receptor, porque neste caso uma monocamada de Langmuir não é provavelmente um bom modelo para simular a ação, a menos que o receptor seja incluído nos experimentos.

Monocamadas de DPPG

Na Figura 13 estão as isotermas de pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno numa faixa de concentração entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco. Cada isoterma representa a média de, pelo menos, três medidas cuja precisão da abscissa (área por molécula) foi cerca de $\pm 0,4 \text{ \AA}^2$, a de pressão de superfície foi $\pm 0,1 \text{ mN m}^{-1}$ e a de potencial de superfície foi de aproximadamente $\pm 10 \text{ mV}$. Há uma tendência de expansão da monocamada, com áreas por molécula maiores para uma mesma pressão, na presença do ibuprofeno. Entretanto, a expansão é relativamente pequena, estando dentro da dispersão dos resultados, sendo considerável apenas para 0,5%, em que na fase condensada observa-se aumento de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ devido à presença do ibuprofeno. Mencione-se que a isoterma para o DPPG puro é consistente com a literatura (VOLLHARDT; FAINERMAN; SIEGEL, 2000); (MARTIN; KONOVALOV; DAILLANT, 2007). Sua área mínima é cerca de $50 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e a pressão

de colapso é próxima de 60 mN m^{-1} .

Figura 13 – Isotermas de pressão de superfície (π -A) para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco.

Outra característica importante na isoterma de 0,5% da Figura 13 é a diminuição da pressão de colapso causada pelo ibuprofeno para 55 mN m^{-1} comparada com o lipídio puro que é 60 mN m^{-1} . Esse fato deve ser atribuído à penetração do fármaco na parte hidrofóbica da monocamada de DPPG, diminuindo a estabilidade da monocamada e antecipando o processo de colapso, em que estruturas em duas dimensões (2D) se tornam tridimensionais (3D). Além disso, efeitos consideráveis foram observados com uma concentração muito pequena do ibuprofeno (0,5%). Isso aponta para a existência de efeitos cooperativos, analogamente ao relatado para outros agentes terapêuticos, como o dipiridamol e derivados de fenotiazina (BORISSEVITCH et al., 1996); (HIDALGO et al., 2004).

Com relação à elasticidade da monocamada, utilizamos isotermas π -A para calcular o módulo de compressibilidade [$C_s^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$], também conhecido por elasticidade superficial de equilíbrio. Os estados físicos da monocamada são classificados com base no C_s^{-1} , da seguinte maneira: entre $12,5$ e 50 mN m^{-1} a monocamada está no estado líquido-expandido; para 50 - 100 mN m^{-1} , líquido; para 100 - 250 mN m^{-1} , líquido-condensado; e para $> 250 \text{ mN m}^{-1}$, no estado sólido (DAVIES; RIDEAL, 1963). Houve decréscimo no módulo de compressibilidade somente em altas pressões superficiais, como indicado na Figura 14. Como

será discutido mais adiante, na região relevante para membranas celulares ($\sim 32 \text{ mN m}^{-1}$), não há praticamente efeito sobre a incorporação do ibuprofeno.

Figura 14 – Módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para monolayers mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco.

A Figura 15 mostra as isotermas de potencial de superfície para as monolayers de DPPG co-espalhado com o ibuprofeno em concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol. Para os resultados em 1 mN m^{-1} somente as concentrações de 0,2 e 0,3% podem ser consideradas, as demais concentrações encontram-se dentro das dispersões dos resultados. Para os resultados em alta pressão, 30 mN m^{-1} , todas as concentrações entre 0,1 e 0,5% provocam efeito considerável na monolayer de DPPG. Em grandes áreas por molécula o potencial de superfície da monolayer de DPPG puro é negativo devido à contribuição da dupla camada elétrica formada pelos contra-íons em solução com a carga negativa dos grupos hidrofílicos do DPPG (OLIVEIRA JR.; TAYLOR; MORGAN, 1992); (OLIVEIRA JR.; BONARDI, 1997). Em altas pressões as caudas hidrofóbicas são alinhadas e o potencial de superfície torna-se positivo devido à contribuição positiva dos momentos de dipolo das moléculas.

Figura 15 – Isotermas de potencial de superfície (ΔV) para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 0,1 e 0,5% em mol do fármaco.

Diferentes modelos têm sido utilizados para relacionar as medidas de potencial de superfície em monocamadas de Langmuir aos momentos de dipolo das moléculas (AHUJA et al., 1993); (DEMCHAK; FORT, 1974); (VOGEL; MÖBIUS, 1988); (OLIVEIRA JR. et al., 1989). Sua aplicação requer o conhecimento da componente normal dos momentos de dipolo e, portanto, a orientação das moléculas formadoras da monocamada. A Figura 16 mostra a alteração no momento de dipolo aparente com o aumento da concentração do ibuprofeno, calculado pela Equação (5) conforme discutido na seção “Revisão Bibliográfica”.

Figura 16 – Razão entre o momento de dipolo aparente do DPPG-Ibuprofeno (μ) e o DPPG puro (μ_0) vs baixas concentrações do ibuprofeno em diferentes pressões superficiais.

Uma vez que o ibuprofeno é um ácido fraco com pKa de 4,6 (PAAVOLA et al., 2000) espera-se que suas moléculas estejam ionizadas na monocamada. O grau de dissociação depende do pH na interface, que é menor do que no interior da subfase (aproximadamente 6,0), devido ao potencial negativo da dupla camada (TAYLOR; OLIVEIRA JR.; MORGAN, 1990). Na superfície da água pura, o grau de ionização será certamente maior do que 0,5. O ibuprofeno negativamente carregado poderia, em princípio, causar diminuição no potencial de superfície, mas esse decréscimo não pode ser muito grande porque a concentração de ibuprofeno é baixa. Por essa razão, a contribuição dos momentos de dipolo do ibuprofeno deve ser descartada. Portanto, a alteração no potencial de superfície deve ser atribuída às alterações no empacotamento molecular das moléculas de DPPG, com um subsequente aumento na componente normal de seus momentos de dipolo. Uma mudança no empacotamento é consistente com a penetração de moléculas de ibuprofeno nas partes hidrofóbicas da monocamada de DPPG, inferida a partir das isotermas de pressão de superfície. As alterações no potencial de superfície causadas por pequenas quantidades de ibuprofeno só podem ser explicadas por efeitos cooperativos nas interações entre as moléculas do fármaco e de DPPG. A título de ilustração, a presença de 0,5% de ibuprofeno provocou um aumento no μ de aproximadamente 8% comparando com a monocamada de DPPG puro.

Nos experimentos para concentrações de ibuprofeno entre 1 e 4% em mol, as alterações nas isotermas também estão dentro da dispersão dos resultados, cujo erro era de $\pm 0,1 \text{ mN m}^{-1}$ para a pressão de superfície e $\pm 0,4$ para a área por molécula. Parece ter ocorrido auto-agregação do fármaco, não acarretando mudança na área por molécula de DPPG nas isotermas. As concentrações escolhidas para os experimentos foram baseadas em nossa experiência prévia e valores usados na literatura.

Em experimentos suplementares em que as concentrações do ibuprofeno foram bem maiores, entre 5 e 25% em mol, as isotermas de pressão de superfície da Figura 17 mostram uma dependência não monotônica com o aumento da concentração do ibuprofeno. A expansão induzida pelo fármaco foi considerável para 5 e 10%, mas diminuiu para 15% e então aumentou novamente para concentrações maiores. Esse resultado pode estar relacionado aos fenômenos dinâmicos tais como a dissolução/incorporação do ibuprofeno e sua agregação/desagregação, o que é característico de sistemas metaestáveis. A área por molécula do lipídio puro é da ordem de $50 \text{ \AA}^2$, mas na mistura com 5% de ibuprofeno, por exemplo, a área mínima aumenta para $55 \text{ \AA}^2$. Essa expansão é observada mesmo em altas pressões o que mostra inserção do ibuprofeno na monocamada. No entanto, uma inversão de comportamento é observada: se, por um lado, a pressão de colapso diminui para 0,5% do fármaco (Figura 13), por outro, se observa um aumento quando grandes concentrações do ibuprofeno são adicionadas à monocamada (Figura 17). O mesmo ocorre para os valores de C_s^{-1} em altas pressões de superfície, ou seja, diminui para 0,5% de ibuprofeno (Figura 14) e aumenta para grandes quantidades do fármaco (Figura 17). Esses resultados mostram que o ibuprofeno torna a monocamada de DPPG mais estável e ao mesmo tempo mais rígida em altas concentrações do ibuprofeno. Portanto, o comportamento da monocamada de DPPG depende da faixa de concentração do ibuprofeno.

Deve ser dada atenção especial à dependência com a concentração do ibuprofeno na monocamada de DPPG. As isotermas de pressão de superfície mostram que o fármaco está na interface interagindo com o lipídio em concentração muito baixa, 0,5%, em que a monocamada encontra-se expandida pelo fármaco como mostra a Figura 13. Esse resultado sugere inserção do ibuprofeno na região hidrofóbica do lipídio causando alteração no empacotamento das moléculas de DPPG. Se a proporção de uma molécula de ibuprofeno para 200 moléculas de DPPG pode causar um impacto nas propriedades do filme, infere-se a presença de efeito cooperativo entre as moléculas. Ao aumentar a concentração entre 1 e 4% esse efeito é anulado, provavelmente devido à auto-agregação do fármaco. O estado de agregação pode ser ligado ou dissociado da membrana de maneira que sua interação com as

moléculas de lipídio é tão fraca que os efeitos macroscópicos não são tão evidentes. À medida que maiores concentrações de ibuprofeno são introduzidas na monocamada de DPPG (5 a 25%) o efeito de expansão volta a predominar conforme observado nas isotermas da Figura 17. Neste caso o estado de agregação do fármaco ligado à membrana pode ser sugerido para explicar a expansão da monocamada.

Figura 17 – Isotermas de pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 5 e 25% em mol do fármaco. Inserção: Módulo de compressibilidade C_s^{-1} vs pressão de superfície.

As isotermas de potencial de superfície da Figura 18 mostram maiores potenciais para concentrações crescentes de ibuprofeno na matriz do DPPG. Os resultados do momento de dipolo para duas pressões, 1 e 30 mN m⁻¹, na Figura 19, são complementares. Nas baixas pressões, para as concentrações entre 5 e 10% molar, há um pico no momento de dipolo, com um máximo para 10% em mol do fármaco. Nessa concentração o acréscimo no momento de dipolo da mistura relativo ao do lipídio puro é quase 25%. Para concentrações entre 15 e 20% em mol de ibuprofeno ocorre diminuição no momento de dipolo, mas ainda maiores que para o DPPG puro. Isso pode ser explicado porque nessa faixa de concentração provavelmente ocorre reorientação ou redistribuição molecular que diminui a carga líquida total. Porém, para 25% o momento de dipolo aumenta novamente devido a uma nova reorientação molecular. Para uma pressão superficial maior, 30 mN m⁻¹, a situação é similar ao caso das baixas

pressões, entretanto, para 10% em mol de ibuprofeno, observa-se menor acréscimo no momento de dipolo, em torno de 15% em relação ao lipídio puro.

