

Felippe José Pavinatto

Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

São Carlos

2010

Felippe José Pavinatto

Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais. Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

São Carlos 2010 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 elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Pavinatto, Felippe José

Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) / Felippe José Pavinatto; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior - São Carlos, 2010.

159 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de Concentração: 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.

1. Quitosana. 2. Fosfolipídios. 3. Colesterol. 4. Membranas celulares. 5. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. 1. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felippe José Pavinatto

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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.

Aprovado(a) em: 13.12.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Osvaldo Novais de Oliveira Junior

Instituição: IFSC/USP

Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Marcia Rodrigues Pereira

Instituição: UFRN

Assinatura Unda R Parana

Prof(a). Dr(a). Sergio Paulo Campana Filho Instituição: IQSC/USP Assinatura____

Prof(a). Dr(a). Patricia Alexandra Antunes

Instituição: UNOESTE

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marisa Masumi Beppu Instituição: UNICAMP Assinat

Assinatura

Dedico esta Tese a Deus, pai de Jesus Cristo, que me deu força, sabedoria, capacidade e me iluminou a seguir esse caminho.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pai de Jesus Cristo, a quem eu dedico esta tese, por Ele ter me permitido e ter me ajudado a realizar esse trabalho de doutorado.

À Thatyane Morimoto Nobre Pavinatto, minha esposa, amiga, colaboradora e pessoa que me completa. Agradeço por sua existência em minha vida, pelo amor recíproco que temos, e por me dar suporte em tudo, estando sempre ao meu lado.

Aos meus pais Antônio Tadeu Pavinatto e Maria Benedita Silveira Pavinatto, por serem os responsáveis pela minha educação, caráter e por minha formação como homem. Também por todo o amor e apoio ao longo de toda a minha vida. Da mesma forma, a minha irmã Adriana Pavinatto, pela amizade, companheirismo e por estar sempre comigo.

Ao professor Osvaldo N. Oliveira Jr. (Chu), por me orientar nos últimos oito anos, me dando total incentivo, confiança e autonomia; me apoiando em tudo que contribuiu para minha formação, especialmente durante o período de doutorado. Agradeço ao Chu principalmente pela amizade.

Às pessoas fundamentais para a realização deste trabalho de doutorado, que contribuíram com experimentos e/ou discussões, e que são grandes amigos: Luciano Caseli, Adriana Pavinatto, Thatyane Morimoto Nobre Pavinatto e David Sotero dos Santos Jr. Também agradeço muito aos professores e amigos, Paulo Miranda, Heurison Silva, Maria Elisabete D. Zaniquelli e Ana Barros-Timmons, que me ajudaram bastante durante o doutorado.

Aos amigos da USP-IFSC: Ademir, Bertho, Níbio, Rô, Simone, Débora Balogh, Júnior, Edson, Rafaela, Xuxa, Toni, Guidoval, Néia e Thiers, pela grande amizade e convivência.

Aos amigos da Universidade de Valladolid: Casé, Priscila, Mariluz, Jose Antonio, Juanjo, Mônica e Glória, também pela grande amizade.

Aos grandes amigos da família que, embora alheios ao tema do doutorado, me ajudaram indiretamente dando suporte na realização dos trabalhos e escrita da tese: Vera, Juliano, Osny, Marija, Osnyzinho, Mardoqueu, Vô Zé, Vó Nena e Vó Maria.

À Maria Neusa de Aguiar Azevedo, da biblioteca do IFSC, por ter contribuído determinantemente para a excelente formatação e organização da tese.

Finalmente, à USP, por me permitir realizar o doutorado paralelamente ao meu trabalho como especialista de laboratório; e ao Corinthians, pela motivação dada com as alegrias e os gols nesses 100 anos.

PAVINATTO, F. J. *Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB).* 2010. 159 p. 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, 2010.

Quitosana é um polissacarídeo usado em diversas aplicações biológicas, por exemplo, em entrega controlada de drogas, transfecção, aceleração da cicatrização de feridas e como agente bactericida, entre outras. Em todas essas aplicações, o polímero interage com tecidos e células. Entretanto, embora sua ação seja comprovada, os mecanismos de ação e a interação do polímero com células e biomembranas no nível molecular ainda não são conhecidos. Nesta tese de doutorado, filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de lipídios foram usados como modelos de membrana celular para estudar em nanoescala a interação e os efeitos causados pela quitosana. Primeiramente, observouse que a quitosana, um polieletrólito solúvel em pH ácidos, possui atividade superficial induzida na presença de um filme interfacial de lipídio, demonstrando que o polímero possui interação favorável com membranas. Após adsorver sobre as monocamadas, a quitosana expande as mesmas, o que ocorre apenas até uma determinada concentração de polímero, denominada concentração de saturação. A magnitude dessa expansão é menor para filmes compactos, o que sugere que a quitosana é parcialmente expulsa da interface, localizando-se na subsuperfície. Isso foi comprovado com o uso de filmes LB, que mostraram que filmes mistos com quitosana têm rugosidade cerca de 10 vezes a de filmes puros de ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA). Foi possível confirmar que a quitosana penetra na monocamada, formando agregados com até 150 nm de altura. Além disso, a maior orientação das moléculas de fosfolipídios, sugerida por isotermas de potencial de superfície (ΔV -A) para filmes de Langmuir, também foi comprovada para os filmes LB por medidas de espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG). Filmes mistos de DMPA e colesterol também foram estudados, sendo que o colesterol provoca condensação nos filmes de DMPA a baixas pressões, mas expande as monocamadas em altos estágios de compactação. Quando a quitosana interage com os filmes mistos, ela provoca a mesma expansão para todas as monocamadas independentemente da proporção de colesterol na mistura. Embora esse comportamento possa sugerir um papel inerte do colesterol, ele é explicado pela modulação da penetração da quitosana nos filmes pelo colesterol. Isso ocorre porque há um número fixo de pontos de interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ da quitosana e PO_2^- do DMPA, o que foi comprovado por medidas de espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS). Com esta técnica para filmes de Langmuir, e espectroscopia SFG para filmes LB, pôde ser traçado um panorama dos efeitos da inserção de colesterol na membrana de DMPA, seguido da interação da quitosana com a membrana mista. A adição do colesterol ao filme de fosfolipídio acarreta em diminuição da ordem das cadeias de DMPA, detectado por variações nas bandas de $v_s(CH_2)$ e $v_{ass}(P=O)$ do fosfolipídio no espectro de PM-IRRAS, e pela razão $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$ nos espectros de SFG. Por outro lado, a interação da quitosana com esse filme misto causa recuperação da orientação das caudas polares do fosfolipídio, verificada pela análise das mesmas bandas de PM-IRRAS e pela razão $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$, que diminui de 6,62 para 4,58 com a adição de colesterol, mas volta a 5,97 após a interação com o polímero. De forma geral, a ação da quitosana sobre biomembranas é governada principalmente por interações eletrostáticas com lipídios carregados negativamente, na superfície externa das mesmas. Dentre os principais efeitos causados pelo polímero, destaca-se a diminuição da elasticidade da membrana e o aumento da orientação das moléculas de lipídio, que podem ter importantes implicações biológicas. A observação de uma concentração de saturação dos efeitos, na maioria dos casos, sugere que a dosagem e a estrutura química da quitosana devem ser bem controladas para alcançar o efeito biológico desejado.

Palavras-chave: Quitosana, Fosfolipídios, Colesterol, Membranas celulares, Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett.

PAVINATTO, F. J. *Interaction between chitosan and cell membrane models: Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) films.* 2010. 159 p. 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, 2010.

Chitosan is a polyssaccharide with many biological applications, as in drug delivery, transfection, wound healing and as bactericidal agent, for instance. In all these applications the polymer interacts with tissues and cells. The efficacy of chitosan has been proven, but the mechanisms of action and the interactions with cells and biomembranes are still unknown. In this thesis, Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) films made of lipids were employed as cell membrane models, in order to investigate the interactions and modulations caused by chitosan at the molecular level. Firstly, the soluble polyelectrolyte chitosan was found to induce surface activity when a lipid monolayer is at the air/water interface, demonstrating that the interaction of chitosan with membranes is favorable. Upon chitosan adsorption, the monolayers were increasingly expanded with increasing chitosan concentration in the subphase up to a saturation concentration. The extension of this expansion was lower for highly packed films, suggesting that chitosan was partially expelled from the interface after the compression, being located at the sub-monolayer region. This was confirmed by the 10fold increase in film roughness observed for the areas without aggregates in LB films. Also, we could observe aggregates as high as 150 nm on the film surface, thus confirming chitosan penetration in the dimyristoyl phosphatidic acid (DMPA) monolayer. Mixed DMPAcholesterol Langmuir monolayers were also produced, with cholesterol inducing condensation of the DMPA films at low pressures, and film expansion at high pressures. Regardless of the cholesterol proportion in the film, chitosan always induced the same degree of expansion on the DMPA mixed monolayers as for a neat DMPA monolayer. Although this behaviour may suggest an inert role for cholesterol, it can only be explained if the sterol is assumed to regulate the extension of chitosan penetration into the monolayer. This occurs because there is a fixed number of sites for electrostatic interactions between NH₃⁺ groups from chitosan and PO₂⁻ from DMPA, probed by infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS) measurements. Indeed, with PM-IRRAS measurements for Langmuir monolayers and SFG measurements for LB films, we could establish an overview of the effects from cholesterol on DMPA films upon interaction with chitosan. The addition of cholesterol to the DMPA monolayer caused a decrease in the chain order, which was detected by changes in the $v_s(CH_2)$ and $v_{ass}(P=O)$ bands from the phospholipid in the PM-IRRAS spectrum, and by the $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$ intensity ratio in sum-frequency generation spectroscopy (SFG) measurements. On the other hand, the interaction of chitosan with these mixed monolayers restored chain order, as observed from the analysis of PM-IRRAS bands and the $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$ in SFG. The latter dropped from 6.62 to 4.58 with cholesterol addition, but further increased to 5.97 with the chitosan interaction. Overall, the chitosan action on biomembranes is mainly governed by electrostatic interactions with negatively charged lipids at the external leaflet of the membrane. The main effects from chitosan to the membrane models are the decrease in membrane elasticity and the increase in molecular ordering, which can lead to important biological implications. Moreover, the existence of the so-called concentration of saturation for most systems suggests that the dosage and chemical structure of chitosan must be well controlled to obtain the desired biological effect.

Keywords: Chitosan, Phospholipids, Cholesterol, Cell membranes, Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) films.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Estrutura química da Quitina e Quitosana. "n" indica o grau de polimerização, no caso da quitina, e o grau de acetilação (DA) no caso da quitosana. X ⁻ representa o contra-íon proveniente do ácido usado para solubilização da quitosana. 28
Figura 2 -	Estrutura química dos principais lipídios da membrana celular. Os radicais R_1 , R_2 e R_3 representam as longas cadeias hidrofóbicas (caudas), onde n é normalmente maior que 13 e algumas insaturações podem aparecer. O grupo X representa as porções polares (cabeças) dos fosfolipídios e esfingolipídios, em que se liga o grupo fosfato
Figura 3 -	Desenho esquemático de uma membrana plasmática composta por uma matriz de bicamada lipídica na qual estão inseridas proteínas transmembrana e proteínas periféricas. Figura retirada do website http://medicinahumana.net/blog/?p=7
Figura 7 -	Ilustração de um sensor de papel de filtro imerso parcialmente na água, como no método de Wilhelmy
Figura 8 -	Isotermas π -A para monocamadas de DPPC formadas sobre diferentes subfases com pH 3: — Solução aquosa de HCl; — Tampão TS; — Tampão acetato
Figura 9 -	Evolução da pressão de superfície com o tempo (cinética de adsorção) para uma solução de quitosana 0,200 mg/mL em tampão TS adsorvendo sobre interface limpa (curva preta) ou sobre uma monocamada de DPPC (curva vermelha)
Figura 10 -	Cinética de adsorção da quitosana (0,200 mg/mL em tampão TS) sobre um filme interfacial de DPPC com pressão inicial de 32,5 mN/m. Encarte: Variação da pressão ($\Delta \pi$) <i>versus</i> a pressão inicial do filme de DPPC (π_i) 68
Figura 11 -	Cinética de adsorção da quitosana (0,200 mg/mL em tampão TS) sobre um filme interfacial de DPPG com pressão inicial de 32,0 mN/m. Encarte: Variação de $\Delta \pi \operatorname{com} \pi_i$
Figura 12 -	Isotermas π -A para monocamadas de DPPC formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)
Figura 13 -	Variação de área por molécula na pressão de 17 mN/m (curva preta) e de pressão de superfície na área de 80 Å^2 /mol (curva vermelha) com relação a concentração de quitosana na subfase de filmes de DPPC
Figura 14 -	Isotermas π -A para monocamadas de DPPG formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)

Figura 15 -	Variação de área por molécula na pressão de 17 mN/m (curva preta) e de pressão de superfície na área de 80 $Å^2$ /mol (curva vermelha) com a concentração de quitosana na subfase de filmes de DPPG72
Figura 16 -	Elasticidade no plano (Cs ⁻¹) para monocamadas de DPPC formadas sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura). As curvas foram calculadas a partir das isotermas π -A da figura 12 usando a equação de Cs ⁻¹ , dada no capítulo 3.4.3
Figura 17 -	Cs ⁻¹ para monocamadas de DPPG formadas sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura)
Figura 18 -	Curvas de compressão e descompressão para monocamadas de DPPC e DPPG formadas sobre tampão TS contendo 0,200 mg/mL quitosana dissolvida. Velocidade da barreira de 10 mm/min
Figura 19 -	Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPC formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)76
Figura 20 -	Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPG formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)77
Figura 21 -	Potencial de superfície inicial das curvas na figura 19 <i>versus</i> concentração de quitosana na subfase
Figura 22 -	Potencial de superfície inicial das curvas na figura 20 <i>versus</i> concentração de quitosana na subfase
Figura 23 -	Isotermas π -A para filmes de Langmuir de DMPA sobre subfase de HCl 1 mM contendo diversas concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)
Figura 24 -	Cs ⁻¹ para monocamadas de DMPA sobre subfase de HCl 1mM contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura)
Figura 25 -	Variação de área por molécula e elasticidade no plano com a concentração de quitosana na subfase para filmes de Langmuir de DMPA na pressão de 40 mN/m
Figura 26 -	Isotermas ∆V-A para monocamadas de DMPA formadas sobre subfase de HCl 1mM contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura)
Figura 27 -	Massa total depositada medida por nanogravimetria em QCM para filmes de DMPA e DMPA+quitosana
Figura 28 -	Acréscimo de massa para as camadas ímpares, calculadas a partir do gráfico da figura 27, para filmes de DMPA e DMPA+quitosana

Lista de Figuras

Figura 29 -	Espectro de FTIR para filmes LB de 11 camadas de DMPA e DMPA+quitosana
Figura 30 -	Espectros de SFG para filmes LB de DMPA e DMPA+quitosana com 1 camada
Figura 31 -	Imagens de AFM de filmes LB com 1 camada de DMPA [A] ou DMPA+quitosana [B]
Figura 32 -	Isotermas de π -A para monocamadas de colesterol sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)
Figura 33 -	Cs ⁻¹ para monocamadas de colesterol sobre subfase de Tampão TS pH 3,0 contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura)
Figura 34 -	Variação da elasticidade no plano e da área por molécula versus concentração de quitosana na subfase para filmes de Langmuir de colesterol na pressão de 30 mN/m
Figura 35 -	Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de colesterol formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)
Figura 36 -	Potencial de superfície inicial (ΔV_i) das curvas na figura 35 <i>versus</i> concentração de quitosana na subfase
Figura 37 -	Isotermas π -A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3. A área por molécula foi calculada com a massa molar de cada componente ponderada pela quantidade dos mesmos na mistura
Figura 38 -	Isotermas ΔV -A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3101
Figura 39 -	Variação da área por molécula medida (retirada da figura 37) e calculada (pela equação 16) com a proporção de DMPA nos filmes mistos DMPA-colesterol: [A] $\pi = 5$ mN/m, e; [B] $\pi = 30$ mN/m
Figura 40 -	Isotermas π -A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A porcentagem de DMPA é mostrada no encarte da figura 103
Figura 41 -	Isotermas ΔV -A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A porcentagem de DMPA é mostrada no encarte da figura 104
Figura 42 -	[A] Região entre 2800 e 2950 cm ⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura). [B] variação do máximo da banda da vibração v_s (CH ₂) com a pressão de superfície