Figura 18 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno nas concentrações entre 5 e 25% em mol do fármaco.

Figura 19 – Razão entre o momento de dipolo aparente do DPPG-Ibuprofeno (μ) e o DPPG puro (μ_0) vs maiores concentrações do ibuprofeno em diferentes pressões superficiais.

A dependência não monotônica da concentração do ibuprofeno nas isotermas de pressão e potencial de superfície para o fármaco co-espalhado com as monocamadas de DPPG foi confirmada nos experimentos onde monocamadas de DPPG puro foram formadas sobre subfases aquosas contendo o ibuprofeno. A Figura 20 mostra que a incorporação de ibuprofeno induziu expansões nas isotermas de pressão de superfície, e a pressão de colapso foi reduzida, o que indica que a monocamada se tornou menos estável por causa da penetração do fármaco. Segundo a Figura 21, o módulo de compressibilidade foi pouco afetado na pressão superficial relevante para membranas celulares ($\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$), similarmente aos dados para as monocamadas mistas de DPPG-Ibuprofeno.

Figura 20 – Isotermas de pressão de superfície para as monocamadas de DPPG espalhadas sobre a subfase contendo várias concentrações do fármaco.

Figura 21 – Módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para monocamadas de DPPG espalhadas sobre subfases contendo ibuprofeno.

Uma mudança significativa foi observada nas isotermas de potencial de superfície, em que o potencial aumentou com a incorporação do ibuprofeno, como mostram as Figuras 22 e 23. Parece que as moléculas de ibuprofeno na subfase não afetaram o empacotamento do DPPG da mesma maneira que aquelas co-espalhadas com o fosfolípido. Portanto, a pressão de colapso foi pouco alterada, mas a mudança no potencial de superfície foi completamente diferente. Isso ocorre porque o potencial de superfície depende da carga na superfície e a orientação dos momentos de dipolo moleculares é muito mais sensível do que a pressão superficial. Tanto para baixas quanto para altas pressões ocorre aumento praticamente linear do momento de dipolo aparente com a concentração. Com os dados apresentados aqui não podemos identificar as mudanças na orientação molecular responsáveis pelo aumento no potencial da monocamada com a adsorção do ibuprofeno. Mas parece claro que as moléculas do fármaco afetam a monocamada de diferentes maneiras dependendo se elas são co-espalhadas ou adsorvidas a partir da solução. Retomaremos este assunto quando discutirmos as implicações biológicas dos resultados.

Figura 22 – Isotermas de potencial de superfície das monocamadas de DPPG espalhado sobre a subfase contendo várias concentrações do fármaco.

Figura 23 – Razão entre o momento de dipolo aparente do DPPG-Ibuprofeno (μ) e do DPPG puro (μ_0) vs a concentração de ibuprofeno na subfase em diferentes pressões superficiais.

Efeito do pH sobre o comportamento das monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno

Por ser um ácido fraco com pK_a de 4,6, o ibuprofeno deve estar negativamente carregado em pH 10 e neutro em pH 2. Portanto a interação entre o ibuprofeno e a monocamada de DPPG depende do pH. As interações de drogas com monocamadas lipídicas dependem fortemente da densidade do empacotamento molecular dos lipídios. Na fase líquido-expandida (LE) as cadeias hidrofóbicas possuem considerável grau de liberdade rotacional e a menor densidade lipídica facilita a interação e inserção das moléculas em comparação com a fase condensada do lipídio. As isothermas π -A para as monocamadas de DPPG e DPPG-IBU espalhadas sobre subfases ácidas (ajustadas com HCl) e alcalinas (ajustadas com NaOH) estão na Figura 24. Em pH 2, o DPPG puro encontra-se mais expandido do que o filme espalhado sobre água pura mostrado na Figura 13. A área mínima da monocamada de DPPG que, em água pura, é igual a $50 \text{ \AA}^2$ aumentou para $56 \text{ \AA}^2$, em pH 2. Além disso, a pressão de colapso do filme de DPPG aumenta de $55 \text{ \AA}^2$ em pH ácido (curva preta Figura 24 a) para $65 \text{ \AA}^2$ em pH alcalino (curva preta Figura 24 b). Existe um platô ao longo da isoterma π -A para a monocamada de DPPG espalhada sobre subfase aquosa de pH 10. O aparecimento desta região de coexistência de fases já foi mencionado por KOPPENOL e colaboradores (1997). Entretanto, o valor da pressão de superfície de aproximadamente 15 mN m^{-1} difere do encontrado neste trabalho ($\sim 9 \text{ mN m}^{-1}$). Essa discrepância é devida a diferentes condições experimentais, tais como composição da subfase (tampão TRIS 10 mM) e maior temperatura (25°C). BORISSEVITCH et al (1996) também observaram um platô para monocamadas de DPPG espalhadas sobre soluções de tampão fosfato, porém essa região desapareceu para monocamadas depositadas sobre subfase de água pura em pH 5,9.

Figura 24 – Isotermas de pressão de superfície para monocamadas de DPPG e DPPG-IBU espalhadas sobre subfase aquosa ácida (a) e alcalina (b).

Uma vez que o pK_a do DPPG na interface é 1,7 (TOCANNE; TEISSIÉ, 1990), sua monocamada espalhada sobre subfase aquosa de pH 10 está completamente ionizada. A ionização do grupo fosfatidil glicerol sobre a subfase alcalina leva ao aumento de sua solvatação, o que provavelmente provoca mudança na orientação do grupo polar e penetração mais profunda na subfase. A compressão do filme ao longo da região de transição LE-LC causa a desidratação dos grupos polares e consequente mudança na sua conformação aplainando as moléculas de DPPG e simultaneamente aumentando a espessura da monocamada (BAYERL et al, 1990). Portanto, o platô na isoterma em pH 10 pode ser atribuído à alta ionização do filme, porque quando a monocamada está parcialmente ionizada (isto é, sobre água em $\text{pH} < 6$), esse platô não aparece.

Em pH 2, curva rosa da Figura 24 a, o ibuprofeno causa um deslocamento na isoterma do DPPG para menores áreas (condensação da monocamada). O fármaco encontra-se sem carga neste pH e, certamente, não penetra profundamente na monocamada de DPPG na fase expandida, mas se encontra localizado próximo à cabeça do lipídio. Na transição de fase, a interação da monocamada de DPPG com as moléculas de ibuprofeno leva a áreas menores. A razão pode ser que uma interação entre o ibuprofeno e a cabeça do lipídio ocorre na transição de fase com consequente mudança na orientação e/ou na hidratação da cabeça do DPPG que,

em pH 2, encontra-se pouco ionizado. Em pH 10 (curva azul da Figura 24 b) o ibuprofeno não causa deslocamento da isoterma nem no estado líquido-expandido e nem na fase condensada. Entretanto, na região de co-existência da transição de fase, o fármaco provoca na pressão. Em pH 10, tanto o ibuprofeno quanto o DPPG estão altamente ionizados. Neste caso, provavelmente as moléculas de ibuprofeno encontram-se próximas à cabeça do lipídio na transição de fase, mas são expulsas com a compressão da monocamada.

A Figura 25 apresenta as isotermas de potencial de superfície para os filmes de DPPG e DPPG-IBU sobre subfases de pH 2 e 10. Primeiramente será analisado o comportamento dos filmes de DPPG puro. Em subfase de água pura o potencial do DPPG tem valores negativos na fase expandida conforme mostrado na Figura 15. Quando espalhado sobre subfase de pH 2 observa-se aumento no potencial de superfície para valores próximos de 0,1 V (curva preta da Figura 25 a). Em pH 2 o fosfatidil encontra-se pouco ionizado e, portanto, a contribuição da dupla camada elétrica difusa é mínima o que favorece o aumento do potencial. Contudo, em pH 10, o potencial também possui valores positivos na fase líquido-expandida (curva preta da Figura 25 b). Esse resultado contraria a idéia da contribuição da dupla camada elétrica. Uma vez que em pH 10 o DPPG encontra-se altamente ionizado, espera-se que a contribuição da dupla camada elétrica difusa seja ainda maior que em água pura e, portanto o potencial deveria ser negativo. Uma possível explicação para esse resultado é a presença dos íons Na^+ do hidróxido de sódio adicionado na subfase para o ajuste do pH. A incorporação de íons positivamente carregados possivelmente altera a densidade de carga efetiva do filme e com isso a contribuição da dupla camada fica menor o que leva ao aumento do potencial de superfície. As isotermas de potencial de superfície também mostram monocamadas de DPPG mais expandidas sobre subfase ácida ou alcalina comparadas com aquelas obtidas em água pura, assim como observado nas isotermas de pressão de superfície.

Figura 25 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPG e DPPG-IBU espalhadas sobre subfase ácida (a) e alcalina (b).

A diminuição do potencial de superfície para monocamadas mistas de DPPG e ibuprofeno tanto para pH 2 quanto para pH 10 deve-se principalmente à inserção do fármaco no filme. Esse resultado sugere que o ibuprofeno altera a conformação da cabeça do DPPG causando mudanças efetivas no momento de dipolo.

Monocamadas de DPPC

Diferentemente do DPPG, as monocamadas de DPPC foram pouco afetadas pelo co-espalhamento de pequenas quantidades de ibuprofeno. As alterações nas isotermas de pressão e potencial de superfície para concentrações abaixo de 0,5% mol estão dentro do erro dos dados. Entretanto, as concentrações de ibuprofeno acima de 1% co-espalhadas com o DPPC afetam as isotermas de pressão e potencial de superfície, conforme as Figura 26 e Figura 28, respectivamente. Observa-se que as isotermas de DPPC puro estão de acordo com a literatura (MA; ALLEN, 2006). Além disso, houve considerável expansão das isotermas em grandes áreas por molécula de DPPC e a transição de fase líquido-expandida (LE) para a líquido-condensada (LC) foi afetada significativamente. Isso também refletiu em grande alteração no módulo de compressibilidade em pressões superficiais relevantes para membranas celulares,

como pode ser observado na Figura 27. A diminuição no Cs^{-1} significa que o ibuprofeno tornou a monocamada de DPPC mais compressível (mais fluida). Como a expansão da monocamada foi mantida mesmo em altas pressões de superfície, como mostrado na Figura 26, as moléculas de ibuprofeno devem estar inseridas na parte hidrofóbica da monocamada de DPPC, não sendo expelidas sob compressão da monocamada. Além disso, a pressão de superfície do colapso aumentou ligeiramente com a incorporação do ibuprofeno, mostrando maior estabilidade da monocamada, sendo possível comprimir até valores de tensão superficial próximos de zero.

Figura 26 – Isotermas de pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPC e ibuprofeno em uma faixa maior da concentração do fármaco.

Figura 27 – Módulo de compressibilidade vs pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPC/Ibuprofeno em uma faixa maior de concentração do fármaco.

As isotermas de potencial de superfície apresentadas na Figura 28 também evidenciam expansão da monocamada induzida pelo ibuprofeno, um efeito que aumenta com a concentração numa dependência não monotônica. Além disso, a razão dos momentos de dipolo aparente, μ/μ_0 , diminui com a concentração do fármaco, como mostra a Figura 29. A diminuição no momento de dipolo aparente induzido pelo ibuprofeno nas monocamadas de DPPC indica que o fármaco afeta o empacotamento das moléculas de fosfolípido.

Figura 28 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas mistas de DPPC e ibuprofeno para concentrações do fármaco entre 1 e 5 % em mol.

Figura 29 – Razão entre o momento de dipolo para o DPPC/Ibuprofeno (μ) e DPPC puro (μ_0) versus concentração de ibuprofeno em diferentes pressões.

Ao discutir os dados para o DPPG, afirmamos que a metodologia para incorporar o

ibuprofeno poderia de fato afetar a interação. O mesmo se aplica ao DPPC. Em experimentos suplementares com monocamadas de DPPC puro espalhadas sobre subfases contendo ibuprofeno, observamos que o ibuprofeno induziu a expansão nas isotermas de pressão de superfície, mas o formato da transição de fase LE-LC não foi alterado. Isso é mostrado na Figura 30. Além disso, a Figura 31 mostra que o módulo de compressibilidade foi muito menos afetado pelo ibuprofeno, em comparação com as grandes alterações em monocamadas mistas. Parece que a interação foi menos forte – ao menos em termos de penetração na monocamada – quando o ibuprofeno foi adsorvido a partir da subfase, do que quando foi co-espalhado com o fosfolípido. A diferença de comportamento para a incorporação do ibuprofeno a partir da subfase foi quanto à dependência na concentração do fármaco, porque a expansão não aumenta monotonicamente com a concentração, de maneira similar aos resultados encontrados por Lygre e colaboradores (LYGRE; MOE; HOLMSEN, 2003).

Figura 30 – Isotermas de pressão de superfície das monocamadas de DPPC espalhadas sobre subfases contendo várias concentrações do fármaco.

Figura 31 – Módulo de compressibilidade C_s^{-1} vs pressão superficial das monocamadas de DPPC sobre subfases contendo várias concentrações do fármaco.

A Figura 32 mostra isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPC espalhadas sobre subfases contendo diferentes concentrações de ibuprofeno. Assim como nas isotermas de pressão de superfície, observa-se expansão da monocamada com dependência não monotônica com a concentração do fármaco. As alterações no potencial se devem ao efeito cooperativo entre as moléculas de DPPC, uma vez que não se observam interações pronunciadas nas isotermas de pressão de superfície. As curvas para a variação do momento de dipolo que correspondem às pressões de 1 e 30 mN m^{-1} e ao ponto de transição de fase LE-LC são mostradas na Figura 33. Para a concentração de 12,5 μM observa-se aumento no momento de dipolo de até 20% em relação ao lipídio puro nas pressões analisadas. Entretanto, para as concentrações de 25 e 50 μM , em baixas pressões, o momento de dipolo é menor do que o momento de dipolo do lipídio puro. Em 30 mN m^{-1} , o momento de dipolo permanece maior que o do lipídio puro para as três concentrações estudadas.

Figura 32 – Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPC sobre subfases contendo ibuprofeno.

Figura 33 – Razão entre o momento de dipolo do DPPC sobre subfases contendo ibuprofeno (μ) e DPPC sobre subfase de água pura (μ_0) versus concentração de ibuprofeno em diferentes pressões.

Efeito do pH sobre o comportamento das monocamadas mistas de DPPC e ibuprofeno

A Figura 34 mostra as isotermas de pressão de superfície para as monocamadas de DPPC puro e mistas de DPPC-IBU 5% em mol espalhadas sobre subfases de diferentes pHs. Como o pKa do grupo fosfato do DPPC é 1,7 e o sal quaternário de amônio permanece com carga positiva a pHs abaixo de 11, o fosfolipídio é zwitteriônico, possui carga resultante neutra na faixa de pH estudada (NUNES, et al. 2011). O ibuprofeno altera claramente o perfil da isoterma π -A das monocamadas de DPPC puro em pH 2 (Figura 34 a) e pH 10 (Figura 34 b). Em ambos os casos, o ibuprofeno desloca as isotermas para maiores áreas por molécula (expansão) e leva a uma diminuição na cooperatividade da transição de fase, pois a região de coexistência da transição de fase de primeira-ordem é marcada por uma maior faixa de pressão. Em pH 2, o ibuprofeno penetra na monocamada de DPPC na região de transição de fase e permanece inserido mesmo em altas pressões. Em pH 10 o ibuprofeno desloca a isoterma π -A de DPPC para maiores áreas no estado desordenado LE, conforme mostrado na Figura 34 b, e não é expulso com a compressão da monocamada. Esse comportamento é semelhante àquele em pH 6 (Figura 26), e se deve provavelmente à carga negativa do fármaco em pH 6 e 10. Além disso, o efeito do ibuprofeno sobre a pressão de colapso indica que a estabilidade da monocamada aumenta com o pH.

Outro ponto a ser discutido nas isotermas π -A do DPPC puro em diferentes pHs é o fato de a pressão de superfície na região do platô se deslocar para menores valores com a diminuição do pH chegando a ser quase extinta em pH 2. Isso ocorre provavelmente devido ao estado de ionização do grupo fosfato que está praticamente protonado em pH 2. A variação na solvatação do fosfatidil, à medida que se varia também o pH, provoca alterações na conformação dos grupos polares do lipídio, o que é confirmado pelas mudanças nas isotermas de pressão. Outra característica importante é a diminuição da pressão de colapso das monocamadas de DPPC sobre subfases alcalinas. É provável que em pHs elevados a monocamada se torne menos estável, antecipando o processo de colapso.

Figura 34 – Isotermas π -A para monocamadas de DPPC e DPPC-IBU sobre subfase ácida (a) e alcalina (b).

As curvas de potencial de superfície para os filmes de DPPC e DPPC-IBU formados sobre subfase ácida e alcalina são mostradas na Figura 35. De modo geral, o perfil da isoterma para o filme do lipídio puro sobre subfase de pH 2 é bastante parecido com aquele observado para o filme sobre água pura (Figura 28). Em grandes áreas o potencial é nulo, seguido por um aumento rápido do sinal, novamente uma fase intermediária com valores constantes e, finalmente, uma região final com aumento mais lento. Na presença do ibuprofeno, em pH 2, a isoterma de potencial de superfície é similar à do lipídio puro com pequena alteração na região de coexistência da transição de fase. Em pH 10, o potencial inicia em 0,3 V na presença do fármaco porque o potencial de superfície, por ser mais sensível que a medida de pressão, detecta a orientação dos momentos de dipolo ainda que em grandes áreas por molécula. De fato a interação entre o ibuprofeno e o DPPC em pH 10 é observada em grandes áreas na isoterma de pressão de superfície conforme mostrado na Figura 35 b. O ibuprofeno está negativamente carregado e pode, portanto, interagir eletrostaticamente com o grupo colina carregado positivamente. Essa interação deve alterar a orientação da cabeça polar e influenciar a inclinação dos momentos de dipolo de maneira a favorecer o aumento no potencial de superfície em grandes áreas. Entretanto, o valor de ΔV diminui para 0,5 V no colapso comparado com o ΔV final do lipídio puro (0,6 V). A razão para esse resultado deve-

se provavelmente à menor estabilidade da monocamada e possíveis alterações no momento de dipolo causadas pelo ibuprofeno.

Figura 35 – Isotermas ΔV -A para monocamadas de DPPC e DPPC-IBU sobre subfase ácida (a) e alcalina (b).

Estabilidade dos filmes mistos de DPPG ou DPPC e ibuprofeno

A Figura 36 mostra o efeito do ibuprofeno sobre a estabilidade do filme de DPPG por meio das curvas de histerese. As isotermas foram obtidas para a monocamada mista de DPPG e ibuprofeno 5 % em mol espalhada sobre subfase aquosa. A velocidade da barreira foi mantida em 10 mm min^{-1} e a monocamada foi submetida a 11 ciclos de compressão e descompressão. No primeiro ciclo observa-se que o filme é relativamente estável durante a descompressão com pequena diminuição da pressão de superfície. À medida que a monocamada é submetida a mais ciclos de compressão e descompressão, o filme vai perdendo estabilidade mostrando que as moléculas de ibuprofeno se agregam ou vão para a subfase. Na ausência do fármaco essa histerese não é observada (MIÑONES JR. et al, 2003).

Figura 36 – Curvas de compressão e descompressão para monocamada mista de DPPG e ibuprofeno 5% em mol formada sobre subfase aquosa. Velocidade da barreira de 10 mm min⁻¹. Total de 11 ciclos.

No caso do DPPC na Figura 37, as curvas de histerese foram obtidas nas mesmas condições do filme de DPPG. No primeiro ciclo, a curva de descompressão mostra queda rápida de pressão no início da abertura das barreiras. Essa histerese indica formação de agregados irreversíveis durante a compressão do filme ou expulsão de moléculas de ibuprofeno para a subfase, o que não ocorre para o lipídio puro (KAGANER; MÖHWALD; DUTTA, 1999). Comparando com o DPPG, aparentemente as monocamadas de DPPC são menos estáveis na presença do fármaco.

Figura 37 – Curvas de compressão e descompressão para monocamada mista de DPPC e ibuprofeno 5% em mol sobre subfase aquosa. Velocidade da barreira de 10 mm min^{-1} . Total de 11 ciclos.

Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)

Foram investigados os efeitos do ibuprofeno co-espalhado na morfologia das monocamadas de DPPC utilizando a microscopia no ângulo de Brewster, cujas imagens estão na Figura 38 para uma monocamada mista de DPPC-ibuprofeno 5% em mol. Na fase gasosa, uma monocamada de DPPC puro mostrou pequenos domínios dispersos (a), consistentes com a literatura (TOIMIL et al., 2010). Com a compressão da monocamada, os domínios aumentaram em tamanho e na transição de fase LE-LC, em 5 mN m^{-1} , apareceram domínios grandes e de formato irregular (b, c). Em particular, domínios na transição de fase são observados na Figura 38 d. Um aumento contínuo na densidade de domínios com uma camada sólida e uniforme é observado em 40 mN m^{-1} (e). Quando o ibuprofeno foi co-espalhado, a mudança na morfologia com a compressão da monocamada foi similar àquela para a monocamada de DPPC puro, como pode ser observado na Figura 38 (f) até (j). A principal diferença está nos menores tamanhos dos domínios, que aparecem em maior número comparado com o DPPC puro. Além disso, mesmo durante a compressão os domínios permanecem menores. Analogamente às isotermas de pressão superficial, as imagens de BAM indicaram que a transição de fase LE-LC foi afetada pelo ibuprofeno. À medida que a compressão aumenta os domínios vão se unindo para formar uma monocamada quase

uniforme (i, j), mas os domínios que podiam ser visualizados ainda eram pequenos. O grande efeito no tamanho dos domínios é consistente com as alterações verificadas nas isotermas de pressão superficial para o DPPC. Não foram observadas estruturas distintas dentro da resolução do BAM durante compressão dos filmes de DPPG e DPPG-ibuprofeno, portanto estas imagens não estão apresentadas aqui.