Figura 43 -	Região entre 1200 e 1240 cm ⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura)
Figura 44 -	Região entre 2800 e 2950 cm ⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura)
Figura 45 -	Região entre 1210 e 1240 cm ⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura)
Figura 46 -	Região entre 1520 e 1570 cm ⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura).
Figura 47 -	Espectro de PM-IRRAS na região entre 2875 e 2975 cm ⁻¹ para um filme de Langmuir de colesterol sobre tampão TS pH 3,0 puro (curva preta) ou contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida (curva vermelha). Pressão de superfície de 30 mN/m
Figura 48 -	[A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 1500 e 1600 cm ⁻¹ para um filme de Langmuir de colesterol sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção da banda em 1527-1530 cm ⁻¹ (NH ₃ ⁺) com a pressão do filme
Figura 49 -	[A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 2800 e 3000 cm ⁻¹ para um filme de Langmuir misto de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 puro. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção da banda em 2917-2920 cm ⁻¹ (v_{ass} (CH ₂)) com a pressão do filme
Figura 50 -	[A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 1200 e 1240 cm ⁻¹ para um filme de Langmuir misto de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 puro. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção da banda em 1221-1223 cm ⁻¹ (v_{ass} (P=O)) com a pressão do filme
Figura 51 -	Espectro de PM-IRRAS na região entre 2800 e 3000 cm ⁻¹ para um filme de Langmuir de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 puro (curva preta) ou contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida (curva vermelha). Pressão de superfície de 30 mN/m
Figura 52 -	Espectro de PM-IRRAS na região entre 1200 e 1240 cm ⁻¹ para um filme de Langmuir misto de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. Ambos os espectros foram medidos na pressão de 30 mN/m e tiveram sua intensidade normalizada 120

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Elasticidade superficial dilatacional para filmes de Langmuir de DPPC formados sobre tampão TS puro e sobre tampão TS contendo 0,075 mg/mL de quitosana dissolvida. Obs: i) os dados para o filme contendo quitosana foram medidos após a estabilização da adsorção do polímero. ii) a parte imaginária da elasticidade para os filmes de fosfolipídio puro são praticamente nulas e por isso foram omitidas
Tabela 2 -	Elasticidade superficial dilatacional para filmes de Langmuir de DPPG formados sobre tampão TS puro e sobre tampão TS contendo 0,075 mg/mL de quitosana dissolvida
Tabela 3 -	Taxas de transferência (TR) e massa depositada para os filmes LB de uma camada dos diferentes sistemas estudados
Tabela 4 -	Elasticidade superficial dinâmica e viscoelasticidade obtida pelo método da gota pendente para monocamadas de DMPA e monocamadas mistas DMPA-quitosana
Tabela 5 -	Rugosidade (RMS - rugosidade média quadrática) e espessura de filmes LB de DMPA e DMPA+quitosana depositados sobre mica. Os valores foram calculados para imagens com 1, 5 ou 10 μ m ² 90
Tabela 6 -	Valor de máximo das bandas presentes nos espectros de PM-IRRAS (cm ⁻¹) de filmes de Langmuir por DMPA, colesterol (col) e quitosana (qui)
Tabela 7 -	Medidas de nanogravimetria em QCM para monocamadas contendo DMPA, colesterol e quitosana (em diversas combinações) transferidas da interface ar-água para suportes sólidos na pressão de superfície de 40 mN/m

2 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. 27 2.1 Quitosana: estrutura química e aplicações biológicas. 27 2.2 Membranas Celulares: composição, estrutura e funções. 31 2.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). 35 2.3.1 Formação e caracterização de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). 35 2.3.2 Modelos de mebranas celulares. 38 2.3.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de quitosana e derivados 39 2.4 Conceitos de física e química relevantes aos estudos da tese. 44 3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 51 3.1 Reagentes 51 3.2 Filmes de Langmuir 52 3.3 Filmes de langmuir 53 3.4 Princípios e condições experimentais das técnicos de caracterização 53 3.4.1 Isotermas de potencial de superfície 53 3.4.2 Isotermas de potencial de superfície 53 3.4.3 Elasticidade Superfícial Estática e Dinâmica 57 3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PMI-IRAS) 59 3.4.5 </th <th>1</th> <th></th> <th>OBJETIVOS</th> <th>25</th>	1		OBJETIVOS	25
2.1 Quitosana: estrutura química e aplicações biológicas	2		INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.2 Membranas Celulares: composição, estrutura e funções		2.1	Quitosana: estrutura química e aplicações biológicas	27
2.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) .35 2.3.1 Formação e caracterização de filmes de Langmuir e Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) .35 2.3.2 Modelos de membranas celulares. .38 2.3.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de quitosana e derivados. .39 2.4 Conceitos de física e química relevantes aos estudos da tese. .44 3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .51 3.1 Reagentes .51 3.2 Filmes de Langmuir. .52 3.3 Filmes de Langmuir. .52 3.4 Principios e condições experimentais das técnicas de caracterização .53 3.4.1 Isotermas de potencial de superfície .53 3.4.2 Isotermas de potencial de superfície .53 3.4.3 Elseticidade Superfícial Estática e Dinâmica .57 3.4.4 Espectroscopia a de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) .59 3.4.5 Espectroscopia da força atômica (AFM) .61 3.4.6 Microscopia de força atômica de cristal de quarto (QCM) .62 3.4.8 Espectroscopia a com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DP		2.2	Membranas Celulares: composição, estrutura e funções	31
2.3.1 Formação e caracterização de filmes de Langmuir e Langmuir Blodgett (LB) 35 2.3.2 Modelos de membranas celulares. 38 2.3.3 Filmes de Langmuir e Langmuir Blodgett (LB) de quitosana e derivados 39 2.4 Conceitos de física e química relevantes aos estudos da tese		2.3	Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)	35
2.3.1 Filmes de Langmuir e Langmuir Blodgett (LB) de quitosana e derivados		2.3.1	Formação e caracterização de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)	35 29
2.4 Conceitos de física e química relevantes aos estudos da tese		2.3.2	Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de quitosana e derivados	39
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 51 3.1 Reagentes 51 3.2 Filmes de Langmuir 52 3.3 Filmes Langmuir-Blodgett (LB) 53 3.4 Principios e condições experimentais das técnicas de caracterização 53 3.4.1 Isotermas de pressão de superfície 53 3.4.1 Isotermas de potencial de superfície 53 3.4.2 Isotermas de potencial Estática e Dinâmica 57 3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica 57 3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRAS) 59 3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 61 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 81 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol		2.4	Conceitos de física e química relevantes aos estudos da tese	44
3.1 Reagentes	3		PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	51
3.2 Filmes de Langmuir. 52 3.3 Filmes Langmuir-Blodgett (LB) 53 3.4 Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização 53 3.4.1 Isotermas de pressão de superfície 53 3.4.2 Isotermas de potencial de superfície 53 3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica 57 3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS). 59 3.4.5 Espectroscopia an região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 61 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 81 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA. 99 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA. 99 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMP		3.1	Reagentes	51
3.3 Filmes Langmuir-Blodgett (LB) 53 3.4 Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização 53 3.4.1 Isotermas de pressão de superfície 53 3.4.2 Isotermas de potencial de superfície 55 3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica 57 3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) 59 3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 61 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol 99 4.4.1 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana <td></td> <td>3.2</td> <td>Filmes de Langmuir</td> <td>52</td>		3.2	Filmes de Langmuir	52
3.4 Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização 53 3.4.1 Isotermas de pressão de superfície 53 3.4.2 Isotermas de potencial de superfície 55 3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica. 57 3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) 59 3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 61 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 81 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 93 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 99 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 99 4.4		3.3	Filmes Langmuir-Blodgett (LB)	53
3.4.1 Isotermas de pressão de superfície 53 3.4.2 Isotermas de potencial de superfície 55 3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica 57 3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) 59 3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 61 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 81 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 93 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol 99 4.4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol 99 4.4.2 Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana 106 </td <td></td> <td>3.4</td> <td>Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização</td> <td>53</td>		3.4	Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização	53
3.4.2 Isotermas de potencial de superficie 55 3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica		3.4.1	Isotermas de pressão de superfície	53
3.4.3 Elasticuade Superintal Estatuca e Dinamica		3.4.2	Isotermas de potencial de superficie	55
polarização (PM-IRRAS) 59 3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol 93 4.4 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol 93 4.4 94 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana. 99 4.4.1 91 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana. 92 4.4.2 93 131 94 PERSPECTIVAS 95 CONCLUSÕES 96 131 97 131 98 132 99 <td></td> <td>3.4.5 3.4.4</td> <td>Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação</td> <td>da</td>		3.4.5 3.4.4	Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação	da
3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 61 3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 81 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 81 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA 93 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA 99 4.4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA 99 4.4.2 Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana 106 5 CONCLUSÕES 131 137 6 PERSPECTIVAS 137 7 PERSPECTIVAS 139 4 PERSPECTIVAS 139 <t< td=""><td></td><td>polarização</td><td>o (PM-IRRAS)</td><td>59</td></t<>		polarização	o (PM-IRRAS)	59
3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM) 61 3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM) 62 3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA colesterol		3.4.5	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	61
3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM)		3.4.6	Microscopia de força atômica (AFM)	61
3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de frequencias (SFG) 63 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA- colesterol 99 4.4.1 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana		3.4.7	Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM)	62 62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65 4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG65 4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA 4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol 4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol 99 4.4.1 4.4.2 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana. 99 4.4.2 6 PERSPECTIVAS 131 6 PERSPECTIVAS 137 REFERÊNCIAS 137 APÊNDICE I - LISTA DE PUBLICAÇÕES 157		3.4.8	Espectroscopia de geração de soma de frequencias (SFG)	53
4.1Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG654.2Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA	4		RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.2Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA814.3Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol934.4Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA- colesterol994.4.1Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana994.4.2Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana1065CONCLUSÕES1316PERSPECTIVAS137REFERÊNCIAS139139APÊNDICE I - LISTA DE PUBLICAÇÕES157		4.1	Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG	65
4.3Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol934.4Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA- colesterol994.4.1Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana994.4.2Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana1065CONCLUSÕES1316PERSPECTIVAS137REFERÊNCIAS139139APÊNDICE I - LISTA DE PUBLICAÇÕES157		4.2	Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA	81
4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol 4.4.1 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana		4.3	Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol	93
4.4.1 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana		4.4 colesterol	Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMP	'A- 99
4.4.2 Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana		4.4.1	Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana	99
5 CONCLUSÕES		4.4.2	Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana1	06
6 PERSPECTIVAS	5		CONCLUSÕES 13	31
REFERÊNCIAS	6		PERSPECTIVAS	37
APÊNDICE I - LISTA DE PUBLICAÇÕES	R	EFERÊNCL	AS	39
	A	PÊNDICE I	- LISTA DE PUBLICAÇÕES	7

Apresentação

O trabalho de doutorado apresentado nesta tese foi realizado no período de março de 2006 a outubro de 2010 (55 meses). Praticamente todo o trabalho experimental foi feito nos laboratórios do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP - São Carlos, com exceção das medidas de elasticidade superficial dinâmica, que foram realizadas no laboratório de físico-química de superfícies e colóides da FFCLRP - USP, sob supervisão da professora Maria Elisabete Darbello Zaniquelli, e as medidas de PM-IRRAS, realizadas no laboratório de aplicação da empresa KSV Instruments em Helsinki, Finlândia. No período de janeiro a maio de 2009 o doutorando realizou estágio na Escola de Engenharia da Universidade de Valladolid, Espanha, estudando a modificação de eletrodos para elementos sensores com filmes Langmuir-Blodgett (LB) contendo a enzima Tirosinase.

A tese está dividida em 7 capítulos: no capítulo 1, são estabelecidos os objetivos do trabalho, e no capítulo 2 é feita uma introdução aos principais tópicos estudados e ao estado da arte em cada um deles. Pretende-se com essa introdução que os leitores tenham subsídio para analisar criticamente os resultados. No capítulo 3 são descritos os métodos e procedimentos adotados, enquanto os resultados são apresentados no capítulo 4, subdivididos em quatro grandes tópicos. No capítulo 5 as principais conclusões do estudo são revistas, e no capítulo 6 perspectivas de trabalhos futuros complementares aos da tese são listadas. O Apêndice 1 traz uma lista de publicações resultantes deste projeto e de outras publicações durante o período do doutorado, fruto de colaborações ou trabalhos paralelos.

1 OBJETIVOS

Nesta tese foi estudada a interação do polissacarídeo quitosana com modelos de membrana celular compostos por filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de lipídios. O objetivo foi entender as interações entre os materiais no nível molecular e obter conhecimentos que auxiliem na compreensão da ação da quitosana em algumas de suas aplicações biológicas. Os principais pontos que se pretendia estudar eram: i) a forma como a interação ocorre, ou seja, quais grupos químicos da quitosana e dos lipídios interagem, e quais ligações são estabelecidas entre eles; ii) qual o grau de penetração da quitosana, e em que região da membrana lipídica o polímero preferencialmente se insere, e; iii) quais os efeitos provocados na estruturação da membrana pelo polímero.

O interesse do estudo surge do enorme uso da quitosana em aplicações ligadas ao corpo humano, nas quais o polímero entra em contato com tecidos, e consequentemente com as membranas das células. O trabalho também pode contribuir para o entendimento do mecanismo de penetração do polissacarídeo em membranas celulares e da posterior desestruturação das membranas, que ocorre, por exemplo, quando o polímero é aplicado como agente bactericida.

2 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quitosana: estrutura química e aplicações biológicas

Quitina é o segundo polímero produzido em maior quantidade na natureza, atrás apenas da celulose. Sua produção anual na crosta terrestre, incluindo ecossistemas aquáticos, é estimada em 2,2 bilhões de toneladas. (1) O polímero é um polissacarídeo linear formado majoritariamente por unidades N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 4$. A quitina tem funções estruturais em artrópodes, sobretudo em crustáceos, sendo encontrada, por exemplo, na casca do camarão e na carapaça de caranguejos associada a materiais inorgânicos (principalmente carbonato de cálcio) e a proteínas, além de alguns corantes. (2-3) Por ser um polímero extremamente cristalino, e consequentemente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos ou aquosos, a quitina possui aplicação limitada.

A quitosana, um derivado da quitina, é encontrada na parece celular de alguns poucos fungos e pode ser extraída diretamente destes organismos. Entretanto, o método mais comum de sua obtenção consiste na desacetilação da quitina por hidrólise básica com solução de NaOH. Assim, a quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de D-glucosamina e de N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações β 1 \rightarrow 4. Os grupos amina da quitosana são protonados em pH menor que seu pKa, aproximadamente 6,5, que depende do grau de acetilação e da força iônica do meio. (4) Consequentemente, o polímero é solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos. O principal parâmetro que caracteriza uma amostra de quitosana é seu grau de acetilação (DA). A propósito, a diferenciação entre quitosana e quitina é normalmente feita pelo valor de DA, sendo uma amostra específica considerada quitosana quando tem DA menor que 0,5, e quitina se o DA for maior que 0,5. As estruturas químicas da quitina e quitosana (em sua forma protonada) são mostradas na figura 1.



Figura 1 - Estrutura química da Quitina e Quitosana. "n" indica o grau de polimerização, no caso da quitina, e o grau de acetilação (DA) no caso da quitosana. X⁻ representa o contra-íon proveniente do ácido usado para solubilização da quitosana.

As aplicações de quitosana na indústria e academia são muito diversas, desde cosméticos e alimentos até a complexação de metais e corantes, interação com surfactantes e polímeros, embalagens, entre outras. (2, 5-6) Outro ramo importante de pesquisa e aplicação refere-se ao uso do polímero como matriz sólida para imobilização de enzimas. Nesses casos objetiva-se a fabricação de nanoestruturas para dispositivos óticos, eletrônicos, e principalmente sensores de reconhecimento de biomoléculas. (7-11)

Dentre as aplicações de quitosana em biologia, podemos destacar seu uso em veículos para entrega controlada de droga, engenharia de tecidos, agentes de redução de adsorção de gordura e colesterol, e agentes bactericidas. Nessas aplicações o polímero é empregado em alguma etapa em contato com tecidos e células, humanas ou de bactérias. Esse contato íntimo se dá primeiramente com as membranas plasmáticas das células, ou mais especificamente, com moléculas em sua superfície. Nos próximos parágrafos, a forma de ação da quitosana em cada uma das aplicações biológicas é descrita em detalhe. Com isso, a importância do estudo da interação do polissacarídeo com membranas celulares será evidenciada.

Veículos para entrega controlada de drogas: O uso de quitosana como veículo para entrega controlada de drogas se baseia em três das principais propriedades do polímero: biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade. A quitosana é processada em várias formas como filmes, membranas, géis, nanopartículas, microesferas e fibras, e princípios ativos de fármacos são incorporados a essas estruturas. (12) A mucoadesão, que é a capacidade de o material aderir ao tecido de revestimento de cavidades internas do corpo humano, permite aplicabilidade dos fármacos em sítios bastante localizados, somente onde deve agir. Essa é uma propriedade que reflete a estabilidade da interação do material com tecidos e células, sendo bastante influenciada pela interação do material com o muco. No caso da quitosana, a mucoadesão é atribuída principalmente à forte interação com a proteína mucina, principal componente do muco, através de ligações eletrostáticas, mas também influenciada por ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. (13) As outras duas características, biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitem, respectivamente, que não ocorra rejeição por parte do corpo à matriz, e que após a ação do medicamento a mesma seja eliminada.

Um tipo bastante peculiar de entrega controlada de drogas é a transfecção, ou terapia gênica, que consiste na modificação genética de células através da administração de DNA ao núcleo das mesmas. Os vetores mais usados para a transfecção são vírus. Entretanto, nos últimos anos outros vetores vêm sendo usados, como nanoestruturas lipídicas, dendrímeros, polipeptídeos, nanopartículas e principalmente polímeros. (12, 14, 15) A primeira tarefa em estudos de transfecção com polímeros consiste na formação de um complexo entre a macromolécula e o DNA. O mecanismo pelo qual esse complexo age na transfecção passa pelas seguintes etapas: i) entrada na célula, que normalmente ocorre por endocitose; ii) liberação do complexo do endossomo, que postula-se ocorrer por troca do DNA complexado por lipídios negativamente carregados da membrana endossomal; iii) entrada do DNA no núcleo. (12) Há vários estudos de transfecção com complexos de quitosana e DNA na literatura, e a eficiência desses sistemas é em alguns casos comparável aos sistemas virais. (14-16) Como a primeira etapa do mecanismo de transfecção é a entrada do complexo quitosana-DNA na célula, o estudo da interação complexo-membrana e polímero-membrana é obviamente importante para esta aplicação.

Engenharia de tecidos: Este é o termo para denotar processos nos quais princípios científicos são usados para o design, construção, modificação, crescimento e manutenção de tecidos vivos. (17) Dentro deste tema se enquadram, por exemplo, tópicos como o desenvolvimento de membranas para revestimento de órgão, de pele artificial, e de curativos para feridas, nos quais um material é usado sempre com o objetivo de promover a regeneração de um tecido (em alguns casos para cicatrização). A quitosana, por suas características já citadas, é adequada para esse tipo de aplicação, (18, 19) por gerar a homeostase de plaquetas, e angiogênese de tecidos epiteliais, que é a vascularização do epitélio. Além disso, a unidade repetitiva da quitina, também presente na quitosana, N-acetil-D-glucosamina, é um dos principais componentes dos tecidos epiteliais. Por isso, a quitosana é eficiente para a confecção de peles artificiais, que promovem a cicatrização de feridas, e para a regeneração de cartilagem, nervos e ossos. (20-21)

Agentes de redução de adsorção de gordura e colesterol: O estudo da interação com constituintes de membranas plasmáticas também pode ser útil para compreender o mecanismo de ação da quitosana como agente de redução de adsorção de gorduras e colesterol pelo corpo

30

humano. Os efeitos da quitosana no combate a hipercolesteromia e hiperlipidemia, embora contestados por alguns autores, são relatados em testes clínicos realizados com animais e seres humanos. (12, 22-23) Existem três propostas para a ação da quitosana nessas aplicações. A primeira sugere a formação de géis de quitosana no estômago e intestino, os quais podem englobar lipídios, vitaminas e minerais, que deixam de ficar acessíveis às enzimas no processo de digestão. Uma segunda teoria afirma que a ação da quitosana se dá pela complexação de ácidos de biles, que são emulsificantes de gorduras e colesterol no trato gastrointestinal. Sem a disponibilidade desses ácidos os lipídios não são emulsificados e não podem ser processados pelas enzimas digestivas (essencialmente lipases). A última proposta de mecanismo está relacionada com uma possível interferência que a quitosana pode ter na atividade das lipases. Especula-se que o polímero pode impedir a ação das enzimas através da complexação com as mesmas, ou pode atuar como um substrato alternativo para a lipase, com a adsorção da quitosana passando a competir com a adsorção de gorduras e colesterol. Na literatura são encontrados experimentos *in vitro* e *in vivo* que exploram cada um desses três mecanismos. (12, 24-25) Como ficará evidente no item 2.3.2 da introdução, tanto a interação de quitosana com lipídios como triacilglicerídeos e colesterol, quanto o efeito da quitosana sobre a atividade de enzimas como lipases, podem ser avaliados usando filmes de Langmuir como modelos de membrana celular.

Agentes bactericidas: A última aplicação de quitosana relevante aos estudos da tese que será detalhada é o seu uso como agente bactericida (que mata bactérias) e bacteriostático (que impede o crescimento de bactérias). A eficiência do polímero nessas aplicações é comprovada por diversos estudos, (26-27) e sua aplicação em produtos para a indústria já é desenvolvida. (28) A concentração inibitória mínima da quitosana, que é a concentração mínima necessária de um material para inibir o crescimento visual de microorganismos após incubação por uma noite, chega a ser tão baixa quanto 20 ppm para S. Aureus, dependendo da amostra do polímero. (29) Somente para comparação, o valor de MIC para nanopartículas de prata de 10 nm, outro material reconhecidamente bactericida, é de 1800 ppm. (30)

Embora o efeito bactericida da quitosana seja comprovado, o mecanismo pelo qual ele ocorre ainda não foi estabelecido. Duas são as propostas mais aceitas: i) a quitosana penetra na célula e se liga ao DNA, causando disfunção da célula, impedindo a síntese de RNA e causando a morte da bactéria; (29) ii) a quitosana interage com sítios negativos na membrana das células da bactéria através de interações eletrostáticas, causando desestruturação da membrana e acarretando em mudança da permeabilidade da mesma. Uma terceira hipótese é a de que a quitosana complexa com metais e nutrientes essenciais para o crescimento das bactérias, mas essa alternativa é praticamente descartada por vários autores. (27, 31)

Na hipótese ii) acima, a mudança de permeabilidade da membrana da bactéria resulta em desequilíbrio osmótico e perda de eletrólito intracelular (potássio) ou de outras moléculas como proteínas, ácidos nucléicos e glicose. Observou-se por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) que nos pontos em que a quitosana se liga à célula, a membrana celular é separada da parede celular e é criado um vazio por onde começa a perda de material. (31) A atividade é maior para bactérias gram-negativas, porque essas possuem lipo-polissacarídeos contendo fosfato e pirosfato em sua superfície, o que favorece ligações eletrostáticas com a quitosana. (27) Embora alguns autores afirmem que a quitosana não perturba a estrutura da membrana e não consegue atravessar a parede celular, (31) outros demonstram também por TEM que a desestruturação da membrana ocorre, levando em última instância ao rompimento da mesma. (32-33) A interação com lipoproteínas e a remoção de lipídios das membranas celulares também é especulada, o que é uma grande motivação para o estudo da interação de quitosana com filmes de Langmuir lipídicos. (31)

2.2 Membranas Celulares: composição, estrutura e funções

As células são as unidades básicas dos seres vivos e podem ser classificadas em duas categorias: i) células procariotas, que não possuem membranas internas - características de seres unicelulares como bactérias e cianofitas (algas), e; ii) células eucariotas, que possuem membranas internas separando núcleo e organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático, entre outras - típicas de seres pluricelulares como os seres humanos. (34)

A membrana plasmática delimita o perímetro externo das células, sendo constituída basicamente por uma bicamada fluída de 7-10 nm de espessura com diversos tipos de moléculas anfifilicas, como lipídios, proteínas e alguns polissacarídeos. Suas principais funções são a de compartimentalizar a célula, regular o transporte de nutrientes para dentro e resíduos para fora da mesma, e controlar a resposta das células ao ambiente externo (sinalização transmembrana). Além disso, a possibilidade de a membrana fundir-se é fundamental na multiplicação das células (ex. vírus) e no transporte entre organelas. O controle do gradiente de solutos, pH e carga elétrica também são importantes em alguns processo celulares (ex. produção de ATP). (35-37) Em alguns tipos de células animais aparece

associado à membrana plasmática o glicocálice, que é uma cobertura externa da membrana composta por oligômeros de açúcares de glicolipídios ou glicoproteínas, o qual tem algumas dezenas de nanômetros de espessura e pode conter parte das proteínas integrais e algumas proteínas periféricas. Do lado interno da membrana é comum a formação do citoesqueleto, que é uma rede quase bidimensional de macromoléculas, principalmente proteínas como a actina. Essas duas estruturas também contribuem para funções celulares complexas e específicas. (38)

Os principais constituintes da membrana celular são os lipídios, moléculas de média ou baixa massa molar com longas cadeias hidrocarbônicas. Existem várias classes de lipídios como simples alcanos lineares, ácidos graxos, sabões, detergentes, esteróis, mono-, di- e triacilgliceróis (gorduras), fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e lipopolissacarídeos. Em células animais, o tipo de lipídio presente em maior quantidade são os fosfolipídios, seguido pelos esfingolipídios, que aparecem em quantidades consideráveis. (35-36) Os esteróis também estão presentes em quantidade significativa em membranas de células eucariotas, porém não aparecem em células procariotas. O colesterol é o mais abundante esterol e tem papel importante na estruturação e no controle da fluidez das membranas celulares. (39) As estruturas químicas básicas dos principais lipídios em membranas celulares são mostradas na figura 2.



Figura 2 - Estrutura química dos principais lipídios da membrana celular. Os radicais R₁, R₂ e R₃ representam as longas cadeias hidrofóbicas (caudas), onde n é normalmente maior que 13 e algumas insaturações podem aparecer. O grupo X representa as porções polares (cabeças) dos fosfolipídios e esfingolipídios, em que se liga o grupo fosfato.

Outro componente importante das membranas celulares são as proteínas, macromoléculas formadas pela união dos 20 diferentes aminoácidos em cadeias lineares e com distribuição aleatória. Para cada tipo de proteína existe a predominância de alguns aminoácidos na estrutura. Algumas funções que a membrana celular desempenha, como fenômenos de adesão e sinalização celular, são determinadas pelo conjunto de proteínas associadas a sua estrutura.

A quantidade relativa de lipídios e proteínas na membrana varia muito com o tipo de célula. Nas células animais em geral, os componentes que aparecem em maior quantidade são os lipídios, de 30 a 80%; sendo a porcentagem de proteínas de 20 a 60% e de polissacarídeos de 0 a 10%. (35, 36) Essas proporções variam consideravelmente para outras membranas. Por exemplo, a razão proteína:lipídio, que é de 0,25 para a membrana mielina de neurônios, sobe para 3,6 para as membranas da mitocôndria dessas mesmas células.

O modo como esses materiais, especialmente os fosfolipídios, se organizam para formar a membrana celular é peculiar e depende da interação dos mesmos com a água, que constitui o meio extra e intracelular. Os fosfolipídios, por terem uma porção hidrofóbica bastante grande, se organizam em bicamadas de modo que a cadeia alquílica de uma molécula fíque em contato somente com a cadeia alquílica de outra molécula. Como conseqüência, as regiões polares (PC, PG, PE e etc) se dispõem voltadas para a água. Essa estrutura de bicamada se torna ainda mais estável quando se formam arranjos fechados como a membrana celular. (40) De maneira surpreendente, a estrutura da membrana se sustenta sem ligações covalentes entre seus constituintes, o que é possível devido ao efeito hidrofóbico, detalhado na seção 2.4. Além das membranas, outras estruturas lipídicas estáveis podem ser formadas em solução aquosa decorrente do mesmo efeito, como lipossomos, vesículas, micelas e monocamadas. (41)

As proteínas são inseridas na bicamada de fosfolipídio de duas formas, e podem ser classificadas por isso. As proteínas integrais, ou transmembrana, são as que possuem domínios hidrofóbicos, com seqüências de no mínimo 20 aminoácidos hidrofóbicos, e que se inserem de maneira estável na porção apolar da bicamada. Essas proteínas atravessam as membranas e podem ter porções de ambos os lados da mesma. O outro tipo de proteínas, as periféricas, são aquelas que têm baixo caráter hidrofóbico e por isso se localizam nas superfícies da bicamada fosfolipídica. Uma ilustração da membrana celular, formada pela estrutura de bicamada fosfolipídica contendo proteínas e outros componentes como os esteróis distribuídos da maneira como foi descrito acima, é dada na figura 3.



Figura 3 - Desenho esquemático de uma membrana plasmática composta por uma matriz de bicamada lipídica na qual estão inseridas proteínas transmembrana e proteínas periféricas. Figura retirada do website http://medicinahumana.net/blog/?p=7.

Tanto lipídios como proteínas se distribuem em ambos os planos da membrana de maneira aleatória e possuem grande mobilidade de difusão lateral. Algumas proteínas em
especial têm funções bastante específicas como a formação de canais de difusão de íons. Diferentes fosfolipídios podem se distribuir preferencialmente em um dos planos, como é o caso de derivados de PC e esfingomielina, que aparecem em maior quantidade na folha externa da membrana, ou derivados de PE, PS e PI, que ocorrem em maior quantidade na folha interna. (34) Os lipídios podem, em uma escala de tempo de horas, realizar movimentos chamados de flip-flop, que é a passagem da molécula de um plano a outro da membrana, e esse movimento muito provavelmente é catalisado por proteínas chamadas de *flipases*. Domínios nanométricos (menores que 200 nm) com grande concentração de esfingolipídios e colesterol, conhecidos como RAFTS, que compartimentalizam alguns processos celulares, têm sido estudados por diversos autores. (42) Em vista de todas essas características da organização de lipídios e proteínas em uma bicamada de poucos nanômetros de espessura, o modelo mostrado na figura 3 (e a própria membrana plasmática de células) é descrita como um mosaico fluído. (43-45)

2.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

2.3.1 Formação e caracterização de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

Filmes de Langmuir (L) são formados na interface ar-água, ou de uma forma mais geral, na interface gás-líquido. São normalmente constituídos por moléculas anfifilicas, que têm regiões polares e apolares bem definidas, e insolúveis. Filmes Langmuir-Blodgett (LB) são obtidos pela transferência de filmes de Langmuir da superfície da água para substratos sólidos, o que é conseguido pela imersão e emersão sucessiva deste último através da interface. Quando formados por anfifilicos ideais, os filmes de Langmuir podem constituir uma monocamada, nas quais as moléculas se organizam com sua parte polar voltada para a água e sua porção apolar voltada para o ar. Filmes Langmuir-Blodgett (LB) desses materiais podem ser construídos com controle muito grande da organização e estruturação molecular, bem como da espessura. Na figura 4 são mostradas estruturas idealizadas de filmes de Langmuir e LB.