Figura 38 – Micrografias das monocamadas de DPPC puro (esquerda) e monocamadas mistas de DPPC-ibuprofeno 5% mol (direita).

PM-IRRAS dos filmes de DPPC e DPPG co-espalhados com o ibuprofeno

Os grandes efeitos causados pelo ibuprofeno quando co-espalhados com DPPC são discrepantes dos resultados de Jabłonowska et al (JABŁONOWSKA; BILEWICZ, 2007), que observaram pequenas mudanças nas isotermas de pressão de superfície para monocamadas mistas de DPPC-ibuprofeno com frações molares menores que 36%. Além disso, efeitos maiores foram observados para monocamadas de DPPC espalhadas sobre subfases contendo ibuprofeno, novamente em contraste com nossos resultados. Motivados por essa discrepância repetimos os experimentos e obtivemos boa reprodutibilidade dos dados. Portanto, não foi possível identificar a razão para as diferenças. É possível, entretanto, resolver essa discrepância usando técnicas espectroscópicas para confirmar que o ibuprofeno interage com os fosfolipídios. Como mostraremos em seguida, empregando o PM-IRRAS asseguramos que existem efeitos significativos para o ibuprofeno co-espalhado com DPPC e DPPG.

A incorporação do ibuprofeno afeta o espectro de PM-IRRAS da monocamada de DPPC, como mostrado na Figura 39 a. De especial relevância foi a mudança no perfil da banda correspondente à frequência de vibração de estiramento antissimétrico do grupo metileno, [$\nu_a(\text{CH}_2)$], em torno de 2920 cm^{-1} , que foi mais estreita na presença do ibuprofeno. Isso é importante porque para fosfolipídios a maneira como o modo de estiramento entre 2800 e 3000 cm^{-1} aparece é útil, pois a frequência e a largura das bandas do metileno são sensíveis à conformação das cadeias alquílicas (MACPHAIL et al., 1984). Portanto, as alterações nos espectros são consistentes com a penetração do ibuprofeno nas caudas hidrofóbicas inferidas nas isotermas de pressão de superfície das monocamadas de DPPC-ibuprofeno.

A Figura 39 b apresenta a banda de estiramento da carbonila $\nu(\text{C=O})$, em 1740 cm^{-1} , para a monocamada de DPPC a 30 mN m^{-1} , que está de acordo com a literatura (BLAUDEZ et al., 1993); (CORVIS et al, 2006); (GROMELSKI; BREZESINSKI, 2004). Como cristais de ibuprofeno mostram uma banda intensa em 1721 cm^{-1} (RAMUKUTTY; RAMACHANDRAN, 2012), quando o ibuprofeno é adicionado ao lipídio esperam-se duas bandas, uma aproximadamente em 1740 cm^{-1} e outra próxima a 1721 cm^{-1} . Porém, o espectro de PM-IRRAS do filme misto de DPPC-ibuprofeno 5 % em mol, a 30 mN m^{-1} , mostra um deslocamento para maior número de onda (1743 cm^{-1}) e dois “ombros” anexados. O fato de o espectro da mistura não ser simples superposição dos espectros de DPPC e ibuprofeno revela que os grupos carbonila do lipídio estão em ambiente diferente quando as moléculas são misturadas. A interação entre as moléculas de ibuprofeno e DPPC também parece ter afetado as ligações de hidrogênio com as moléculas de água nas vizinhanças. Esta conclusão foi

baseada nos deslocamentos para maiores números de onda das vibrações de estiramento do P=O antissimétrico (de 1222 a 1229 cm^{-1}) e simétrico (de 1083 a 1087 cm^{-1}), como mostrado nas Figura 39 (c) e (d), respectivamente. Arrondo e colaboradores investigaram a região entre 1000-1300 cm^{-1} do espectro de infravermelho do DPPC e outras moléculas que contêm grupos fosfato (ARRONDO; GONI; MACARULLA, 1984). Duas bandas foram atribuídas a vários modos vibracionais do grupo fosfato do DPPC com números de onda em 1086 e 1222 cm^{-1} . Eles observaram deslocamentos dessas bandas para maiores números de onda com a hidratação do DPPC. É provável que as mudanças nas ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato e as moléculas de água sejam devidas ao desordenamento do filme causado pelo ibuprofeno.

Figura 39 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC e DPPC-ibuprofeno 5% mol, em 30 mN m^{-1} .

A Figura 40 mostra espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPG puro e de DPPG-ibuprofeno, em que as bandas esperadas para as cadeias alquílicas do DPPG aparecem em 2924, 2900 e 2851 cm^{-1} , atribuídas respectivamente a $v_a(\text{CH}_2)$, $v_s(\text{CH}_3)$ e $v_s(\text{CH}_2)$. Essas atribuições estão de acordo com a literatura (LEWIS et al, 1994). Assim como para o DPPC,

observou-se grande mudança nas cadeias alquílicas, incluindo um deslocamento de 2924 para 2920 cm^{-1} para $\nu_a(\text{CH}_2)$ quando o ibuprofeno foi introduzido. Além disso, para o DPPG a intensidade da banda de estiramento simétrico do CH_3 diminuiu na presença do fármaco, indicando desordem das caudas hidrofóbicas do fosfolípido. Igualmente, o ibuprofeno diminuiu a razão de ordem $[\nu_s(\text{CH}_3)/\nu_s(\text{CH}_2)]$ de 0,78 para 0,19 para a monocamada mista de DPPG-ibuprofeno, influência direta do ibuprofeno sobre o alinhamento do DPPG. Este resultado é coerente com a penetração do ibuprofeno nas caudas hidrofóbicas de DPPG, como indicado nas isotermas de pressão de superfície.

A Figura 40 b mostra a banda de vibração de estiramento do grupo carbonila que aparece em 1731 cm^{-1} . Para as monocamadas de DPPG contendo ibuprofeno esta banda é mais larga com pequeno “ombro” em 1712 cm^{-1} . Para a banda de estiramento antissimétrico do $\text{P}=\text{O}$ houve deslocamento considerável, de 1243 para 1226 cm^{-1} , na Figura 40 c. De acordo com Hübner e colaboradores, o deslocamento desta banda para menores números de onda é reflexo da hidratação e maior número de ligações de hidrogênio com moléculas de água na interface ar-água (HÜBNER; BLUME, 1998); (CASTANO et al, 2005). A banda de estiramento simétrico do $\text{P}=\text{O}$ para a monocamada de DPPG aparece em 1083 cm^{-1} , Figura 40 d, característico de grupos fosfatos hidratados em lipídios (CASAL; MANTSCH; HAUSER, 1987). O pequeno deslocamento para menor número de onda (1080 cm^{-1}) sugere mudanças nas ligações de hidrogênio do grupo fosfato do lipídio.

Figura 40 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPG e DPPG-ibuprofeno 5% mol, em 30 mN m⁻¹.

A concentração de 5% é a mínima concentração com interação significativa, em comum, para o DPPG e para o DPPC (Figura 17 e Figura 26) e, por isso, foi escolhida para fazer as demais caracterizações, inclusive os filmes LB.

Filmes de Langmuir-Blodgett contendo DPPG e ibuprofeno

Confirmada a interação entre o ibuprofeno e a monocamada de DPPG pelas técnicas descritas anteriormente, filmes Langmuir-Blodgett contendo DPPG e ibuprofeno 5 % em mol foram produzidos para verificar se as características do filme misto de Langmuir se mantêm quando transferido a um suporte sólido. Filmes LB foram depositados sobre suportes sólidos de quartzo, com taxa de transferência próxima de 1 para DPPG puro e para DPPG-ibuprofeno 5% em mol. A Figura 41 mostra o espectro na região do UV-vis para a solução de ibuprofeno 2 mM em água. O espectro de absorvância do ibuprofeno puro apresenta duas bandas características: uma em $\lambda = 222$ nm, e outra, de baixa intensidade, em $\lambda = 263$ nm. A banda de absorção em 222 nm pode ser justificada teoricamente pela absorção de luz pelo elétron que

está no nível fundamental (S_0) para o segundo estado singlete excitado (S_2), enquanto que a banda de absorção em 263 nm está associada à promoção do elétron do nível fundamental para o primeiro estado singlete excitado (S_1). A banda em 222 nm possui maior intensidade de fluorescência ou rendimento quântico do que a outra banda em 263 nm, o que mostra que a probabilidade de se promover o elétron do nível fundamental para o segundo estado singlete excitado é maior do que a probabilidade de promovê-lo para o primeiro estado excitado (MANZOORI; AMJADI, 2003).

Figura 41 – Espectro UV-vis para o ibuprofeno puro (2 mM) em água.

A Figura 42 apresenta o espectro na região do ultravioleta-visível para o filme LB contendo uma monocamada de DPPG-ibuprofeno 5% em mol. Observam-se as duas bandas características do fármaco relacionadas à promoção do elétron do estado fundamental para os estados excitados como no caso do ibuprofeno em solução. Contudo, ocorreu deslocamento para o azul. A banda que aparecera em 222 nm se deslocou para 200 nm, e a outra em 263 nm para o ibuprofeno puro foi deslocada para 240 nm na presença do DPPG. Além disso, a intensidade relativa entre as bandas de absorção é diferente para o ibuprofeno puro e no filme LB. É provável que a promoção do elétron do nível fundamental para o segundo estado singlete excitado foi dificultada quando o ibuprofeno foi incorporado ao DPPG. Esses resultados evidenciam a interação entre essas moléculas uma vez que houve modificação na absorção do ibuprofeno. O lipídio altera o microambiente ao redor do fármaco afetando sua

absorção que antes estava em ambiente hidrofílico e no filme LB encontra-se em ambiente hidrofóbico.

Figura 42 – Espectro de UV-vis para o filme LB contendo uma monocamada de DPPG-ibuprofeno 5% em mol.

A Figura 43 mostra os espectros de FTIR para os filmes LB contendo uma monocamada de DPPG e DPPG-ibuprofeno 5% em mol. A região para o modo de vibração de estiramento do CH_2 do fosfolípido puro (curva preta) é dominada por duas bandas com máximos em 2918 e 2850 cm^{-1} , devidas às vibrações de estiramento antissimétrico e simétrico do CH_2 , respectivamente. A banda de estiramento da carbonila para o filme LB de DPPG puro está localizada em 1741 cm^{-1} . BLUME et al (1988) atribuíram a banda em 1739 cm^{-1} ao grupo carbonila livre sugerindo que o grupo polar do lipídio nos filmes transferidos encontra-se no estado desidratado. Resultados semelhantes foram apresentados por Dicko e colaboradores (DICKO; BOURQUE; PÉZOLET, 1998) em filmes LB de DPPG. Em filmes de Langmuir também observaram aumento gradual na frequência da banda C=O com a compressão da monocamada de DPPG, o que foi atribuído ao decréscimo progressivo no grau de hidratação do grupo glicerol com o aumento da pressão de superfície. Comparando as frequências para os filmes de Langmuir do espectro de PM-IRRAS (Figura 40 b) com o de FTIR para o DPPG puro observamos aumento na frequência para a carbonila de 1731 para 1741 cm^{-1} . Esses

resultados estão de acordo com a literatura sugerindo desidratação do filme lipídico em substrato sólido.