Figura 4 - Ilustração da estruturação de moléculas anfifilicas em filmes de Langmuir. Deposição e tipos de filmes Langmuir-Blodgett (LB).

Os filmes de Langmuir foram muito estudados nas primeiras décadas do século 20 pelo americano Irving Langmuir, que descreveu em detalhe sua estrutura em nível molecular, recebendo inclusive o prêmio Nobel em 1932 pelos trabalhos na área de química de superfícies. (46) Os filmes LB foram desenvolvidos por Katharine Blodgett em conjunto com Langmuir nos laboratórios da *General Electric Co.* nos Estados Unidos. (47, 48) Ambos os filmes recebem esses nomes em homenagem aos cientistas. É importante salientar, entretanto, que relatos de filmes interfaciais são descritos há muito mais tempo, sendo usados desde a pré-história para previsão do futuro (povos babilônicos) ou para "acalmar" a superfície da água (Benjamin Franklin). (49, 50) Uma menção especial deve ser feita aos estudos da jovem alemã Agnes Pockels, que cerca de 30 anos antes de Langmuir e Blodgett estudou filmes interfaciais na cozinha de sua casa, desenvolvendo protótipos bastante precisos do que hoje são as cubas de Langmuir. (51, 52)

Para a formação de monocamadas de Langmuir, um pequeno volume de uma solução diluída do composto em solvente volátil e imiscível com água (normalmente clorofórmio) é espalhado sobre a superfície da água contida em um recipiente (cuba de Langmuir) confeccionado de material inerte, geralmente Teflon. Os acessórios básicos de uma cuba de Langmuir são barreiras móveis, sensor de pressão de superfície e dispositivo imersor (dipper). As barreiras permitem que a área ocupada pelo filme seja variada, e o dipper possibilita que o substrato seja imerso ou emerso através da monocamada para a deposição dos filmes LB. O sensor de pressão mede a pressão de superfície (π), normalmente pelo método de Wilhelmy. (a definição de π e os princípios do método de Wilhelmy são dados nas seções 2.4 e 3.4.1., respectivamente). Curvas de pressão *versus* área (π xA) são obtidas com a diminuição da área ocupada pelo filme e dependem da ausência de contaminantes na interface e da temperatura,

sendo por isso chamadas isotermas. Para muitas moléculas anfifilicas como ácidos graxos e fosfolipídios, diferentes regiões da isoterma de pressão de superfície podem ser associadas a diferentes estágios de compactação do filme. Um exemplo é dado na figura 5 para o fosfolipídio dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC).



Figura 5 - Isoterma de π -A para o fosfolipídio DPPC, e ilustração da estruturação das moléculas no filme durante os diferentes estágios de compressão: LE = líquido-expandido e LC = líquido condensado.

Inicialmente as moléculas estão na interface totalmente dispersas, não interagindo entre si (fase gasosa). Durante a compressão, quando as moléculas começam a interagir, atinge-se a fase líquida. Conforme a densidade de moléculas aumenta há a formação de arranjos regulares no filme, resultando em uma estrutura compacta na fase sólida. Para filmes de fosfolipídios como o DPPC muitas vezes a fase sólida não é atingida, e o que ocorre é que a fase líquida é dividida em duas: fases líquido-expandida (LE) e líquido-condensada (LC), indicadas na figura. Outra característica comum das isotermas desses lipídios é a existência, dependendo da temperatura, de uma região de coexistência das fases LE e LC, na qual ocorre uma transição de primeira ordem (sem aumento de pressão) da primeira fase na segunda. Pode-se estudar interações moleculares e estado de agregação dos materiais através da análise das curvas de pressão. Inclusive, a área ocupada por uma molécula (a_{ex}) pode ser estimada pelo gráfico.

Outras caracterizações que podem ser aplicadas aos filmes de Langmuir são as medidas de potencial de superfície (ΔVxA), medidas de reologia superfícial, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IRRAS e RAMAN) e do ultravioleta-visível, microscopia no ângulo de Brewster e de fluorescência, difração de raios X, espalhamento de

raios X e de nêutrons e espectroscopia de geração de soma de freqüência. (53) Algumas delas também são mais detalhadas na seção 3.4. Os filmes LB, por serem suportados e mais espessos, podem ser caracterizados por um número maior de técnicas. Além das técnicas citadas para os filmes de Langmuir, exceto as de reologia, filmes LB podem ser caracterizados também por nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo, microscopia eletrônica de varredura, transmissão e tunelamento, microscopia de força atômica, ressonância plasmônica de superfície, entre outras. (53)

2.3.2 Modelos de membranas celulares

Experimentos com culturas de células são úteis para avaliar efeitos de materiais ou moléculas externas que interagem com tecidos, como a difusão de material do meio extracelular para o intracelular, alterações no formato das células, aglutinação, entre outros. Entretanto, ainda não existem técnicas experimentais disponíveis para a caracterização química estrutural e investigação de interações no nível molecular nesses sistemas. (54) Nesse contexto, pesquisadores de diversas áreas têm recorrido cada vez mais a modelos, especialmente de membrana celular. A formação de lipossomos, vesículas unilamelares de diversos tamanhos (pequenas, grandes e gigantes), e a obtenção de filmes negros de lipídios (bicamadas lipídicas aderidas a dois eletrodos espaçados de Teflon) são alguns dos modelos usados. (35, 36) Nesses sistemas são utilizadas bicamadas e é possível estudar mecanismos de interação de moléculas como drogas, polímeros, peptídeos e proteínas com a superfície dos filmes, bem como simular fenômenos de transporte de material através da membrana, e carreamento de moléculas em estruturas como os lipossomos. (55, 56)

A produção de lipossomos contendo quitosana já é descrita há pelo menos 15 anos. (57) Em trabalhos mais recentes, vesículas unilamelares e multilamelares de fosfolipídios contendo quitosana também têm sido estudadas, especialmente pelos grupos das professoras Nádya P. da Silveira, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil, e da professora Brigitte Pépin-Donat, na Universidade José Fourier - França. (58-65) Nesses trabalhos os autores não exploram as estruturas como modelos de membrana celular, mas basicamente descrevem os procedimentos para a formação das vesículas mistas, e mostram como a presença do polímero afeta o formato, o tamanho, a adesão e a carga superficial das estruturas de lipídios. Apenas em alguns deles os autores fazem proposições sobre as forças e os sítios de interação entre a quitosana e as moléculas de fosfolipídios, (62, 63, 65) porém, sem discussão de possíveis mecanismos de penetração do polímero na membrana ou modulação de propriedades das mesmas.

Alternativamente aos sistemas compostos por bicamadas, as monocamadas de Langmuir e os filmes LB são importantes modelos de membrana celular. (66, 67) Os filmes de Langmuir, em especial, não mimetizam a membrana como um todo, mas modelam apenas metade dela. Esse tipo de sistema possui algumas vantagens como: i) permitir o controle rigoroso da composição das membranas; ii) controle do estado de compactação e, conseqüentemente, da estruturação da monocamada, e; iii) planaridade, que se aproxima melhor ao formato de uma superfície celular, ao contrário da superfície de lipossomos, por exemplo, que tem grande curvatura.

O fato de o filme de Langmuir ser monomolecular também traz algumas desvantagens como a inviabilidade de estudos de transporte através da membrana e de carreamento de moléculas. Entretanto, a similaridade entre os dois tipos de sistemas, monocamadas e bicamadas, bem como a correspondência da estruturação de ambos com uma membrana celular real é comprovada por alguns autores. (68-70) Assim, diversos grupos de pesquisa utilizam filmes de Langmuir para estudar a interação de biomembranas com biomoléculas, tais como peptídeos, (71) enzimas (72) e polieletrólitos. (67, 73) Os estudos com filmes de Langmuir de quitosana são escassos, sendo focados em derivados do polímero. Esses trabalhos são citados e descritos na próxima seção.

2.3.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de quitosana e derivados

Como a quitosana é um polissacarídeo solúvel somente em soluções aquosas de ácidos, e não em solventes orgânicos voláteis e imiscíveis em água, seu processamento em filmes de Langmuir não é possível. Por esse motivo, somente estudos de filmes de derivados de quitosana são encontrados na literatura. O primeiro trabalho nessa área tratou da síntese de quitosanas substituídas na hidroxila secundária e no grupo amina com cadeias alquílicas de 15 carbonos. (74) Especial atenção foi dada à síntese dos derivados, e filmes de Langmuir estáveis e filmes LB de até 20 camadas foram produzidos. Provavelmente por algum problema experimental as isotermas mostradas atingem valores maiores que os teoricamente

40

possíveis. Para os filmes LB, uma distância entre camadas de 2 nm foi medida, o que está de acordo com o esperado para uma monocamada.

Há na literatura uma série de quatro artigos do chinês Mingchun Li descrevendo a síntese de derivados de quitosana N,N-dissubstituídos com cadeias alquílicas variando de 3 a 12 carbonos. (75-78) A solubilidade dos derivados em clorofórmio é atribuída pelos autores à menor cristalinidade e reduzida ocorrência de ligações de hidrogênio intra-cadeia. Nos dois primeiros trabalhos, publicados em 2002, (75, 76) foram produzidos pentâmeros de quitosana substituídos com cadeias de 12 carbonos. Estes apresentaram isotermas πxA com área extrapolada em torno de 50-60 Å² por molécula, o que equivale a aproximadamente o tamanho do anel de glucosamina da cadeia principal. Filmes LB de até 60 camadas foram produzidos e a espessura de cada camada de 1.74 nm foi determinada por difração de raios X. Nos outros trabalhos os autores estenderam seus estudos a quitosanas com massas molares entre 3 e 10 kDa e substituídas com cadeias de 8, 10 ou 12 carbonos. (77, 78) As isotermas πxA para esses derivados mostraram aproximadamente o mesmo perfil que a isoterma dos pentâmeros. É importante ressaltar que em seu último trabalho, publicado em 2007, os autores mencionam o uso de filmes de Langmuir como modelo de membrana e estudam a preparação de vesículas dos derivados para uso em liberação controlada de drogas. Foi mostrado que a velocidade da liberação de vitamina B₁₂ a partir das vesículas é menor para estruturas formadas por derivados cujas monocamadas de Langmuir tiveram maior módulo de compressibilidade. Essa correspondência entre monocamadas e vesículas é válida para todos os derivados, constituindo um bom exemplo do uso de filmes de Langmuir como modelo de membrana.

Yuejin Tong e colaboradores também trabalharam com quitosanas substituídas com cadeias alquílicas de 15 carbonos, porém inseridas somente nas hidroxilas. (79) Esses derivados formam filmes não-monomoleculares, cuja isoterma πxA depende do volume de solução espalhada. Filmes mistos com colesterol foram estudados e mostraram pressão de colapso bem definidas, entretanto, com miscibilidade não ideal dos dois compostos para qualquer proporção. Filmes LB puros do derivado de quitosana puderam ser transferidos para substratos de ouro e a uniformidade dos mesmos foi determinada por medidas de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). A partir de experimentos com géis do polímero os autores concluíram que a quitosana alquilada possui boa afinidade com colesterol devido a interações hidrofóbicas.

Yusong Wu e colaboradores descrevem a síntese de um derivado anfifilico de quitosana contendo um grupo cromóforo cinnamoil ligado ao grupo amina da cadeia

principal. (80) O derivado apresentou isoterma πxA com pressão de colapso de 25 mN/m e área extrapolada de 100 Å²/molécula. Essa área, duas vezes a prevista para o anel de glucosamina, foi atribuída ao grupo cromóforo volumoso que possivelmente impediu estericamente a compactação do filme. Filmes LB do tipo XY (com deposição total na subida e parcial na descida do substrato) foram obtidos na pressão de 10 mN/m, e apresentaram como principal característica a manutenção da quiralidade original da cadeia de quitosana, e uma orientação uniaxial das mesmas.

Uma estratégia alternativa para a formação de filmes interfaciais de materiais solúveis em água é a adsorção dos mesmos a partir da subfase. Nesse caso são formados filmes interfaciais chamados de monocamadas de Gibbs, os quais têm estrutura bastante semelhante à de filmes de Langmuir. Essa prática, muito usada para proteínas e peptídeos, (72, 81) requer que o material em questão tenha atividade superficial intrínseca, ou seja, se comporte como um tensoativo.

A atividade superficial da quitosana tem gerado controvérsias na literatura. Os primeiros trabalhos sobre o assunto estabelecem que o polímero não tem atividade superficial intrínseca, como esperado para polieletrólitos em solução. (82, 83) Entretanto, nos trabalhos de Gargallo e colaboradores (84) e Qun e colaboradores (85) são mostrados resultados em que a quitosana age como tensoativo. No trabalho de Gargallo e colaboradores (84) foram medidas diminuições de tensão superficial de até 15 mN/m a 45°C para soluções aquosas de ácido acético 0,3M (para uma concentração máxima de quitosana de 5 mg/mL - concentração de saturação). Os autores comprovam através de cálculos teóricos que essa adsorção da quitosana à interface é termodinamicamente favorável. No trabalho de Qun e colaboradores (85) mostrou-se que a quitosana na concentração de até 4 mg/mL não tem efeito sobre a tensão de superfície de soluções 0,1M de ácido acético. Contudo, acima dessa concentração um aumento do valor de γ é notado.

Dois trabalhos mais recentes afirmam que a quitosana em regime diluído de concentrações (c < 0.5 mg/mL) tem atividade superficial muito pequena ou nula. (86, 87)

Com base nesse conjunto de informações da literatura, e nas experiências obtidas ao longo deste estudo de doutorado, conclui-se que a quitosana é um polímero não tensoativo quando usada em soluções diluídas, com concentrações menores que 1 mg/mL. A atividade superficial intrínseca assumida por alguns autores provavelmente é decorrente de efeitos como a alta massa molar do polímero, que causa diminuição de solubilidade, ou o aumento demasiado da viscosidade das soluções quando o polímero é usado em concentrações acima de 1 mg/mL.

A adsorção da quitosana sobre filmes de Langmuir pré-formados também é tema de alguns poucos estudos. No já citado trabalho de Gargallo e colaboradores, filmes de um copolímero alternado de anidrido malêico e estearil metacrilato foram empregados. (84) Apenas outros quatro trabalhos, um de nosso grupo e outros três de grupos de Cingapura, México e Polônia, usaram filmes de Langmuir de moléculas biológicas e exploraram a interação com quitosana, em estudos semelhantes ao desta tese de doutorado. (88-91) No trabalho de Fang e colaboradores, a quitosana dissolvida na subfase de filmes de Langmuir dos fosfolipídios DPPC e DPPG provocou condensação das monocamadas. (89) Entretanto, nesse estudo a concentração do polímero é muito baixa (0,008-0,024 mg/mL) e pouca discussão é dirigida à explicação desse comportamento.

Em um primeiro estudo com filmes de Langmuir de colesterol, nosso grupo utilizou uma amostra de quitosana com Mn = 108,7 kDa e DA = 15% em diferentes concentrações entre 0,05 e 0,30 mg/mL em uma subfase aquosa pH 3,5. (88) Observou-se através de medidas de π xA, Δ VxA e BAM que a quitosana provocou expansão dos filmes, a qual aumentou com a concentração até a saturação do efeito em 0,10 mg/mL. Os resultados foram interpretados com base em possíveis interações específicas entre os grupos da quitosana (– NH₃⁺ e –OH) e do colesterol (–OH), principalmente através de ligações de hidrogênio. A mesma hipótese foi considerada posteriormente por outros autores. (90)

Parra-Barraza e colaboradores usaram filmes de Langmuir de colesterol e ácido esteárico (SA) como modelos de membrana e estudaram a interação com quatro tipos diferentes de quitosana: HMW - alta massa molar (Mv = 267 kDa and DA = 16%); MMW média massa molar (Mv = 102 kDa and DA = 22%); ClChi - cloreto de quitosana (Mv = 3.5kDa and DA = 22%); HYPM - N,N-lauril-quitosana (Mv não informado, DS não informado e DA = 27%). (90) Para uma mesma concentração, 0,10 mg/mL, todas as quitosanas causaram expansão das monocamadas de colesterol e SA, sendo o efeito mais pronunciado para os filmes de colesterol, para os quais a quitosana HYPM causou um deslocamento de 15,9 $Å^2$ /molécula na área extrapolada. Mencione-se que a HYPM foi a única a induzir uma fase líquido-expandida nas isotermas de colesterol, mas todos os derivados tornaram os filmes mais compressíveis, o que foi estimado por cálculos do módulo de compressão Cs⁻¹. Com o aumento da concentração de MMW na subfase observou-se um aumento gradativo da expansão de filmes de colesterol, sem saturação do efeito até a maior concentração testada, de 0,30 mg/mL. Para filmes de SA a expansão independe da concentração de MMW na subfase. Os efeitos causados pela ClChi foram muito pequenos para ambos os filmes, o que foi atribuído à baixa massa molar e consequente alta solubilidade desse derivado.

Filmes LB foram depositados a partir de filmes de Langmuir de colesterol e SA formados sobre subfases contendo os diferentes tipos de quitosana e foram caracterizados por AFM. Diferentemente do trabalho de Fang e colaboradores, (89) a quitosana MMW pode ser depositada por *dip coating* sobre mica dando origem a um filme com rugosidade de 12,3 nm e agregados com 45,6 nm de altura. Quando depositada junto com os lipídios a quitosana também aparece como agregados, que tem sua altura dependente da massa molar do polímero. A distribuição desses agregados foi mais homogênea no filme LB de colesterol do que no filme LB de SA. Para este último, uma grande quantidade de agregados isolados pôde ser vista. A partir dessas observações os autores concluíram que a interação da quitosana com colesterol é mais efetiva do que com SA. Com a ajuda de cálculos teóricos, inferiu-se que a interação com colesterol ocorre principalmente através de ligações entre os grupos $-NH_3^+ e - OH$. No caso da interação da quitosana com a molécula de SA desprotonada supõe-se que ocorram ligações eletrostáticas entre os grupos $-NH_3^+ e -COO^-$.

A interação entre quitosana e monocamadas de Langmuir de colesterol também foi estudada por Wydro e colaboradores. (91) Os filmes foram expandidos na presença do polímero, o que ocorreu de maneira crescente com o aumento da concentração da quitosana em solução até a saturação em 0,10 mg/mL. É importante notar que, embora uma amostra com diferente massa molar (Mw = 330 kDa) e grau de acetilação (DA = 30%) tenha sido usada nesse trabalho, a mesma concentração de saturação descrita por Pavinatto e colaboradores foi medida. (88) Os autores mostraram que a elasticidade da monocamada, C_s^{-1} , foi continuamente reduzida com a adição de quitosana, porém nesse caso o efeito saturou para a concentração de 0,20 mg/mL. Isso demonstra que a penetração da quitosana na monocamada deve saturar na concentração de 0,10 mg/mL, mas a elasticidade da monocamada é modulada mesmo para concentrações maiores. O efeito da quitosana sobre filmes de Langmuir de ácido esteárico (SA) e ácidos graxos com mesmo tamanho de cadeia, mas com distintos graus de insaturação (ácido oléico, linoléico e α -linoléico), foi descrito no mesmo artigo. Esses filmes também foram expandidos pelo polímero, e a concentração de saturação foi de 0,05 mg/mL para SA e de 0,10 mg/mL para os outros ácidos graxos. Inesperadamente, o valor máximo de Cs⁻¹ diminuiu para SA, mas aumentou para os outros materiais. Baseado em seus resultados, os autores propuseram que a interação da quitosana com os materiais é iniciada pela adsorção do polímero induzida por interações eletrostáticas e de hidrogênio. Em um segundo momento, a quitosana penetraria na região apolar das membranas, estabelecendo interações hidrofóbicas com as cadeias alquílicas dos lipídios.

2.4 Conceitos de física e química relevantes aos estudos da tese

• Interações intermoleculares

Quando duas ou mais moléculas ou átomos, idênticos ou distintos, se aproximam e interagem, forças de caráter atrativo ou repulsivo surgem entre eles. O tipo da força depende da distância entre os elementos, sua orientação relativa e geometria. Fundamentalmente essas forças têm origem eletromagnética, ou seja, são geradas pelas cargas dos elétrons ou núcleos dos átomos ou moléculas. Um exemplo é a superposição (contato) de orbitais de valência atômicos totalmente preenchidos com elétrons, o que causa repulsão entre os átomos. Por outro lado, se esses átomos têm vacâncias ou excesso de elétrons nesses orbitais a interação é atrativa, o que dá origem a ligações covalentes.

Ocorrem outros tipos de interações quando a distância entre os elementos é um pouco maior, entre 0,3 e 0,5 nm, que são as chamadas interações de longo alcance (*long-range*). Essas interações e as forças geradas são conhecidas como interações físicas, ao contrário das ligações covalentes denominadas como interação química. As interações físicas são divididas em dois tipos principais: interações eletrostáticas e interações de van der Waals. Dentro do termo "interações de Van der Waals" estão compreendidas interações dipolares (entre dipolos permanentes), forças de indução (envolvendo dipolos induzidos), e forças de dispersão (envolvendo moléculas ou grupos apolares). (92-94) As interações físicas são detalhadas a seguir juntamente com outro dois tipos específicos de interação, que são as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas. Apenas uma descrição geral será feita com o intuito de auxiliar os leitores em discussões futuras ao longo da tese. Para uma visão mais detalhada, inclusive com formalismos matemáticos e discussão de exceções e casos especiais, recomenda-se a leitura das referências citadas. (92-94)

i) interações eletrostáticas: quando entidades com carga oposta se aproximam, ocorre atração entre elas conhecida como *interação de Coulomb*. Essa é a forma mais comum de *ligação eletrostática*, e ocorre quando um átomo ou grupo químico com excesso de um elétron (portanto, carregado negativamente) se aproxima de outro átomo ou grupo com carência de um elétron (consequentemente, com carga positiva). Esse tipo de ligação é comum em moléculas de sais como Na⁺Cl⁻ e Ca²⁺Cl₂²⁻, mas também ocorre, por exemplo, em moléculas de proteínas, onde os grupos NH₃⁺ (amina protonada) e COO⁻ (ácido carboxílico desprotonados) de aminoácidos podem interagir entre si. Embora esse tipo de interação seja

de alta energia e origine uma ligação química, usualmente ela é classificada como uma interação física devido a seu longo alcance. (94)

ii) interações de van der Waals: grupos químicos ou moléculas polares são entidades eletricamente neutras, mas que têm uma segregação eletrônica em uma região e uma ausência de elétrons em outro sítio gerada pela diferença de eletronegatividade entre os átomos. Nesses casos as moléculas e grupos não adquirem cargas elétricas; contudo, possuem uma distribuição de densidades eletrônicas diferente em determinadas porções, o que é usualmente descrito como cargas parciais. Para essas entidades, o momento de dipolo μ pode ser definido pelo módulo das cargas parciais de cada pólo (positiva, q+, e negativa, q-) multiplicada pela distância (l) entre elas, ou seja, $\mu = ql$ (a unidade de μ é o Debye (D)). Para grupos químicos ou moléculas com mais de dois átomos o momento de dipolo depende também de fatores geométricos, onde os dipolos de diferentes ligações químicas podem se somar ou se subtrair, dependendo do formato e da distribuição espacial dos mesmos.

Dois ou mais dipolos podem interagir atrativamente através de seus pólos de carga oposta. Esse tipo de interação também tem caráter eletrostático ou Coulômbico, porém, é mais comumente designada como interação polar. Embora ocorra preferencialmente entre moléculas com dipolos permanentes, como alcoóis, aminas desprotonadas e água, entre outras, ela também podem envolver moléculas apolares. Nesses casos, a aproximação de uma molécula com dipolo permanente causa uma repulsão ou atração na nuvem eletrônica da molécula apolar, dependendo do pólo orientado para o ponto de aproximação entre ambas. Esse dipolo induzido pode interagir eletrostaticamente com o dipolo permanente da primeira molécula, o que recebe o nome de *interações de dipolo induzido*. Numa situação semelhante, duas moléculas apolares (que não têm segregação eletrônica) podem interagir através da formação de dipolos induzidos de magnitude bastante pequena. Esse dipolo surge primeiramente em uma das moléculas por pequenas deslocalizações decorrentes de movimentações da nuvem eletrônica. A polarização, mesmo durando muito pouco tempo, é capaz de induzir um dipolo numa segunda molécula (ou átomo). Ambos os elementos passam a ser polares e interagem entre si. Esses tipos de interações são conhecidos como forças de dispersão de London e, embora sejam o único tipo de interação em compostos apolares como H₂ ou N₂, são contribuintes majoritários das interações globais de quase todos os tipos de moléculas. (92, 93)

Embora não se enquadre na classificação acima, a interação entre um íon e uma molécula polar ou apolar também é possível, e possui caráter intermediário entre uma interação de Coulomb e uma interação polar. Nesse caso a orientação relativa do dipolo ao

interagir depende fortemente da carga do íon. Um exemplo importante desse tipo de interação é a solvatação de íons em soluções aquosas.

iii) ligações de hidrogênio: Um tipo de interação importante para quase todas as moléculas biológicas e principalmente para a água são as *ligações de hidrogênio*. Participam dessas ligações moléculas que possuem átomos de hidrogênio ligados a átomos bastante eletronegativos como N, O ou F. Nessas moléculas os átomos eletronegativos retiram a densidade eletrônica do hidrogênio deixando seu núcleo positivo bastante exposto e formando uma ligação extremamente polar. Outras moléculas do mesmo composto ou de compostos diferentes, que também possuem átomos eletronegativos, especialmente com pares de elétrons desemparelhados, podem interagir com os hidrogênios das primeiras moléculas de forma atrativa. Esse tipo especial de ligação possui cerca de 80% de caráter eletrostático e 20% covalente, e é bastante direcional, onde os três átomos participantes se dispõem quase em linha reta. Ela é responsável por propriedades únicas da água como seu alto ponto de ebulição e alta tensão de superfície. Quando ocorre intramolecularmente, por exemplo, em proteínas e DNA, dá origem a estruturas supramoleculares de extrema relevância como hélices e fitas. (92, 93)

iv) interações hidrofóbicas: esse é o nome convencionalmente usado para a interação entre duas moléculas apolares, por exemplo, moléculas de alcanos ou ácidos graxos. (93) Embora fundamentalmente as interações entre esses tipos de moléculas ocorram via *forças de dispersão de London*, o termo *interações hidrofóbicas* é relevante quando as moléculas estão em um ambiente aquoso, pois a energia de interação neste caso é normalmente maior que aquela estimada para as mesmas moléculas interagindo no vácuo. Por exemplo, para duas moléculas de metano a energia de interação calculada teoricamente vale -2,5 x 10^{-21} J no vácuo e -14 x 10^{-21} J em água. Esta diferença é atribuída principalmente a efeitos entrópicos que se originam na desestruturação da rede de ligações de hidrogênio da água. (93) Dá-se o nome de *efeito hidrofóbico*, que será detalhado abaixo.

Os diferentes tipos de interação molecular mencionados possuem força, e consequentemente energia, diferentes. *Interações de Coulomb* são extremamente fortes, com energia de até 500 kJ/mol, o que é comparável a energia de ligações covalentes, que varia entre 150 e 900 kJ/mol. Interações entre dipolos e *forças de dispersão de London* são bem mais fracas, com energia em torno de 1 a 3 kJ/mol, e ligações entre moléculas polares e íons têm energia intermediária, em torno de 100 a 150 kJ/mol. Ligações de hidrogênio, por sua vez, têm energia da ordem de 10 a 40 kJ/mol. Os vários tipos de interações podem ocorrer ao mesmo tempo para um conjunto de moléculas, como na maioria dos sistemas utilizados neste

trabalho de doutorado. Em muitos casos mesmo as forças mais fracas desempenham papel importante, (92-94) como será discutido depois.

• Tensão de superfície.

Interfaces são regiões nas quais duas fases, de um mesmo composto ou de compostos distintos, se encontram. São caracterizadas pela mudança brusca de uma determinada propriedade (densidade, dureza, composição química, entre outras) à medida que se passa de uma fase a outra. Existem vários tipos de interface, como sólido-sólido, líquido-líquido, sólido-líquido, sólido-vapor e líquido-vapor, sendo as interfaces envolvendo a fase vapor comumente denominadas de superfícies. No nível molecular, por exemplo, para um líquido em contato com seu vapor, os átomos ou moléculas da superfície possuem uma assimetria de interações moleculares, o que não ocorre para as moléculas do volume. Essa situação, ilustrada na figura 6, confere um excesso de energia livre à superfície (ΔG_{sup}), que lhe é uma característica inerente.



Figura 6 - Ilustração das moléculas de um líquido (ex. água) e das interações atrativas entre elas (representadas por flechas). As flechas maiores indicam a tensão de superfície do líquido, resultado do desequilíbrio de forças na superfície/interface.

Como resultado do ΔG_{sup} , existe uma força resultante atrativa nas moléculas da superfície de um líquido, o que faz com que a mesma tenha uma tendência de contrair e diminuir sua área (consequentemente, diminuindo o excesso de energia). Essa força é conhecida como tensão de superfície e é definida termodinamicamente como a derivada da energia livre de Gibbs da superfície em relação à área superfícial (equação 1).

$$\gamma = (\delta G / \delta A)_{T,P,n} \tag{1}$$

A tensão de superfície tem unidade de mN/m, e para interfaces líquido-líquido ou sólido-líquido é conhecida pelo termo mais geral de tensão interfacial. No caso de interfaces

sólido-gás não faz sentido falar em tensão de superfície, pois não existe a tendência de a superfície se contrair como em um líquido. Portanto, para sólidos é mais comum tratar da energia de superfície, dada em mJ/m^2 .

A tensão de superfície da água, sem dúvida o líquido de maior importância, vale 71.99 mN/m a 25°C. (95) Esse valor é um dos mais altos encontrados, devido às fortes interações atrativas entre as moléculas de água, decorrentes do alto número de ligações de hidrogênio. Aliás, essa é uma característica geral dos valores de tensão de superfície de líquidos: são mais altos quanto maior for a força das interações intermoleculares entre as moléculas constituintes.

• Atividade superficial, tensoativos e pressão de superficie

Para sistemas envolvendo uma fase líquida (normalmente água), determinadas moléculas solubilizadas apresentam atividade superficial, ou seja, têm tendência natural de migrar e se acumular na interface. São conhecidas como tensoativos ou surfactantes (do inglês, *surface active agents*). A estrutura química de moléculas tensoativas geralmente é composta por duas regiões distintas, uma delas com um grupo liofílico (com afinidade pelo solvente) e outra com um grupo liofóbico (com pouca atração pelo solvente). Para sistemas aquosos, essas regiões recebem os nomes de hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente, e a molécula é dita anfifilica. Exemplos de grupos hidrofóbicos são cadeias alquílicas, fluorocarbônicas, siloxanos, entre outras; enquanto grupos hidrofílicos são grupos iônicos como sulfatos, carboxilatos, sais quaternários de amônia e etc, ou grupos altamente polares, como aminas, alcoóis, entre outros.

A tendência de moléculas anfifilicas em migrar para a interface da solução aquosa com a outra fase/meio (ar ou outro líquido imiscível) surge do ganho de energia do sistema, do ponto de vista entrópico, causada pela manutenção do grupo hidrofóbico no seio da solução. (94) Dependendo das características do surfactante, do tamanho da porção hidrofóbica e grau de afinidade pela água de sua parte hidrofílica (também conhecido como HLB - balanço hidrofílico lipofílico), esse pode se tornar insolúvel em água. Exemplos de surfactantes nãosolúveis são os fosfolipídios, formadores dos principais sistemas usados nesta tese.