Para o filme contendo ibuprofeno, a curva vermelha da Figura 43 mostra bandas em 2960, 2918, 285 e 1734 cm^{-1} , atribuídas aos modos de vibração $\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ e $\nu(\text{C}=\text{O})$, respectivamente. Quanto às bandas referentes às cadeias alquílicas não há diferenças em relação ao espectro do lipídio puro, exceto pelo aparecimento da banda atribuída ao grupo metil, possivelmente proveniente do ibuprofeno. O fato de esta banda não aparecer no espectro de DPPG, assim como as bandas na região do grupo fosfato, pode ser explicado por causa da pequena quantidade de ibuprofeno, o que dificulta sua detecção por FTIR. O deslocamento da banda da carbonila para menor frequência sugere interação entre as moléculas do fármaco e o lipídio nessa região, assim como nos espectros de PM-IRRAS da Figura 40 b.

Figura 43 – Espectros de FTIR para os filmes Langmuir-Blodgett contendo uma monocamada de DPPG puro e DPPG-ibuprofeno 5% em mol.

Implicações Biológicas

Para a análise de possíveis implicações na ação farmacológica do ibuprofeno, discutimos inicialmente os resultados da adsorção do ibuprofeno a partir da subfase, que é a

metodologia mais próxima de sistemas reais. Obviamente, é preciso ter em mente que podemos estabelecer somente correlações, porque o modelo de membrana representado por monocamadas de Langmuir é muito simplificado. Os resultados desta tese apontam para incorporação do ibuprofeno penetrando na parte hidrofóbica das monocamadas de Langmuir, mas com pequenas alterações nas propriedades elásticas da membrana. Os efeitos foram pouco maiores para o fosfolípido zwiteriônico, DPPC, do que para o aniônico, DPPG. A penetração indica que as interações hidrofóbicas também são relevantes, além das interações eletrostáticas. Esses resultados mostram, por exemplo, que a interação entre o ibuprofeno e a COX pode ser modulada dependentemente da conformação da membrana celular. Além disso, os efeitos não aumentam monotonicamente com a concentração do ibuprofeno para o DPPG, o que significa haver partição das moléculas de ibuprofeno com a subfase e formação de agregados dinâmicos na subfase durante a compressão, que são incapazes de adsorver na monocamada.

Nos experimentos em que o ibuprofeno e DPPG ou DPPC foram co-espalhados, a atividade farmacológica mais importante deve estar baseada em alterações na elasticidade da membrana. Os efeitos, entretanto, devem ser mais fortes para o DPPC, para o qual grandes expansões nas monocamadas e diminuição do módulo de compressibilidade puderam ser observadas acima de 1% mol. As alterações na elasticidade podem ser responsáveis pela modificação na morfologia da monocamada, de acordo com os experimentos de BAM, em que a predominância de pequenos domínios foi notada do início ao fim da compressão. A formação de pequenos domínios associados ao aumento do colapso da pressão superficial indica maior estabilidade da monocamada devido à incorporação do ibuprofeno em monocamadas de DPPC. Essa diferença com o DPPG deve ser atribuída às interações eletrostáticas. Possíveis efeitos no DPPG, entretanto, não seguem uma regra porque as monocamadas de Langmuir foram de fato afetadas por pequenas quantidades de ibuprofeno. É provável que o empacotamento das regiões da membrana celular que contêm fosfolípidios carregados deve ser mediado pelo ibuprofeno, num efeito em que a membrana é mais expandida sem ter sua elasticidade afetada.

Os resultados para monocamadas mistas também servem para inferir implicações para sistemas de entrega de drogas baseados em lipossomos, uma vez que a droga deve estar encapsulada nas bicamadas fosfolipídicas. A partir de nossos resultados, fica claro que uma maior quantidade de ibuprofeno pode ser incorporada com o DPPC, cuja liberação deve ser controlada com consideráveis mudanças na elasticidade. Finalmente, devemos mencionar que

as concentrações de ibuprofeno empregadas neste estudo são muito menores do que aquelas administradas em pacientes, o que destaca a importância da interação com os fosfolipídios e a biodisponibilidade da droga em lipossomos. De fato, a incorporação do ibuprofeno em lipossomos de DPPC e DPPG já foi demonstrada, com lenta liberação em filmes automontados (LbL) (GERALDO et al., 2011).

CONCLUSÕES

Esta primeira parte do trabalho descreveu a interação de um agente antiinflamatório, o ibuprofeno, com sistemas que mimetizam a membrana celular consistindo de monocamadas de DPPC e DPPG. O ibuprofeno expandiu as monocamadas nos dois métodos de incorporação, tanto a partir da subfase quanto co-espalhado com os fosfolipídios. As isotermas de pressão de superfície indicam que o ibuprofeno penetrou na parte hidrofóbica da monocamada, com efeitos mais fortes para o DPPC. A penetração foi confirmada com espectroscopia de PM-IRRAS. Essa penetração mais eficaz em fosfolipídio zwitteriônico, mais incomum do que em lipídios aniônicos como o DPPG, pode ser atribuída às interações eletrostáticas com as moléculas de ibuprofeno que devem estar pelo menos parcialmente ionizadas no pH dos experimentos. Uma característica importante foi a grande mudança na elasticidade da monocamada de DPPC quando o ibuprofeno foi co-espalhado na interface ar/água. Além disso, a dependência com a concentração de ibuprofeno também variou com o fosfolipídio. Efeitos significativos foram observados no DPPC apenas quando a concentração de ibuprofeno excedeu 1% mol. Ao contrário, para o DPPG os efeitos do ibuprofeno apareceram também em concentrações mais baixas, típico de efeitos cooperativos. As maiores mudanças induzidas nas monocamadas de DPPC foram confirmadas pelo estudo da morfologia do filme com imagens de BAM.

Quanto às implicações biológicas, os resultados apontam para uma ação farmacológica do ibuprofeno com interação preferencial em regiões hidrofóbicas da membrana, principalmente de lipídios zwitteriônicos, com o empacotamento lipídico sendo afetado pela penetração da droga nas regiões das caudas hidrofóbicas. Quando o ibuprofeno foi co-espalhado com os fosfolipídios, a ação farmacológica pode resultar de grande mudança no módulo de compressibilidade, particularmente em pressões de superfície predominantes em uma membrana celular. Também ficou claro a partir dos resultados que o ibuprofeno pode ser

incorporado em estruturas lipídicas, como já mostrado em lipossomos em estudo prévio (GERALDO et al, 2011), o que é relevante para uso em sistemas de liberação de fármacos.

A interação do ibuprofeno com monocamadas de DPPG também pôde ser confirmada pelos filmes LB cujas análises espectroscópicas evidenciaram alterações nos grupos das moléculas de DPPG na presença do fármaco.

PARTE II

Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) contendo capsaicinóides e fosfolipídios

OBJETIVOS

Preparar, caracterizar e estudar monocamadas de Langmuir e Langmuir-Blodgett constituídas dos fosfolipídios DPPC e DPPG, e capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*).

CAPSAICINÓIDES

Os capsaicinóides são responsáveis pelo sabor picante das pimentas do gênero *Capsicum*. Os principais capsaicinóides, que juntos representam cerca de 90% do total, são a capsaicina (69%) e a dihidrocapsaicina (22%), cujas estruturas moleculares estão na Figura 44. São muito irritantes para a pele e mucosas, e diferem apenas por uma ligação dupla na cadeia alifática da capsaicina (HAYMAN; KAM, 2008).

Figura 44 – Estrutura química da capsaicina (a) e dihidrocapsaicina (b).

A capsaicina apresenta os grupos éter e fenol e um hidrogênio na função amida, permitindo ligações de hidrogênio. Porém, isso não é suficiente para torná-la muito hidrossolúvel, já que a capsaicina se dissolve pouco em água fria, e é solúvel em álcool, benzeno e clorofórmio. A concentração de capsaicina em pimentas leves varia entre 0,5 a 0,3%, em fortes de 0,3% a cerca de 1%. A capsaicina é um analgésico usado topicamente no tratamento de dores de origem neuropática como osteoartrite, artrite reumatóide, neuropatia

diabética e neuralgia pós-herpética, bem como no tratamento sintomático da psoríase (ZI et al., 2008). Ela se liga a um receptor específico dos nervos periféricos, TRPV1, levando a um influxo de cálcio e liberação de neuropeptídeos inflamatórios, associados com as propriedades irritantes da capsaicina. Além disso, a liberação aguda da substância P leva a uma hiperalgesia inicial que, com a continuidade do tratamento, é seguida por depleção de tal substância. Após aplicações repetidas por período variável, o local apresenta diminuição da sensibilidade e bloqueio a estímulos dolorosos, resultando em dessensibilização (reversível com a suspensão do uso) ou lesão irreversível da fibra, dependendo das doses e da duração da exposição (ERIN et al., 2008), (HAYMAN; KAM, 2008).

A formulação comercial da capsaicina é na forma de pomada com 0,025 ou 0,075% de ativo. Em um estudo de caso III que antecedeu a aprovação do produto pelo FDA, os principais efeitos adversos relatados foram eritema, dor e prurido durante ou logo após o uso do produto (<http://www.medline.com/product/Capsaicin-Cream/Pain-Management>). A incorporação deste fármaco em sistemas como lipossomos representa, em hipótese, uma alternativa interessante para a liberação controlada de capsacinóides no local de ação, diminuindo o número de aplicações e a irritabilidade provocada pelo fármaco na pele. Para que a incorporação de capsacinóides em lipossomos constituídos de fosfolipídios seja efetiva, pode ser necessário conhecer em detalhe as interações com esses lipídios, o que é possível com a técnica de Langmuir. Além disso, sabe-se que a capsaicina altera as propriedades físicas da membrana celular, principalmente as elásticas que podem regular funções das proteínas (HOLZER, 1991), (SZOLCSÁNYI, 2004). Neste contexto, também é útil empregar a técnica de Langmuir, e por isso a segunda parte desta tese é dedicada à preparação e estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett formados por DPPC, DPPG e capsacinóides extraídos da pimenta malagueta.

MATERIAIS E MÉTODOS

A oleoresina de capsacinóides extraídos da pimenta malagueta, mostrada na Figura 45, foi cedida pela doutoranda Analine Crespo Ziglio, orientada pela professora Débora Gonçalves do Instituto de Física de São Carlos. Para a extração foram utilizados 250 g de pimenta malagueta e 500 mL de álcool etílico a 99,3%. As pimentas foram colocadas no liquidificador e trituradas com 250 mL de etanol. Essa mistura permaneceu em infusão por

cinco dias e, em seguida, foi filtrada. Os resíduos da filtração foram colocados num segundo recipiente com os 250 mL restantes de etanol. Repetiu-se o processo de infusão-filtração e, em seguida, a mistura foi transferida para um rotaevaporador para eliminar o etanol e obter a oleoresina. Pequenas porções da oleoresina foram colocadas em vácuo por quatro horas para total remoção do etanol. O sal de sódio do dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e o dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) foram comprados na Avanti Polar Lipids; o clorofórmio e o metanol da Merck.