Após adsorver na interface, a disposição mais favorável para as moléculas de surfactantes é aquela em que sua parte apolar fica voltada para a fase/meio imiscível com a água (ar ou outro líquido imiscível) e a porção hidrofílica fica imersa na água. Tal situação é ilustrada na figura 4 (página 36), onde o tensoativo é representado por uma estrutura de cauda (parte hidrofóbica) e cabeça (porção hidrofílica). A concentração na interface de tensoativos

solúveis depende de sua concentração em solução e de sua concentração micelar crítica (CMC), valor de concentração acima do qual as moléculas não migram mais para a interface, mas passam a formar estruturas auto-organizadas em solução, conhecidas como micelas. Para tensoativos insolúveis em água, e no caso de uma interface com o ar, todas as moléculas se localizam na superfície da água. Em ambas as situações, a presença dos surfactantes na interface causa uma compatibilização entre os meios, e consequentemente uma diminuição da tensão de superfície. Essa diminuição é o resultado da pressão de superfície, uma pressão em duas dimensões (análoga à tridimensional) exercidas pelas moléculas de surfactante entre si. Tanto a tensão de superfície quanto a pressão de superfície são determinadas convencionalmente pelo método de Wilhelmy, o qual será mais bem detalhado na seção 3.4.1.

• Efeito hidrofóbico e formação de membranas celulares

A água no estado líquido tem estrutura tridimensional dinâmica formada por uma rede de ligações de hidrogênio. A capacidade de um soluto em se acomodar nessa rede depende de sua capacidade em formar ligações de hidrogênio estáveis dentro da mesma. Moléculas como alcoóis de cadeia curta são exemplos de moléculas que podem se acomodar facilmente na rede, e por isso são solúveis. Para moléculas anfifilicas contendo grupos apolares, como longas cadeias alquílicas, a acomodação na rede de ligações de hidrogênio da água é bastante custosa em termos entrópicos. A rede deve ser deformada e a cadeia alquílica, composta essencialmente por grupos CH_2 e CH_3 que não participam de ligações de hidrogênio, deve ser acomodada. Essas são as bases do efeito hidrofóbico que, portanto, é relacionado diretamente com a área (ou tamanho da porção apolar) da molécula a ser dissolvida . (96)

O aumento de energia do sistema normalmente é contrabalanceado pela formação de agregados supramoleculares, nos quais as interações das regiões polares com a água são favorecidas ao mesmo tempo em que a interação das regiões apolares com o solvente é evitada. A formação de bicamadas de fosfolipídios é um bom exemplo das conseqüências desse efeito, e a estrutura de micelas de surfactantes, ou mesmo de membranas plasmáticas das células, são demonstração da importância de tais estruturas. A disposição de proteínas com grandes porções hidrofóbicas como proteínas transmembrana também constitui outro exemplo da importância do efeito hidrofóbico. (41, 94, 96)

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Reagentes

Os fosfolipídios, DPPC - dipalmitoil fosfatidil colina (1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPG - dipalmitoil fosfatidil glicerol (1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3fosfocolina-(1'-rac-glicerol) sal de sódio) e DMPA - ácido dimiristoilfosfatídico (1,2ditetradecanoil-sn-glicero-3-fosfato - sal de sódio), foram comprados da Avanti Polar Lipids. Todos tinham grau de pureza maior que 99%, e foram usados como recebidos. Colesterol (3- β -hidroxi-5-colesteno), obtido da Sigma-Aldrich com grau de pureza maior que 99% também foi usado sem purificação prévia. As estruturas químicas dos compostos são mostradas na figura 2 (página 33).

A quitosana usada nos estudos de interação com filmes puros de DPPC, DPPG e DMPA foi obtida da desacetilação da quitina extraída de uma amostra de casca de camarão cedida pela empresa Cyrbe do Brasil Indústria Química Ltda (Campinas). Os processos de desmineralização, desproteinização e desacetilação foram realizados, respectivamente, por tratamento em HCl 0,5 M (3 hs, agitação moderada, T = 25 °C), NaOH 1,0 M (24 hs, agitação moderada, T = 50 °C) e NaOH 12,5 M (2 hs, agitação moderada, T = 100 °C). O grau de acetilação (DA) de 15% foi determinado por H¹-RMN segundo o procedimento descrito por Signini et al.. (97) A massa molar do polímero (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) foram medidos por cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando Pullulan e Glucosamina como padrões, e mostraram valores de 108.700 g/mol e 6,2 respectivamente.

Para os estudos com filmes mistos de DMPA e colesterol outra amostra de quitosana com massa molar (M_n 113.000 g/mol e PDI = 4,2) e grau de acetilação (DA = 22%) próximos ao da quitosana da Cyrbe foi usada. Essa quitosana foi comprada da empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas). Ambas as amostras do polímero foram purificadas por dissolução em solução aquosa de ácido acético 1% v/v, filtragem em funil Buchner usando tecido tipo Tule como membrana de filtração, e precipitação em solução aquosa de NaOH 1,0 M. Após a precipitação, o produto foi lavado com água até pH neutro e depois com álcool isopropílico para posterior secagem em estufa a 45°C. Outros regentes, como os ácidos cítrico, bórico e fosfórico (grau PA), usados para preparação de tampão, e clorofórmio (grau HPLC), para dissolução dos lipídios foram obtidos da Sigma-Aldrich ou Malinckrodt.

3.2 Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) foram fabricados em cubas de Langmuir da empresa *KSV Instruments* (Finlândia) modelos minitrough (área superficial de 75 x 323 mm² e volume de 250 mL) e KSV5000 (área superficial de 150 x 530 mm² e volume de 1200 mL). As cubas estão alocadas em uma sala limpa classe 10.000 com temperatura controlada em 23±1°C, e são equipadas com prova de Wilhelmy para medir a pressão de superfície, e prova de Kelvin para medida do potencial de superfície.

Um procedimento típico para a obtenção dos filmes de Langmuir consiste do espalhamento na superfície da subfase aquosa de volumes entre 50 e 200 µL de soluções dos lipídios em clorofórmio com concentração entre 0,5 e 1,0 mg/mL. Após a evaporação do clorofórmio (cerca de 10 minutos) o material permanece distribuído na superfície da água. Nos experimentos com filmes mistos de DMPA e colesterol, as soluções de ambos os compostos foram misturadas previamente em um frasco de vidro, agitadas para homogeneização, e posteriormente espalhadas. Os volumes de cada solução foram escolhidos de modo a obter a razão molar desejada entre os compostos.

Na maioria das medidas a subfase utilizada foi tampão Theorell-Stenhagen pH 3 (NaOH, ácido cítrico, ácido bórico, ácido fosfórico - pH ajustado em 3 pela adição de HCl 2 M). Nos trabalhos com filmes de Langmuir puros de DMPA as monocamadas foram preparadas sobre uma subfase aquosa de HCl 1 mM, pH 3; e os filmes puros de colesterol foram formados sobre tampão acetato pH 3,5. A água ultrapura usada na preparação do tampão, com resistividade de 18,2 MΩ.cm e pH 6, foi fornecida por um purificador Milli-RO acoplado a outro purificador Milli-Q (*Millipore*). As amostras de quitosana foram incorporadas à subfase por diluição prévia (antes do enchimento da cuba) de uma solução 1,200 mg/mL do polímero no próprio tampão da subfase. Os volumes a serem diluídos foram escolhidos de modo a conseguir uma concentração final de quitosana na subfase entre 0,050 e 0,500 mg/mL. Os filmes de Langmuir foram comprimidos pelas barreiras móveis das cubas com a velocidade de 10 mm/min. Para experimentos realizados com parâmetros diferentes

desse procedimento padrão, as condições serão indicadas juntamente com a apresentação dos resultados.

3.3 Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

Filmes LB foram transferidos para substratos sólidos a partir de filmes de Langmuir formados sobre subfase contendo ou não quitosana. A concentração de quitosana na subfase e a pressão de deposição dos filmes variaram para alguns experimentos e serão indicadas com os resultados das medidas de caracterização. Outro parâmetro ajustado para otimização da razão de transferência dos filmes foi a velocidade do dipper (dispositivo imersor). Da mesma forma, as velocidades em cada experimento serão indicadas na apresentação dos resultados. Os substratos usados dependeram da caracterização a ser empregada e serão indicados a seguir.

3.4 Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização

Nesta seção serão descritas as condições experimentais e os equipamentos para caracterizar os filmes de Langmuir e LB. Além disso, uma breve descrição dos princípios e potencialidades de cada técnica será feita. Para um conhecimento mais aprofundado, aconselha-se consultar as referências citadas.

3.4.1 Isotermas de pressão de superfície

Como descrito na seção 2.4, a pressão de superfície (π) é o resultado das interações repulsivas entre as moléculas de um filme monomolecular na superfície da água. A pressão de superfície é definida como a diminuição da tensão de superfície da água, ou seja, $\pi = \gamma_0 - \gamma$, onde γ_0 é a tensão de superfície da água pura e γ é a tensão de superfície da água na presença do filme interfacial.

Nas cubas de Langmuir a tensão de superfície, e consequentemente π , é medida pelo método de Wilhelmy. Nesse método, uma eletrobalança mede a força exercida pelo filme (tensão de superfície) sobre um sensor, que pode ser uma placa de platina ou, mais comumente, um papel de filtro. O sensor é imerso parcialmente na subfase, atravessando o filme de Langmuir, como representado na figura 7. Três forças atuam sobre o sensor: seu peso (P) e a tensão de superfície (γ) puxando-o para baixo, e o empuxo (ξ), empurrando-o para cima. A força resultante medida pela balança pode então ser simplesmente descrita pela equação 2 ou, de maneira mais detalhada, pela equação 3. Nessas equações ρ = densidade, t = espessura, l = comprimento, w = largura, h = comprimento da parte da placa imersa na água, g = aceleração da gravidade, γ = tensão de superfície e θ = ângulo de contato entre a água e a placa. Os sub-índices "p" e "a" indicam que os parâmetros se referem, respectivamente, a placa ou a água.



Figura 7 - Ilustração de um sensor de papel de filtro imerso parcialmente na água, como no método de Wilhelmy.

$$F = P + \gamma - \xi$$
(2)

$$P = l_p w_p t_p \rho_p g$$

$$\gamma = 2(w_p t_p)(\cos\theta)\gamma_a$$

$$\xi = h_a w_a t_a \rho_a g$$

$$F = l_p w_p t_p \rho_p g + 2(w_p t_p)(\cos\theta)\gamma_a - h_a w_a t_a \rho_a g$$
(3)

Para uma placa em posição estacionária (peso e empuxo constantes), a pressão de superfície é obtida pela variação da força medida pela eletrobalança segundo a equação 4 (uma forma reduzida da equação 3):

$$\pi = -\Delta \gamma = -\Delta F/2(w_{\rm p}t_{\rm p})(\cos\theta) \tag{4}$$

Considerando que a água molha completamente a placa de papel de filtro, ou seja, $\theta = 0$ e cos $\theta = 1$, e que w é muito maior que t para uma placa de 1 cm de largura e aproximadamente 0,1 mm de espessura (espessura típica de papéis de filtros comerciais), a equação se reduz à forma da equação 5.

$$\pi = -\Delta \gamma = -\Delta F / 2w_p \tag{5}$$

A partir deste princípio de medida fica claro que alguns cuidados experimentais são importantes para obter resultados corretos. Dois exemplos são: i) necessidade de perfeita correspondência entre a largura do papel usado e aquela informada para o software da cuba, o qual é usado nos cálculos. ii) uso de papéis de filtro perfeitamente limpos, pois é necessário que a suposição da molhabilidade total seja verdadeira. Com base nas equações, nota-se que a sensibilidade da medida pode ser aumentada com o uso de papéis com maiores razões de largura em relação à espessura. Entretanto, a largura máxima do papel normalmente é limitada pela estabilidade do mesmo após ser umedecido, pois papéis muito largos podem se curvar, o que dá origem a erros. No caso dos experimentos desta tese, nos quais um papel com largura de 1 cm foi usado, a resolução da balança de pressão é de 4 μ N/m.

As medidas de pressão dependem da temperatura e por isso normalmente são feitas a temperatura constante, com as curvas sendo denominadas isotermas. Uma isoterma de pressão é uma curva da variação de π com a diminuição da área ocupada pelo filme (aumento da densidade de material). Um exemplo de isoterma π -A foi mostrado na figura 5.

3.4.2 Isotermas de potencial de superfície

O potencial de superfície aparece na superfície de líquidos e sólidos devido à assimetria eletrônica intrínseca da mesma, proveniente da polaridade dos átomos e moléculas. O potencial de superfície de um filme interfacial (filme de Langmuir) tem a mesma origem, e pode ser medido pela diferença de potencial entre a subfase sem filme (V_0) e o potencial da

subfase na presença do filme (V). Portanto, o potencial de superficie de um filme de Langmuir é determinado pela equação 6.

$$\Delta V = V - V_0 \tag{6}$$

A diferença de potencial, ΔV , surge devido à presença de cargas elétricas ou dipolos elétricos permanentes no material que compõe o filme, ou de fenômenos que ocorrem na camada de água adjacente a monocamada. Dessa forma, ΔV pode ser descrito pela equação de Helmholtz, (98) a qual foi decomposta por Demchak e Fort para descrever a contribuição das diferentes regiões do filme, (99) e posteriormente foi expandida por Oliveira Jr. e colaboradores (100) para incluir a contribuição da dupla camada elétrica, tomando a forma da equação 7. Nesta equação são descritas as contribuições ao potencial provenientes de diferentes regiões da interface: 1 - reorientação das moléculas de água da subfase induzida pela presença do filme; 2 - momento de dipolo associado à camada correspondente à região das cabeças polares das moléculas do filme; 3 - momento de dipolo associado às caudas hidrofóbicas das moléculas. A é a área ocupada por cada molécula, ε_0 é a permissividade do vácuo, Ψ o potencial da dupla camada elétrica (para filmes carregados eletricamente), μ_n o componente vertical do momento de dipolo de cada parte da molécula, e ε_n a constante dielétrica local para cada uma das três regiões da interface.

$$\Delta V = \frac{1}{A\varepsilon_0} \left[\frac{\mu_1}{\varepsilon_1} + \frac{\mu_2}{\varepsilon_2} + \frac{\mu_3}{\varepsilon_3} \right] + \psi \tag{7}$$

O potencial de superfície nas cubas de Langmuir usadas neste trabalho foi medido por uma prova de Kelvin, ou prova do capacitor vibrante. (101) Nessa técnica uma das placas de um capacitor vibra acima da superfície da água, e a outra placa é a própria superfície da água. Devido à variação de capacitância gerada pela vibração, uma corrente alternada surge em um circuito externo e pode ser medida por um detector de corrente e compensada por uma fonte variável conectada a um eletrodo de referência (aço inoxidável) imerso na subfase. Com a prova das cubas KSV foi possível medir potenciais com sensibilidade de 2 mV numa janela de -5 a 5 V. Assim como para a pressão de superfície, o sinal de potencial é medido continuamente ao longo da compressão da monocamada e para uma temperatura constante, portanto, as curvas são chamadas de isoterma de potencial de superfície.

3.4.3 Elasticidade Superficial Estática e Dinâmica

As propriedades mecânicas dos filmes de Langmuir podem ser avaliadas através de medidas de elasticidade realizadas nos regimes estático e dinâmico. No primeiro caso, o valor conhecido como elasticidade no plano é o módulo de compressão (C_s^{-1}), o qual é o inverso do fator de compressibilidade (C_s), calculado a partir das isotermas de pressão de superfície. As fórmulas de C_s e C_s^{-1} são dadas respectivamente nas equações 8 e 9, onde A representa a área por molécula e π a pressão de superfície. A unidade de C_s^{-1} é a mesma da pressão de superfície, mN/m.

$$C_{S} = -\frac{1}{A} \left(\frac{\delta A}{\delta \pi}\right)_{T} \tag{8}$$

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\delta \pi}{\delta A}\right)_T \tag{9}$$

Isotermas de C_s ou C_s^{-1} podem ser traçadas em função da área por molécula ou mesmo da pressão de superfície, e são especialmente úteis na determinação de regiões de transição de fase. (102) Por exemplo, transições de 1^a ordem, como nas isotermas de muitos fosfolipídios, aparecem como patamares com valores próximos a 0 mN/m nos gráficos de C_s^{-1} *versus* A e como picos nos gráficos de C_s *versus* A. Outro emprego dessas curvas é para determinar as próprias fases da isoterma de um composto. Existem tabelas com recomendações para denominar diferentes fases da isoterma (gasosa, líquido-expandida, líquido-condensada e sólida) de acordo com o valor máximo de C_s^{-1} . (103)

A elasticidade superficial de filmes interfaciais pode ser determinada em regime dinâmico através de experimentos de oscilação das barreiras da cuba, que se fecham e abrem em movimento oscilatório. Paralelamente a esse movimento, a oscilação do valor de pressão de superfície é monitorada, e uma resposta elástica ou viscoelástica pode ser inferida pela correspondência ou não de ambas as oscilações. Embora esse método produza resultados bastante reprodutíveis e confiáveis, a medida pode ser realizada apenas para baixos valores de freqüência e pequenas amplitudes de oscilação.