Figura 45 – Pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*).

Os procedimentos para a preparação dos filmes de Langmuir de DPPC e DPPG contendo capsaicinóides foram os mesmos descritos na primeira parte desta tese para monocamadas mistas de fosfolipídios e ibuprofeno. As isotermas de pressão e potencial de superfície foram obtidas com monocamadas mistas de DPPC e/ou DPPG co-espalhados com capsaicinóides (10, 30, 50, 70, 80 e 90% em mol). As monocamadas de capsaicinóides e DPPG-Caps foram transferidas para substratos sólidos para obter filmes LB. A deposição dos filmes de DPPG-Caps foi realizada numa pressão de superfície constante de 40 mN m^{-1} e velocidade de deposição de 1 mm min^{-1} . Já os filmes de capsaicina foram depositados em pressão de 25 mN m^{-1} também com velocidade de 1 mm min^{-1} . Esses filmes foram caracterizados por espectroscopia no UV-Vis e FTIR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Monocamadas de DPPG

Primeiramente o efeito de capsaicinóides sobre a monocamada de DPPG será analisado segundo as isotermas de pressão de superfície dos filmes mistos de DPPG co-espalhado com várias frações molares de capsaicinóides, conforme a Figura 46. A área por molécula da abscissa foi calculada baseando-se na massa molecular média das substâncias. As pressões de colapso para as monocamadas de DPPG puro e capsaicinóides são 57 e 36 mN m⁻¹, respectivamente. Os pontos de colapso para as misturas são ligeiramente maiores do que para o lipídio puro, o que indica maior estabilidade do filme.

Figura 46 – Isotermas π -A para os filmes mistos de DPPG e capsaicinóides.

Em termos de área molecular das monocamadas mistas, o valor ideal da área molecular para as monocamadas mistas de DPPG-Caps, A_{ideal} , pode ser calculado a partir da fração molar dos dois componentes:

$$A_{ideal} = X_{DPPG} A_{DPPG} + X_{Caps} A_{Caps} \quad (\text{Equação 6})$$

Se uma monocamada mista ideal é formada e os componentes são completamente imiscíveis, a área obtida experimentalmente será igual à área ideal. O gráfico da área ideal

versus a fração molar do componente X será uma linha reta. Qualquer desvio dessa reta indica miscibilidade (GONG, et al., 2002). Na realidade, sempre existem forças entre as moléculas da monocamada. A área experimental é determinada pela magnitude das forças entre as moléculas. Para uma monocamada mista, se existirem forças intermoleculares atrativas, a área experimental será menor do que a área ideal. Se a área experimental for maior do que a área ideal, as interações entre os dois componentes são repulsivas, ou mais fracas do que as forças entre as moléculas semelhantes (WU; HUNTSBERGER, 1969).

A Figura 47 mostra curvas de área extrapolada experimental e ideal (calculada conforme a Equação 6) em função da composição de capsaicinóides para os filmes mistos de DPPG-Caps co-espalhados sobre subfase aquosa. Existe um desvio da área extrapolada em relação à idealidade independentemente da concentração de capsaicinóides. Os valores de área extrapolada experimental são maiores que a área ideal para todas as composições da monocamada de DPPG-Caps. A tendência é que os capsaicinóides provocam expansão da monocamada de DPPG. O efeito é mais proeminente para as frações de 70 e 80% em mol de capsaicinóides. Considerando o pKa da capsaicina que é 9,76 (ÅKESSON, 2007), suas moléculas estão pouco ionizadas no pH da água. Então, é possível que a capsaicina interaja com o DPPG, que está negativo, por forças eletrostáticas e hidrofóbicas.

Figura 47 – Área extrapolada em função da composição para monocamadas mistas de DPPG e capsaicinóides sobre subfase aquosa.

A Figura 48 apresenta os resultados do módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para os filmes de DPPG-Caps. Em pressões relevantes para membrana celular ($\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$) os capsaicinóides causam decréscimo no Cs^{-1} para concentrações maiores que 30 % em mol. Esses resultados mostram que a monocamada de DPPG tornou-se mais compressível ou mais fluida na presença da capsaicinóides.

Figura 48 – Módulo de compressibilidade para as monocamadas mistas de DPPG e capsaicinóides.

As isotermas de potencial de superfície em função da área molecular média das monocamadas de DPPG-Caps espalhadas sobre água pura estão na Figura 49. Os efeitos elétricos dos capsaicinóides sobre a monocamada de DPPG são evidentes principalmente para altas concentrações do fármaco. O aumento do ΔV para essas concentrações, ainda no início da compressão do filme, indica formação de agregados condensados, o que é possível detectar por causa da sensibilidade da técnica que reflete a orientação dos momentos de dipolo antes da pressão de superfície.

Figura 49 – Isothermas ΔV -A para os filmes de DPPG contendo várias concentrações de capsaicinóides.

Os momentos de dipolo calculados a partir das isothermas ΔV -A para os filmes mistos de DPPG-Caps em 10 e 30 mN m^{-1} da Figura 50 mostram que a monocamada de DPPG é significativamente afetada pelos capsaicinóides. Para concentrações menores que 30%, o momento de dipolo das moléculas aumenta nas duas pressões estudadas. Possivelmente os capsaicinóides provocam orientação favorável nas moléculas de DPPG nessas concentrações. Como a capsaicina pode formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água nas vizinhanças das cabeças polares do DPPG, é razoável supor que o lipídio se torne menos hidratado na presença do fármaco. Propõe-se que os valores do momento de dipolo aumentam por causa da localização dos capsaicinóides na região polar do lipídio. Para concentrações mais elevadas do fármaco, os efeitos são inversos, principalmente para pressão de 10 mN m^{-1} . Levando em conta que mais moléculas de capsaicinóides estão presentes, o momento de dipolo diminui por causa da maior hidratação dessas moléculas. Portanto, parece haver menos reorientação das moléculas com maior desordenamento do filme em 10 mN m^{-1} . Para a concentração de 90 % em mol do fármaco e na pressão de 30 mN m^{-1} , em particular, o momento de dipolo aumenta. É provável que, nessas condições, o número das moléculas que sofrem desidratação com a compressão do filme seja maior.

Figura 50 – Razão entre os momentos de dipolo dos filmes de DPPG-Caps (μ) e do filme de DPPG puro (μ_0) nas pressões de 10 e 30 mN m⁻¹.

Monocamadas de DPPC

As isotermas π -A das monocamadas de DPPC co-espalhado com capsaicinóides estão na Figura 51. As pressões de colapso para as misturas estão entre a pressão de colapso para o lipídio puro, 61 mN m⁻¹, e a pressão de colapso para a capsaicina, 36 mN m⁻¹. Outra característica é a extinção do patamar de co-existência das fases LE e LC com o aumento da concentração de capsaicinóides.

Figura 51 – Isothermas π -A dos filmes mistos de DPPC e capsaicinóides.

A Figura 52 mostra curvas de área extrapolada experimental e ideal (calculada com a Equação 6) em função da composição de capsaicinóides para os filmes mistos de DPPC-Caps. Assim como nos resultados para DPPG-Caps, existe um desvio da área extrapolada em relação à idealidade independentemente da concentração de capsaicinóides. As áreas extrapoladas experimentais são menores que a ideal para concentrações acima de 30 % em mol de capsaicinóides. Há uma mudança na área ocupada pelo DPPC devido às interações entre a cabeça do lipídio e as moléculas do fármaco. As interações entre os capsaicinóides e o DPPC podem ser uma combinação de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, uma vez que as moléculas de capsaicina estão pouco ionizadas (pKa 9,75). Um comportamento similar foi observado por Kundu e colaboradores na interação entre o tenoxicam e monocamadas de DMPC, em que a área ocupada pelo DMPC foi reduzida pelo tenoxicam (KUNDU, et al., 2009). Eles atribuíram esse deslocamento para menores áreas ao efeito de solubilização dos lipídios na subfase causado pelo fármaco.

Figura 52 – Área extrapolada em função da composição para monocamadas mistas de DPPC e capsaicinóides sobre subfase aquosa.

Os capsaicinóides também causaram decréscimo em C_s^{-1} na monocamada de DPPC, como mostra Figura 53. O DPPC tornou-se mais compressível na presença do fármaco, provavelmente com a perda de moléculas para a subfase de acordo com os resultados de área extrapolada da Figura 52.

Figura 53 – Módulo de compressibilidade para os filmes mistos de DPPC-Caps sobre subfase aquosa.

A Figura 54 mostra isotermas de potencial de superfície das monocamadas de DPPC-Caps sobre subfase aquosa. No colapso, ΔV é menor do que para o lipídio puro, provavelmente devido à perda de moléculas de DPPC para a subfase causada pelos capsaicinóides.

Figura 54 – Isotermas ΔV -A para os filmes de DPPC contendo várias concentrações de capsaicinóides.

A Figura 55 mostra que, na pressão comparável à membrana celular, a componente normal das moléculas de DPPC-Caps diminui, para todas as concentrações do fármaco. Esse resultado reflete, novamente, a perda de moléculas do lipídio para a subfase.

Figura 55 – Razão entre os momentos de dipolo dos filmes de DPPC-Caps (μ) e do filme de DPPC puro (μ_0) nas pressões de 1, 5 e 30 mN m⁻¹.

A estabilidade da monocamada de capsaicinóides na interface ar-água foi verificada por medidas de histerese, ou seja, pela compressão e descompressão do filme por várias vezes (11 ciclos neste caso). As curvas de histerese da Figura 56 mostram que os capsaicinóides não formam um filme estável. Suas moléculas vão parcialmente para a subfase ou formam agregados irreversíveis.

Figura 56 – Histerese da monocamada de capsaicinóides.

Na presença de capsaicinóides, o filme misto de DPPG-Caps na Figura 57a é mais estável do que o filme de DPPC-Caps da Figura 57b. Esses resultados estão de acordo com as curvas da Figura 47 e Figura 52, respectivamente, onde a interação de capsaicinóides é maior com as moléculas de DPPG do que com as de DPPC. Propõe-se que a interação entre capsaicinóides e DPPG ocorre por meio de forças eletrostáticas e hidrofóbicas. No caso do DPPC, as moléculas são solubilizadas para a subfase na presença do fármaco, formando micelas. Essa diferença está relacionada à carga negativa do DPPG. Portanto, é possível que a capsaicina tenha afinidade com regiões carregadas da membrana.

Figura 57 – Histereses das monocamadas de DPPG (a) e DPPC (b) contendo capsaicinóides (50 % em mol).

Filmes de Langmuir-Blodgett contendo DPPG e capsaicinóides

Filmes Langmuir-Blodgett contendo capsaicinóides foram depositados sobre suportes sólidos de quartzo, com taxas de transferência (TR) iguais a 5,7; -0,5 e 1,8 para a primeira, segunda e terceira monocamada, respectivamente. Esses valores de TR caracterizam filmes não homogêneos com a formação de agregados do fármaco durante a compressão da monocamada. O espectro na região do UV-vis para o filme LB contendo capsaicinóides da Figura 58 mostra uma banda em $\lambda = 240$ nm, característica de capsaicinóides (DAVIS et al, 2007).