Um método alternativo para medir reologia superficial é o método da gota pendente, no qual o filme de Langmuir é formado na superfície de uma gota suspensa na ponta de uma microseringa. (104) O equipamento, um tensiômetro de gota, calcula a tensão de superfície através do formato da gota (filmada por uma câmera de vídeo) usando a equação de Young-Laplace (equação 10 - $R_1 e R_2$ são os raios da gota, que é ajustada por uma esfera/elipse; π é a pressão de superfície e γ é a tensão de superfície).

$$\Delta \pi = \left(\frac{\gamma}{R_1}\right) + \left(\frac{\gamma}{R_2}\right) \tag{10}$$

O tensiômetro possui acoplado à microseringa um oscilador piezoelétrico, que permite variar o tamanho da gota a uma freqüência de 0,01 a 20,00 Hz. O movimento oscilatório também é filmado e o software calcula o tamanho/área da gota e a tensão de superfície (através da equação 10). A elasticidade superfícial dinâmica (ϵ) é derivada pela equação 11, onde γ é a tensão superfícial e A é a área da superfície da gota. (105) Comparando o perfíl de oscilação da gota com o perfíl de variação da tensão de superfície pode-se determinar se ambos os movimentos (senoidais) estão em fase. Se houver atraso da resposta de tensão em relação à deformação imposta, a deformação do filme possui um componente viscoso. Caso contrário, a deformação do filme é perfeitamente elástica. Na equação 12 é mostrada essa decomposição da elasticidade dinâmica (ϵ) nos componentes real e imaginário, e sua dependência com o ângulo de fase ϕ . (104, 105)

$$\varepsilon = \frac{\delta \pi}{\delta lnA} \tag{11}$$

$$\varepsilon = |\varepsilon| \cos \phi + |\varepsilon| i \sin \phi \tag{12}$$

Todos os experimentos nesta tese foram realizados em equipamento modelo OCA-20 da Dataphysics, no laboratório de físico-química de superfícies e colóides da FFCLRP - USP, sob supervisão da professora Maria Elisabete Darbello Zaniquelli. A freqüência de oscilação foi sempre de 1,0 Hz. Condições experimentais específicas, como o lipídio presente na interface, ou a concentração de quitosana na subfase, são indicadas na apresentação dos resultados.

3.4.4 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

Na espectroscopia na região do infravermelho (IR) a luz com comprimento de onda entre 2,5 e 25 μ m (ou número de onda entre 400 e 4000 cm⁻¹) interage com a matéria e entra em ressonância com os dipolos das moléculas, sendo absorvida. Como os diferentes grupos ou ligações químicas de uma molécula possuem freqüência de oscilação características, cada molécula possui um espectro típico de IR. Assim, informações químicas estruturais podem ser obtidas.

Em 1966, Robert G. Greenler desenvolveu a espectroscopia de infravermelho no modo reflexão-absorção (IRRAS), (106) uma variante da espectroscopia IR tradicional, realizada por transmissão. No modo IRRAS, a medida é realizada com o material suportado sobre um substrato refletor, como metais. O campo elétrico na superfície refletora é amplificado porque a componente da luz refletida interfere com a luz incidente (para ângulos de incidência rasantes, em torno de 80°), o que permite realizar a medida para filmes extremamente finos (da ordem de alguns nanômetros). Outra peculiaridade é a regra de seleção superficial, que determina que somente a luz p-polarizada (polarizada paralelamente ao plano de incidência) possui refletividade na superfície e, portanto, somente momentos de dipolo com componente de vibração nessa direção (fora do plano da superfície) podem ser detectados. Essa regra de seleção, aplicável somente a substratos metálicos, surge do fato de que a luz s-polarizada refletida possui atraso de fase de 180° em relação ao feixe incidente. Dessa forma, a interferência de ambos os feixes (incidente e refletido) gera campo superficial resultante nulo.

A técnica de IRRAS foi aplicada pela primeira a filmes de Langmuir em 1985 por Richard Dluhy e Donald Cornell. (107) Ao contrário dos experimentos utilizando metais como substrato refletor, a regra de seleção superficial citada no parágrafo acima não se aplica quando a água é o substrato. Devido ao caráter dielétrico da água, o campo elétrico superficial para ambas as polarizações da luz são diferentes de zero, o que permite que vibrações fora e dentro do plano da superfície possam ser detectadas. As bases teóricas para os experimentos de IRRAS realizados para filmes sobre superfícies metálicas ou água foram descritas por Dluhy, que também mostrou a viabilidade de seu emprego para monocamadas do fosfolipídio DSPC (diestearoil fosfatidil colina). (108)

Baseado na diferente absorção e reflexão das duas polarizações da luz por filmes interfaciais formados sobre substratos refletores, um tipo especial de espectroscopia IRRAS,

com modulação da polarização (PM) da luz incidente, foi desenvolvido por Willian Golden e colaboradores no início dos anos 80. (109) A técnica de PM-IRRAS se baseia na alternância da polarização da luz incidente entre s e p com uma freqüência de ordem de dezenas de kHz. Dessa forma, ambos os espectros podem ser medidos quase que simultaneamente e a refletividade diferencial (S) pode ser calculada pela equação 14, a partir da refletividade de ambas as polarizações, $R_s e R_p$.

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \tag{14}$$

A técnica de PM-IRRAS foi aplicada pela primeira vez a filmes de Langmuir por Daniel Blaudez e colaboradores no início dos anos 1990. (110, 111) Com equipamentos eletrônicos para o processamento do sinal modulado, desenvolvidos pouco anos antes, (112, 113) espectros de PM-IRRAS com alta resolução espectral, aplicáveis a uma maior região do espectro infravermelho, e com melhor razão sinal/ruído, foram medidos. Para filmes na interface ar-água é possível estimar a orientação relativa de grupos químicos componentes das moléculas a partir da refletividade diferencial. Além disso, pela subtração do espectro da água pura do espectro da interface com o filme ($\Delta S = S_{filme+água} - S_{água}$), sinais de moléculas distribuídas isotropicamente, como CO₂ e H₂O, principais fontes de ruído no espectro, são bastante reduzidos.

As medidas de PM-IRRAS desta tese foram feitas em equipamento modelo PMI550 da KSV Instruments (Finlândia), que conta com lâmpada de Carbeto de Silício (Globar) como fonte de luz IR, um modulador de polarização fotoelástico composto por um cristal de ZnSe, e um detector de HgCdTe (MCT) modelo PCI-3TE-10.6 com área ativa de 1 x 1 mm². Todas as medidas foram realizadas com ângulo da luz incidente de 80° e à temperatura de 23±1 °C. O sinal coletado pelo detector é amplificado por um lock-in e dividido nas componentes s e p pelo software, o qual calcula a refletividade diferencial pela equação 14.

3.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) pode ser aplicada a materiais na forma de pó, pastilhas mistas com um sal transparente ao infravermelho (ex. brometo de potássio - KBr), ou filmes depositados sobre substratos sólidos. O princípio da técnica é o mesmo da espectroscopia de PM-IRRAS, ou seja, baseia-se na absorção de luz de frequência ressonante com aquela de vibrações de dipolos moleculares do material. A medida pode ser realizada nos modos de transmissão e reflexão, e a técnica recebe esse nome porque o sinal é obtido a partir de um interferograma pelo método matemático da transformada de Fourier. Os resultados mostrados na tese foram obtidos no modo transmissão para filmes LB depositados sobre monocristais de CaF₂ limpos com lenço de papel úmido com acetona e posteriormente clorofórmio. Os experimentos foram feitos em um espectrofotômetro da marca Thermo Nicolet (Estados Unidos) modelo Nexus 470, com resolução espectral de 4 cm⁻¹, sob atmosfera inerte de nitrogênio, e com 64 varreduras.

3.4.6 Microscopia de força atômica (AFM)

Microscopia de força atômica (AFM - atomic force microscopy) é um tipo de microscopia de varredura de sonda (SPM - scanning probe microscopy) na qual a morfologia superficial de uma amostra pode ser medida através do monitoramento das interações, repulsivas ou atrativas, entre uma ponta de prova e a superfície. (114) Essa ponta de prova, que usualmente tem formato piramidal, com altura de 3 a 5 µm e diâmetro no topo de aproximadamente 30 nm, fica ligada pela base a um cantilever, que é uma mola com formato de prancha (com largura e comprimento muito maiores que a espessura). À medida que a ponta varre a superfície, com regiões de diferentes alturas, o cantilever sofre deflexões medidas pela movimentação de um laser refletido em sua parte posterior e detectado por um sensor de posição composto por múltiplos fotodiodos. (115) O microscópio possui sistema eletrônico de retroalimentação que monitora essa movimentação e forma a imagem topográfica através da combinação de várias linhas de varredura em uma mesma amostra. Em alguns casos, esse sistema de retroalimentação monitora também a posição da amostra, que é

ajustada por um suporte piezoelétrico de forma que movimentações da ponta sejam compensadas.

Existem dois modos principais para medidas de AFM: de contato e não-contato. No primeiro, a ponta toca a amostra continuamente ou intermitentemente, e variações de altura durante a varredura (decorrentes de interações repulsivas) são detectadas. No modo não-contato a varredura ocorre com a ponta bastante próxima à superfície, e variações de altura são detectadas como resultado de interações atrativas entre a ponta e a amostra. (115) Outros tipos de medidas, além da topografia, podem ser feitas através de variações do detector, da ponta do microscópio de AFM ou da metodologia de medida. Por exemplo, medidas de fricção, elasticidade, força lateral, força iônica, potencial de superfície, entre outras, podem ser realizadas. (115, 116)

As medidas de AFM na tese foram realizadas em um microscópio *Nanoscope IIIa instrument* no modo contato empregando uma freqüência de ressonância de 300 kHz, taxa de varredura de 1 Hz e ponta de prova de Silício com constante de mola de 70 N/m. Os filmes foram produzidos sobre mica, que foi limpa simplesmente pela clivagem da superfície poucos minutos antes da deposição. Imagens foram obtidas para áreas superficiais do filme de 1 a 100 μ m².

3.4.7 Nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM)

Uma microbalança de cristal de quartzo (QCM) opera baseada na propriedade de piezoeletricidade de um cristal de quartzo. Para o corte no plano cristalográfico AT, o quartzo possui oscilação no modo vibracional de cisalhamento com freqüência de 5 x 10^2 a 3 x 10^8 Hz, além de estabilidade em alta freqüência e baixo coeficiente de dilatação térmica. (117) Em 1959, Günter Sauerbrey propôs uma equação (equação 15) que relaciona variações na freqüência de vibração do cristal com a massa depositada na superfície do mesmo. (118) Nessa equação, a variação da freqüência do cristal (Δf) é diretamente relacionada à variação de massa por unidade de área (Δm) através do coeficiente de sensibilidade do cristal (C_f). Em uma microbalança, um frequencímetro e uma série de componentes eletrônicos são acoplados ao cristal, permitindo monitorar as variações de freqüência decorrentes de deposições de massa. Para uma explicação mais detalhada do funcionamento da técnica aconselha-se a leitura das referências. (119, 120)

$$\Delta f = -C_f x \,\Delta m \tag{15}$$

Nas medidas da tese, cristais com freqüência fundamental de oscilação de 5 MHz e área superficial ativa de aproximadamente 0,4 cm² foram usados em uma microbalança modelo QCM200 da *Stanford Research Systems, Inc.* (USA), que tem capacidade para medir variações de freqüência de até 200 kHz. A constante -C_f para esse cristal vale 56,6 Hz.µg⁻¹.cm⁻². O monitoramento da massa de material depositada em filmes LB foi feito sempre a seco, com o cristal sendo retirado do dipper da cuba no momento em que estava imerso. Os resultados serão apresentados sempre em valores de massa, calculada a partir da variação de freqüência com a equação 15.

3.4.8 Espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG)

Na espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) um laser de comprimento de onda fixo operando na região do visível (ω_{VIS}) e outro laser sintonizável operando na região do infravermelho (ω_{IR}) incidem sobre o mesmo ponto de uma amostra dando origem a um feixe que tem comprimento de onda com freqüência igual à soma dos feixes incidentes ($\omega_{SFG} = \omega_{VIS} + \omega_{IR}$). O sinal do feixe de soma é proporcional ao quadrado da susceptibilidade não linear de segunda ordem χ_s^2 e, segundo a aproximação do dipolo elétrico, ele não é refletido a partir de meios com simetria de inversão. Assim, ω_{SFG} é específico para interfaces, onde ocorre quebra de simetria. Como χ_s^2 é aumentado quando ω_{IR} é ressonante com a freqüência de vibração de dipolos moleculares, o espectro vibracional da interface pode ser medido através da varredura de ω_{IR} em um intervalo de interesse. (121, 122)

Os resultados de SFG mostrados na tese foram obtidos com um espectrofotômetro comercial da marca Ekspla (Lituânia). O equipamento possui um laser de Nd³⁺:YAG que fornece um feixe com freqüência fundamental de 1064 nm, comprimento de pulso de 25 picossegundos e taxa de repetição de 20 Hz. Uma unidade geradora de harmônicos produz o segundo harmônico com comprimento de onda de 532 nm e potência de cerca de 950 μ J, que foi nosso laser de ω_{VIS} . O feixe de infravermelho, com energia entre 30 e 50 μ J e sintonizável na faixa entre 1000 e 4000 cm⁻¹, foi produzido por um amplificador óptico paramétrico

acoplado a um estágio de diferença de freqüência, ambos alimentados pelo feixe fundamental de 1064 nm e pelo terceiro harmônico, em 355 nm. O spot e o ângulo de incidência para os feixes de infravermelho e visível foram, respectivamente, 0,5 mm - 55° e 1,0 mm - 60°. O sinal de SFG foi medido por uma fotomultiplicadora, após passar por filtros espaciais e espectrais, com uma resolução de 3 cm⁻¹ a 100 coletas/ponto.

Foram realizadas medidas para filmes Langmuir-Blodgett (LB) de lipídios transferidos sobre lâminas de sílica fundida (grau infravermelho), com aproximadamente 1 cm² de área e limpas por banho de aproximadamente 20 minutos em solução piranha recém-preparada. Os filmes LB foram transferidos a partir de filmes de Langmuir sobre subfase contendo ou não quitosana. Todos os experimentos foram realizados com os filmes expostos ao ar e com temperatura da sala constante em 23 ± 1 °C. Outros detalhes experimentais (lipídios do filme e concentração de quitosana) são fornecidos com os resultados. Mais detalhes sobre a técnica de SFG e aparato experimental podem ser encontrados nas referências. (121-124)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DPPC e DPPG

No início deste trabalho de doutorado, poucos estudos tratavam da interação de quitosana com modelos de membranas celulares. A preparação de lipossomos contendo quitosana e a interação do polímero com bicamadas lipídicas suportadas eram descritas por alguns autores. (57, 58, 89, 125, 126) Os estudos com lipossomos, em particular, lidavam principalmente com entidades que pudessem ser usadas como veículos de entrega controlada de drogas, e suas principais conclusões eram de que a incorporação de quitosana conferia maior estabilidade às estruturas e favorecia a formação de membranas multilamelares. (57, 58, 126)

Ning Fang e colaboradores (125) foram os primeiros a mostrar que a quitosana, além do aumento do tamanho dos lipossomos, provoca alterações na entalpia da transição de fases gel/líquido-cristalina e aumento dos defeitos do tipo "gauche" (dobramento) nas moléculas de DPPC das membranas. Com base em resultados de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e de espectroscopia FT-RAMAN, os autores sugerem que a quitosana interage eletrostaticamente com a parte polar das membranas e também via interações hidrofóbicas com a região apolar, o que resulta em desestabilização das estruturas e finalmente rompimento dos lipossomos. Na continuação de seus estudos, os autores publicaram um segundo trabalho que utilizava principalmente bicamadas fosfolipídicas suportadas sobre mica para avaliar a interação com quitosana. (89) Filmes de Langmuir também foram empregados, porém pouca atenção foi dedicada ao efeito de condensação imposto aos filmes pelo polímero, como comentado na seção de introdução.