Figura 58 – Espectro de UV-Vis para o filme LB de capsaicinóides com três monocamadas.

Os filmes LB contendo três monocamadas de DPPG-Caps 50% em mol apresentaram valores de TR iguais a 1,1; -0,8 e 0,8, o que caracteriza uma deposição mais homogênea comparada com a deposição do fármaco na ausência do lipídio. Esse resultado está de acordo com os resultados de estabilidade para monocamadas de DPPG-Caps. O espectro na região do ultravioleta-visível desse filme na Figura 59 apresenta deslocamento para menor comprimento de onda (232 nm) comparado com o espectro do filme LB contendo apenas capsaicinóides (240 nm). Além disso, a banda é mais alargada. Essas alterações refletem a interação entre o DPPG e capsaicinóides. De maneira semelhante ao ibuprofeno, o lipídio altera o microambiente ao redor das moléculas de capsaicinóides afetando sua absorção.

Figura 59 – Espectro UV-Vis para o filme LB contendo três monocamadas de DPPG-Caps 50% em mol.

Na Figura 60 encontra-se o espectro de FTIR da oleoresina de capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta. Há três bandas, em 3395, 2923 e 1038 cm^{-1} e que correspondem ao estiramento dos grupos -OH/-NH , -CH e COC , respectivamente. Os espectros de FTIR dos filmes LB contendo capsaicinóides e DPPG da Figura 61 são dominados pelas duas bandas com máximos em 2918 e 2850 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento antissimétrico e simétrico do CH_2 , respectivamente. Não houve diferenças para essas bandas entre os espectros o que sugere que, ou a interação entre as moléculas não foi na região alquílica, ou a técnica de FTIR não foi suficientemente sensível para detectar tais interações. Para o espectro da capsaicina, a literatura reporta três bandas: em 3350, 2900 e 1050 cm^{-1} atribuídas aos grupos OH/NH , CH e C-O-C , respectivamente (WANG, 2008). O espectro do filme LB contendo capsaicinóides (curva vermelha da Figura 61) não apresenta todas essas bandas. Isso se deve à pequena quantidade de capsaicinóides no filme o que dificulta a análise por FTIR. Esse fato também se aplica às regiões para o modo de vibração dos demais grupos. Quanto aos espectros dos filmes LB de DPPG e DPPG-Caps, a região de estiramento da carbonila está localizada em 1741 cm^{-1} .

Figura 60 – Espectro de FTIR da oleoresina de capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta.

Figura 61 – Espectros de FTIR para os filmes Langmuir-Blodgett de DPPG, Capsaicinóides e misto de DPPG-Caps.

CONCLUSÕES

A segunda parte desta tese descreveu a interação de capsaicinóides, extraídos da pimenta malagueta, com sistemas que mimetizam a membrana celular consistindo de monocamadas de DPPC e DPPG. Os capsaicinóides expandiram as monocamadas de DPPG e aumentaram sua elasticidade. É possível que a capsaicina interaja com o DPPG, que está

negativo, por forças eletrostáticas e hidrofóbicas. As isotermas de potencial de superfície indicaram que os capsaicinóides provocam aumento de 10 % no momento de dipolo numa concentração de 30% em mol. Para os filmes mistos de DPPC e capsaicinóides, a área mínima diminuiu e a elasticidade da monocamada aumentou. De acordo com as isotermas ΔV -A, os momentos de dipolo diminuíram para as monocamadas de DPPC independentemente da concentração de capsaicinóides. Esses resultados sugerem que as moléculas de DPPC são solubilizadas para a subfase na presença do fármaco. Quando os capsaicinóides foram co-espalhados com os fosfolipídios, a ação farmacológica pode resultar de grande mudança no módulo de compressibilidade, particularmente em pressões de superfície predominantes em uma membrana celular ($\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$).

A partir destes resultados, conclui-se que os capsaicinóides podem ser incorporados em estruturas lipídicas, como os lipossomos, o que é relevante para uso em sistemas de liberação de fármacos.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este trabalho descreveu o estudo de monocamadas constituídas por moléculas de interesse biológico por meio das técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett. A primeira parte foi dedicada aos filmes formados por um fosfolipídio aniônico, o DPPG e outro neutro, o DPPC, contendo o antiinflamatório ibuprofeno. A interação entre o fármaco e os lipídios foi analisada pela metodologia de co-espalhamento lipídio-fármaco e pela presença do fármaco em subfase aquosa. Além disso, foi estudada a dependência da concentração do ibuprofeno e pH da subfase com a interação com os fosfolipídios. O ibuprofeno expandiu as monocamadas nos dois métodos de incorporação, tanto a partir da subfase quanto co-espalhado com os fosfolipídios. As isotermas de pressão de superfície indicaram que o ibuprofeno penetrou na parte hidrofóbica da monocamada, com efeitos mais fortes para o DPPC. A penetração foi confirmada com espectroscopia de PM-IRRAS. Essa penetração mais eficaz em fosfolipídio neutro, mais incomum do que em lipídios aniônicos como o DPPG, pode ser atribuída às interações eletrostáticas com as moléculas de ibuprofeno que devem estar pelo menos parcialmente ionizadas no pH dos experimentos. Uma característica importante foi a grande mudança na elasticidade da monocamada de DPPC quando o ibuprofeno foi co-espalhado na interface ar/água. Além disso, a dependência com a concentração de ibuprofeno também variou com o fosfolipídio. Efeitos significativos foram observados no DPPC apenas quando a concentração de ibuprofeno excedeu 1% mol. Ao contrário, para o DPPG os efeitos do ibuprofeno apareceram também em concentrações mais baixas, típico de efeitos cooperativos. A concentração de 5% foi a mínima concentração com interação significativa, em comum, para o DPPG e para o DPPC. As maiores mudanças induzidas nas monocamadas de DPPC foram confirmadas pelo estudo da morfologia do filme com imagens de BAM. A interação do ibuprofeno com monocamadas de DPPG também pôde ser confirmada pelos filmes LB cujas análises espectroscópicas evidenciaram alterações nos grupos das moléculas de DPPG na presença do fármaco.

Na segunda parte deste trabalho, foi estudada a interação de capsaicinóides, extraídos da pimenta malagueta, com monocamadas de DPPC e DPPG. Os capsaicinóides expandiram as monocamadas de DPPG e aumentaram sua elasticidade. É provável que a capsaicina interaja com o DPPG, que está negativo, por forças eletrostáticas e hidrofóbicas. As isotermas de potencial de superfície indicaram que os capsaicinóides provocam aumento de 10 % no

momento de dipolo numa concentração de 30% em mol. Para os filmes mistos de DPPC e capsaicinóides, a área mínima diminuiu e a elasticidade da monocamada aumentou. De acordo com as isothermas ΔV -A, os momentos de dipolo diminuíram para as monocamadas de DPPC independentemente da concentração de capsaicinóides. Esses resultados sugerem que as moléculas de DPPC são solubilizadas para a subfase na presença do fármaco. Quando os capsaicinóides foram co-espalhados com os fosfolipídios, a ação farmacológica pode resultar de grande mudança no módulo de compressibilidade, particularmente em pressões de superfície predominantes em uma membrana celular ($\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$). Estes resultados mostram a possibilidade de incorporação dos capsaicinóides em lipossomos para uso em drug delivery.

Como complementação deste trabalho propõe-se a análise sobre a proporção de capsaicina e demais capsaicinóides extraídos da pimenta malagueta. Além disso, a obtenção da capsaicina pura, por meio da purificação do extrato, poderá dar informações mais precisas sobre o modo de ação do fármaco sobre modelos de membrana. Com isso, estudos sobre a interação dos grupos funcionais das moléculas poderão ser investigados pela técnica de PM-IRRAS.

REFERÊNCIAS

ABE, A.; SHAYMAN, J. A. (2009). The role of negatively charged lipids in lysosomal phospholipase A2 function. **The Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 10, p. 2027-2035.

AHUJA, R. C. et al. (1993). Molecular organization via ionic interactions at interfaces. 1. Monolayers and LB films of cyclic bisbipyridinium tetracations and dimyristoylphosphatidic acid. **Langmuir**, v. 9, n. 6, p. 1534-1544.

ÅKESSON, J. A comparison of two formulations of intradermal capsaicin as models of neurophatic pain in health volunteers. Master thesis in pharmacy – University of Adelaide, Australia (2007).

ALBERTS, B. et al. (2008). **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Garland Science.

ARRONDO, J. L.; GOÑI, F. M.; MACARULLA, J. M. (1984). Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension. A study of the phosphate group vibrations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 794, n. 1, p. 165-168.

AVANTI. Avanti Polar Lipids. Disponível em: <
http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=216&Itemid=206&catnumber=850355> Acesso em 07 NOV. 2012.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-252.

BARANI, H.; MONTAZER, M. (2008) A review on applications of liposomes in textile processing. **Journal of Liposome Research**, v.18, n. 3, p. 249-262.

BAYERL, T. M. et al. (1990). Specular reflection of neutrons at phospholipid monolayers. Changes of monolayer structure and headgroup hydration at the transition from the expanded to the condensed phase state. **Biophysical Journal**, v. 57, n. 5, p. 1095-1098.

BLAUDEZ, D. et al. (1993). Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied Spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 869-874.

BLUME, A.; HUBNER, W.; MESSNER, G. (1988). Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. **Biochemistry**, v. 27, n. 21, p. 8239–8249.

BORISSEVITCH, G. P.; TABAK, M.; BORISSEVITCH, I. E.; OLIVEIRA JR.; O. N. (1996). Interaction of dipyridamole derivatives with lipids in mixed floating Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 7, n. 1-2, p. 69-81.

BORISSEVITCH, G. P.; TABAK, M.; OLIVEIRA JR.; O. N. (1996). Interaction of dipyridamole with lipids in mixed Langmuir monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1278, n.1, p. 12-18.

BROCKMAN H. (1999). Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 4, p. 438-443.

CASAL, H. L.; MANTSCH, H. H.; HAUSER, H. (1987). Infrared studies of fully hydrated saturated phosphatidylserine bilayers. Effect of Li^+ and Ca^{2+} . **Biochemistry**, v. 26, n. 14, p. 4408-4416.

CASPERS, J. et al. (1983). Acido-basic properties of lipophilic substances: a surface potential approach. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 546-551.

CASTANO, S. et al. (2005). Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1668, n. 1, p. 87-98.

CHAKRABORT, H.; BANERJEE, R.; SARKAR, M. (2003). Incorporation of NSAIDs in micelles: implication of structural switchover in drug-membrane interaction. **Biophysical Chemistry**, v. 104, n.1, p. 315-325.

CHAKRABORT, H.; ROY, S.; SARKAR, M. (2005). Interaction of oxicam NSAIDs with DMPC vesicles: differential partitioning of drugs. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 138, n. 1-2, p. 20-28.

CORVIS, Y. et al. (2006). Interactions of a fungistatic antibiotic, griseofulvin, with phospholipid monolayers used as models of biological membranes. **Langmuir**, v. 22, n. 18, p. 7701-7711.

DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. (1963). **Interfacial Phenomena**. 2nd ed, New York: Academic

Press.

DAVIS, C. B.; MARKEY, C. E.; BUSCH, M. A.; BUSCH, K. W. (2007). Determination of capsaicinoids in Habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 5925–5933.

DEMCHAK, R. J.; FORT, T. J. (1974). Surface dipole moments of close-packed un-ionized monolayers at the air-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 46, n. 2, p. 191-202.

DICKO, A.; BOURQUE, H.; PÉZOLET, M. (1998). Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air–water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1-2, p. 125–139.

DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA JR., O. N. (2001). Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 221-293.

ERIN, N.; ZIK, B.; SARIGÜL, M.; TÜTÜNCÜ, S. (2008). The effects of chronic low-dose capsaicin treatment on substance P levels. **Regulatory Peptides**, v. 153, n. 1-3, p. 83-87.

FERREIRA, H. et al. (2005). Effect of anti-inflammatory drugs on splenocyte membrane fluidity. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 144-149.

FERREIRA, M. et al. (2005). Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510.

GERALDO, V. P. N.; MORAES, M. L.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JR., O. N. (2011). Immobilization of ibuprofen-containing nanospheres in layer-by-layer films. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 2, p. 1167-1174.

GONG, K.; FENG, S. S.; GO, M. L.; SOEW, P. H. (2002). Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A**, v. 207, n. 1-3, p. 113-125.

GROMELSKI, S.; BREZESINSKI, G. (2004). Adsorption of DNA to zwitterionic DMPE monolayers mediated by magnesium ions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 24, p. 5551-5556.

HAWKEY, C. J. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 521-535.

HAYMAN, M.; KAM, P. C. A. (2008). Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 19, n. 5, p. 338-343.

HELZER, P. (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 143-201.

HÉNON, S.; MEUNIER, J. (1991). Microscope at the Brewster angle: direct observation of first-order phase transitions in monolayers. **Review of Scientific Instruments**, v. 62, n. 4, p. 936-939.

HIANIK, T. (2006). Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. **Acta Physica Slovaca**, v. 56, n. 6, p. 687-805.

HIDALGO, A. A.; CAETANO, W.; TABAK, M.; OLIVEIRA JR.; O. N. (2004). Interaction of two phenothiazine derivatives with phospholipid monolayers. **Biophysical Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 85-104.

HÖENING, D.; MOEBIUS, D. (1991). Direct visualization of monolayers at the air–water interface by Brewster angle microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 12, p. 4590-4592.

HOLMSEN, H. et al. (2008). The psychotropic drug olanzapine (Zyprexa[®]) increases the area of acid glycerophospholipid monolayers. **Biophysical Chemistry**, v. 134, n. 1-2, p. 39-46.

HÜBNER, W.; BLUME, A. (1998). Interactions at the lipid-water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1-2, p. 99-123.

JABŁONOWSKA, E.; BILEWICZ, R. (2007). Interactions of ibuprofen with Langmuir monolayers of membrane lipids. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 7-8, p. 3962-3966.

KAGANER, V. M.; MÖHWALD, H.; DUTTA, P. (1999). Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. **Reviews of Modern Physics**, v. 71, n. 3, p. 779-819.

KIVINEN, A.; VIKHOLM, I.; TARPILA, S. (1994). A film balance study of the monolayer forming properties of dietary phospholipids and the interaction with NSAIDs on the

monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 108, n.2, p. 109-115.

KOPPENOL, S.; YU, H.; ZOGRAFI, G. (1997). Mixing of saturated and unsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylglycerols in monolayers at the air/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 189, n.1, p. 158-166.

KORCHOWIEC, B. et al. (2007). Calixarenes in a membrane environment: a monolayer study on the miscibility of three *p-tert*-butylcalix[4]arene β -lactam derivatives with 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.111, n.46, p. 13231-13242.

KUNDU, S.; CHAKRABORTY, H.; SARKAR, M.; DATTA, A. (2009). Interaction of oxicam NSAIDs with lipid monolayer: anomalous dependence on drug concentration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 70, n.1, p. 157-161.

LASIC, D. D.; PAPAHAJOPOULOS, D. (1995). Liposomes revisited. **Science**, v. 267, n. 5202, p. 1275-1276.

LEWIS, R. N.; MCELHANEY, R. N.; POHLE, W.; MANTSCH, H. H. (1994). Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. **Biophysical Journal**, v. 67, n. 6, p. 2367-2375.

LODISH, H. et al. (2008). **Molecular and cell biology**. 6th ed. New York: W. H. Freeman.

LYGRE, H.; MOE, G.; HOLMSEN, H. (2003). Interaction of ibuprofen with eukaryotic membrane lipids. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 61, p. 303-309.

MA, G.; ALLEN, H. C. (2006). DPPC Langmuir monolayer at the air-water interface: probing the tail and head groups by vibrational sum frequency generation spectroscopy. **Langmuir**, v. 22, n. 12, p. 5341-5349.

MACPHAIL, R. A.; STRAUSS, H. L.; SNYDER, R. G.; ELLIGER, C. A. (1984). Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 2. Long, all-trans chains. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 334-341.

MANZOORI, J. L.; AMJADI, M. (2003). Spectrofluorimetric study of host-guest complexation of ibuprofen with β -cyclodextrin and its analytical application. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 59, n. 5, p. 909-916.

MARTIN, E. S.; KONOVALOV, O.; DAILLANT, J. (2007). Studies of phospholipid monolayer at liquid/liquid interface in presence of an antimicrobial peptide. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 14, p. 5687-5690.

MEDLINE. Disponível em: <<http://www.medline.com/product/Capsaicin-Cream/Pain-Management>> Acesso em 2 JUL. 2012.

MEMBRANA CELULAR. Portal São Francisco. Disponível em:<<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/membrana-celular/index-membrana-celular.php>> Acesso em 07 NOV. 2012.

MIÑONES JR. et al. (2003). Orientational changes in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol Langmuir monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 265, n. 2, p. 380-385.

MIRAFZALI, Z.; LEIPPRANDT, J. R.; MCCracken, J. L.; DEWITT, D. L. (2006). Topography of the prostaglandin endoperoxide H2 synthase -2 in membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 38, p. 28354-28364.

MUELLER, P.; RUDIN, D. O.; TIEN, H. T.; WESCOTT, W. C. (1963). Methods for the formation of single biomolecular lipid membranes in aqueous solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 534-535.

NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S. (2000). Structure of lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 159-195.

NANOTECNOLOGIA HOJE. Disponível em: <<http://nanohoje.blogspot.com.br/2011/03/para-falar-fluentemente-lingua-do.html>> Acesso em 23 NOV. 2012.

NOBRE, T. M. et al. (2010). The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1798, n. 8, p. 1547-1555.

NUNES, C. et al. (2011). NSAIDs interactions with membranes: a biophysical approach. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10847-10858.

OLIVEIRA JR., O. N. et al. (1989). Estimation of group dipole moments from surface potential measurements on Langmuir monolayers. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 85, n. 4, p. 1009-1018.

OLIVEIRA JR., O. N.; BONARDI, C. (1997). The surface potential of Langmuir monolayers revisited. **Langmuir**, v. 13, n. 22, p. 5920-5924.

OLIVEIRA JR., O. N.; RAPOSO, M.; DHANABALAN, A. (2001). **Langmuir-Blodgett (LB) and self-assembled (SA) polymeric films**. In: NALWA, H. S. **Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials**. New York: Academic Press.

OLIVEIRA JR., O. N.; TAYLOR, D. M.; MORGAN, H. (1992). Modelling the surface potential-area dependence of a stearic acid monolayer. **Thin Solid Films**, v. 210-211, n. 1, p. 76-78.

PAAVOLA, A.; KILPELÄINEN, I.; YLIRUUSI, J.; ROSENBERG, P. (2000). Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 1, p. 85-93.

PAVINATTO, F. J. et al. (2009). Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 10051-10061.

PETTY, M. C. (1996). **Langmuir-Blodgett films: an introduction**. Cambridge: Cambridge University Press.

PICOT, D.; LOLL, P. J.; GARAVITO, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase -1. **Nature**, v. 367, n. 6460, p. 243-249.

RAMUKUTTY, S.; RAMACHANDRAN, E. (2012). Growth, spectral and thermal studies of ibuprofen crystals. **Crystal Research and Technology**, v. 47, n. 1, p. 31-38.

ROBERTS, G. (1990). **Langmuir-Blodgett Films**. New York: Plenum Press.

RUAN, K. -H.; DENG, H.; WU, J.; SO, S. -P. (2005). The N-terminal membrane anchor domain of the membrane-bound prostacyclin synthase involved in the substrate presentation of the coupling reaction with cyclooxygenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n.2, p. 372-381.

SEEMAN, P. (1972). The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. **Pharmacological Reviews**, v. 24, n. 4, p. 583-655.

SINGER, S. J.; NICOLSON G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731.

SOUZA, S. M. B. et al. (2004). Study of the diclofenac/phospholipid interactions with liposomes and monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 36, n. 1, p. 13-17.

SPENCER, A. G. et al. (1998). Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases -1 e -2 by immunoelectron microscopy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9886-9893.

SZOKA JR, F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). **Annual Review of Biophysics & Bioengineering**, v. 9, p. 467-508.

SZOLCSÁNYI, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**, v. 38, n. 6, p. 377-384.

TAFANI, M. et al. (2002). Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 10073-82.

TAYLOR, D. M.; OLIVEIRA JR., O. N.; MORGAN, H. (1990). Models for interpreting surface potential measurements and their application to phospholipid monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 139, n. 2, p. 508-518.

TOCANNE, J. F.; TEISSIÉ, J. (1990). Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1031, n.1, p. 111-142.

TOIMIL, P.; PRIETO, G.; MIÑONES JR., J.; SARMIENTO, F. (2010). A comparative study of F- DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 13323-13332.

VOGEL, V.; MÖBIUS, D. (1988). Local surface potentials and electric dipole moments of lipid monolayers: contributions of the water/lipid and the lipid/air interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 126, n. 2, p. 408-420.

VOLLHARDT, D.; FAINERMAN, V. B.; SIEGEL, S. (2000). Thermodynamic and textural characterization of DPPG phospholipid monolayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 17, p. 4115-4121.

WANG, J. C.; CHEN, S. H.; XU, Z. C. (2008). Synthesis and properties research on the nanocapsulated capsaicin by simple coacervation method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, n. 5, p. 687-695.

WEAST, R. C.; ASTLE, M. A. (1985). **Handbook of data on organic compounds**. Boca Raton: CRC Press.

WIĘCLAW, K. et al. (2009). Meloxicam and meloxicam- β -cyclodextrin complex in model membranes: effects on the properties and enzymatic lipolysis of phospholipid monolayers in relation to anti-inflammatory activity. **Langmuir**, v. 25, n. 3, p. 1417-1426.

WU, S.; HUNTSBERGER, J. R. (1969). Intermolecular interaction in some mixed polymer monolayers at the air water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 29, n.1, p. 138-147.

ZHANG, L. et al. (2008), Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 83, n. 5, p. 761-769.

ZI, P. et al. (2008). Effect of HP β CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, n. 1-2, p. 151-158.