Em nossos estudos, filmes de Langmuir dos fosfolipídios DPPC e DPPG foram inicialmente empregados como modelos de membrana celular. Esses fosfolipídios foram escolhidos por serem abundantes em membranas celulares naturais, por se distribuírem em maior quantidade na folha externa da membrana (especialmente DPPC), e por serem

extensivamente empregados na confecção de filmes de Langmuir, o que nos fornece subsídios para a análise dos resultados. As cabeças polares das moléculas de DPPC e DPPG são formadas por grupos colina (sal quaternário de etilamina) e glicerol, respectivamente, ligados ao grupo fosfato e ao esqueleto de glicerol. A parte apolar de ambos os fosfolipídios é constituída por duas cadeias alquílicas saturadas de 16 carbonos (palmitoil). Como o grupo fosfato possui constante de ionização (pKa) de 1,7, e o sal quaternário de amônio permanece com carga positiva a pHs abaixo de 11,0, o fosfolipídio DPPC é zwitteriônico (possui carga resultante neutra) em pH fisiológico e também no pH no qual os experimentos foram feitos (pH 3), ao contrário do DPPG, que é carregado negativamente.

O tampão Theorell-Stenhagen (TS) foi escolhido para as medidas por causar pouca alteração no formato da isoterma π -A dos fosfolipídios DPPC e DPPG, e consequentemente, poucas modificações no empacotamento e orientação das moléculas. Na figura 8 pode ser observada a semelhança entre a curva obtida para um filme de DPPC sobre tampão TS (curvas vermelha) e a curva obtida sobre uma solução aquosa de HCl com pH 3 (curva preta). Ambas são semelhantes à isoterma obtida para um filme de Langmuir do fosfolipídio sobre água pura. (127) Quando outro tampão é usado, por exemplo, tampão acetato, o formato da curva é modificado. Nesse caso, observa-se a expansão da monocamada (deslocamento da curva para maiores valores de área por molécula), a quase extinção do patamar de transição de fases, e a diminuição da pressão de colapso.



Figura 8 - Isotermas π -A para monocamadas de DPPC formadas sobre diferentes subfases com pH 3: — Solução aquosa de HCl; — Tampão TS; — Tampão acetato.

O primeiro indício da interação favorável entre quitosana e fosfolipídios foi fornecido por medidas de cinética de adsorção para o polímero na ausência ou presença de um filme interfacial de fosfolipídio. As curvas da figura 9 mostram que para a interface limpa a pressão superficial não varia até 400 s (curva preta). Mesmo após a varredura da interface ao final do experimento com as barreiras da cuba de Langmuir nenhuma variação de pressão foi detectada, indicando ausência de adsorção de quitosana. Por outro lado, quando um filme de Langmuir de DPPC é espalhado na interface ocorre um aumento de π , que passa de 3,8 mN/m para aproximadamente 11,7 mN/m após 370 s (curva vermelha). Esse aumento ($\Delta\pi$) reflete a adsorção e incorporação da quitosana à interface, e o fato de não haver um tempo de indução indica que a migração do polímero até a superfície não é dependente de difusão. Em ambos os casos a concentração do polímero na subfase foi de 0,200 mg/mL.



Figura 9 - Evolução da pressão de superfície com o tempo (cinética de adsorção) para uma solução de quitosana 0,200 mg/mL em tampão TS adsorvendo sobre interface limpa (curva preta) ou sobre uma monocamada de DPPC (curva vermelha).

A adsorção da quitosana a partir da subfase sobre filmes interfaciais de DPPC também foi avaliada para outros valores iniciais de π (diferentes estágios iniciais de compactação da monocamada). Observa-se na figura 10 que $\Delta \pi = 20,0$ mN/m para a pressão inicial (π_i) de 32,5 mN/m, bastante maior que aquele para π_i de 4 mN/m, que foi de 8 mN/m. Com medidas de cinética para dois outros valores de π_i foi possível observar um padrão crescente de $\Delta \pi$ em relação aos valores também crescentes de π_i , o que é mostrado no encarte da figura 10. Esse comportamento é bastante incomum, uma vez que experimentos desse tipo descritos na literatura para proteínas solúveis mostram exatamente o contrário, ou seja, uma diminuição de $\Delta\pi$ com o aumento de π_i . (71, 128) Possivelmente, interações da quitosana com as cabeças polares das moléculas de DPPC dominam a adsorção do polímero, o que faz com que o $\Delta\pi$ seja maior para um filme mais compacto (com maior densidade de material).



Figura 10 - Cinética de adsorção da quitosana (0,200 mg/mL em tampão TS) sobre um filme interfacial de DPPC com pressão inicial de 32,5 mN/m. Encarte: Variação da pressão ($\Delta \pi$) versus a pressão inicial do filme de DPPC (π_i).

Na figura 11 é mostrada a cinética de adsorção da quitosana sobre um filme de DPPG com pressão inicial em torno de 32 mN/m. Nesse caso, $\Delta \pi$ é aproximadamente 3 mN/m, muito menor que para um filme de DPPC na mesma pressão (20 mN/m). Tal comportamento é atribuído às interações mais fortes entre a quitosana e o DPPG. Para esse fosfolipídio, carregado negativamente, a interação do polímero com as cabeças polares independe do estado de compactação do filme. Assim, a aproximação das caudas apolares com compactação do filme faz com que a quitosana seja expulsa do interior do filme, permanecendo somente na região hidrofílica da membrana. Mais adiante na tese ficará claro, através de resultados de outras técnicas de caracterização, que a interação da quitosana com fosfolipídios carregados negativamente é de fato mais forte.



Figura 11 - Cinética de adsorção da quitosana (0,200 mg/mL em tampão TS) sobre um filme interfacial de DPPG com pressão inicial de 32,0 mN/m. Encarte: Variação de $\Delta \pi \operatorname{com} \pi_i$.

Como observado no encarte da figura 11, para o filme de Langmuir de DPPG a dependência de $\Delta \pi \mod \pi_i$ foi semelhante àquela típica de proteínas solúveis, mencionada anteriormente. (71, 128) Nesses casos, pode ser extrapolada a pressão de exclusão, para a qual não ocorre mais penetração do polímero na monocamada. Essa pressão de exclusão é cerca de 35 mN/m para a quitosana adsorvendo sobre DPPG. Isso demonstra que o polímero permanece em parte inserido na membrana em pressões correspondentes à de uma biomembrana.

Outro ponto a se destacar das cinéticas de adsorção é que o equilíbrio para todas as pressões iniciais foi atingido em um intervalo curto de tempo, em geral menor que 15 minutos para DPPC e 5 minutos para DPPG. Isso se observou também para outros fosfolipídios e para outras concentrações iniciais de quitosana na subfase. Como o tempo esperado para a evaporação do clorofórmio após o espalhamento da solução também foi de 15 minutos, todas as isotermas mostradas a seguir foram medidas em uma condição de equilíbrio.

Isotermas π -A para monocamadas de DPPC sobre subfase contendo diferentes concentrações de quitosana são mostradas na figura 12. No regime de baixas pressões de superfície, observa-se expansão crescente das curvas com o aumento da concentração de quitosana entre 0,050 e 0,200 mg/mL. Para a concentração de 0,300 mg/mL a expansão deixa de ocorrer e o efeito contrário é observado, ou seja, a curva para essa concentração é mais condensada que para a concentração anterior. Por esse motivo, a concentração de 0,200 mg/mL é denominada de concentração saturação do efeito de expansão provocado pela

quitosana. Essa concentração de saturação pode ser observada mais facilmente no gráfico da figura 13, no qual são traçadas as variações de área por molécula a uma pressão fixa (17 mN/m), e de pressão de superfície a uma área por molécula fixa (80 Å²/mol). Curiosamente, para filmes mais compactos, com pressão de superfície acima de 18 mN/m, a concentração de saturação é de 0,100 mg/mL, o que significa que a reversão do efeito de expansão ocorre já para a concentração de 0,200 mg/mL. Outra característica interessante das curvas da figura 12 é que ao final da compressão, próximo ao colapso das monocamadas, todas passam a ter praticamente o mesmo formato e nos mesmos valores de área por molécula e pressão de superfície, sugerindo a expulsão da quitosana da interface.



Figura 12 - Isotermas π -A para monocamadas de DPPC formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)



Figura 13 - Variação de área por molécula na pressão de 17 mN/m (curva preta) e de pressão de superfície na área de 80 Å²/mol (curva vermelha) com relação a concentração de quitosana na subfase de filmes de DPPC.
As curvas para monocamadas de DPPG sobre subfase com diferentes concentrações de quitosana são mostradas na figura 14. A isoterma do fosfolipídio puro tem formato semelhante ao publicado na literatura. (129) Da mesma forma que para os filmes de DPPC, a introdução de quitosana à subfase provoca expansão crescente das monocamadas até a concentração de saturação de 0,200 mg/mL. Essa concentração de saturação também pode ser observada com maior clareza na variação de π para uma área fixa ou da área por molécula para π fixo com a concentração de quitosana (figura 15). A curva para a concentração de 0,300 mg/mL é mais condensada que a curva para 0,200 mg/mL, exceto para π maior que 47 mN/m. Ao final da compressão, todas as isotermas para os filmes de DPPG sobre subfase contendo quitosana atingem valor de pressão entre 2 e 7 mN/m maior que aquele observado para o filme de lipídio puro (cerca de 64 mN/m). A única exceção é a curva para a concentração de saturação (0,200 mg/mL), que apresenta um comportamento irregular a altas pressões, e atinge exatamente o mesmo valor final de π que o filme de DPPG sobre tampão puro.



Figura 14 - Isotermas π -A para monocamadas de DPPG formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)



Figura 15 - Variação de área por molécula na pressão de 17 mN/m (curva preta) e de pressão de superfície na área de 80 Å²/mol (curva vermelha) com a concentração de quitosana na subfase de filmes de DPPG.

Com relação ao formato das isotermas das figuras 12 e 14, pode-se observar que a incorporação de quitosana à subfase, em qualquer concentração, causa o desaparecimento do patamar de transição de fases líquido-expandida/líquido-condensada (LE/LC), o que é reflexo de uma maior miscibilidade entre essas fases. (130) Essa extinção do patamar é facilmente observada nas curvas de elasticidade no plano das figuras 16 e 17.



Figura 16 - Elasticidade no plano (Cs⁻¹) para monocamadas de DPPC formadas sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura). As curvas foram calculadas a partir das isotermas π -A da figura 12 usando a equação de Cs⁻¹, dada no capítulo 3.4.3.



Figura 17 - Cs⁻¹ para monocamadas de DPPG formadas sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura).

Para as monocamadas de DPPC (figura16), a região de elasticidade quase nula entre 65 e 85 Å²/mol, característica do patamar de transição de fase, não aparece nos filmes sobre subfase contendo quitosana. A incorporação do polissacarídeo aos filmes causa diminuição do valor máximo de elasticidade, que era de cerca de 250 mN/m para o filme de DPPC puro e passa a valores entre 100 e 140 mN/m para os filmes contendo quitosana. Isso indica que a incorporação da quitosana, uma molécula com cadeia longa e flexível, torna as monocamadas menos rígidas, o que pode ter importantes implicações na estabilidade de membranas celulares reais. O deslocamento do máximo de elasticidade para maiores valores de área nos filmes contendo quitosana também é reflexo da expansão imposta pelo polímero aos filmes de DPPC, comentada na discussão das figuras 12 e 13.

No caso dos filmes de DPPG da figura 17, os efeitos da introdução de quitosana foram praticamente os mesmos: extinção da região de elasticidade quase nula, deslocamento do ponto de máximo de elasticidade para maiores áreas (expansão), e diminuição do máximo de elasticidade. Nesse último caso, é interessante notar que mesmo que a monocamada de DPPG pura tem elasticidade máxima (~400 mN/m) maior que do filme de DPPC puro (~250 mN/m). O valor decresce para um mesmo patamar com a introdução de quitosana, em torno de 100-150 mN/m. Isso mostra que o estado final de elasticidade dos filmes, após a interação com quitosana, independe do fosfolipídio usado.

O efeito da quitosana sobre a elasticidade superficial de monocamadas de DPPC e DPPG também foi medido de maneira dinâmica utilizando a técnica da gota pendente. Nessa técnica o filme interfacial é espalhado na superfície de uma gota alocada na ponta da agulha de uma microseringa. As principais diferenças entre a medida de Cs⁻¹ e de elasticidade superfícial dinâmica (ϵ) são: i) na cuba de Langmuir a quitosana adsorve sempre sobre um filme com pressão de superfície inicial nula, enquanto na gota ela adsorve sobre uma monocamada já com estágio de compactação mais alto; ii) a razão área superfícial/volume da subfase é maior para a gota pendente do que na cuba; iii) na cuba de Langmuir a compressão do filme é bastante lenta e Cs⁻¹ é medido sempre com o sistema em equilíbrio, ao contrário de ϵ que é obtido sob oscilação bastante rápida da gota.

Os valores de elasticidade superficial dilatacional (ε) para filmes sobre tampão puro ou tampão contendo 0,075 mg/mL de quitosana são mostrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente, para DPPC e DPPG. Imediatamente após o espalhamento, a quitosana começou a adsorver e uma cinética como as mostradas nas figuras 10 e 11 foi medida. A variação em π causada por essa adsorção também é dada nas tabelas. A elasticidade superficial também foi medida pelo método da gota pendente para o tampão puro e para uma solução de quitosana com concentração de 0,075 mg/mL no tampão Theorell (sem filme interfacial). Os valores de ε em ambos os casos ficaram entre 1 e 2 mN/m, o que está dentro da incerteza do equipamento.

Tabela 1 - Elasticidade superficial dilatacional para filmes de Langmuir de DPPC formados sobre tampão TS puro e sobre tampão TS contendo 0,075 mg/mL de quitosana dissolvida. Obs: i) os dados para o filme contendo quitosana foram medidos após a estabilização da adsorção do polímero. ii) a parte imaginária da elasticidade para os filmes de fosfolipídio puro são praticamente nulas e por isso foram omitidas.

DPPC		DPPC+quitosana			
$\pi_i(mN/m) \epsilon (mN/m)$		$\Delta \pi (mN/m) \epsilon (mN/m) \epsilon_i$		$\epsilon_i (mN/m)$	
8 ± 1	28,4	7,8	42,9	0,6	
17 ± 2	46,7	10,0	45,0	6,6	

Tabela 2 -	Elasticidade superficial dilatacional para filmes de Langmuir de DPPG formados sobre tampão TS
	puro e sobre tampão TS contendo 0,075 mg/mL de quitosana dissolvida.

DPPG		DPPG+quitosana		
π_i (mN/m)	ε (mN/m)	$\Delta\pi$ (mN/m)	ε (mN/m)	$\epsilon_i (mN/m)$
8 ± 1	51,3	15,0	140,0	2,7
17 ± 2	67,8	11,2	261,8	33,9

Pode-se notar que a introdução de quitosana às monocamadas causou aumento de ɛ para os dois fosfolipídios na pressão inicial de 8 mN/m. Para DPPC a elasticidade aumentou em 51% e para DPPG em 173%. Esse aumento se deve provavelmente à penetração do polímero na membrana, inclusive na região hidrofóbica do filme, o que causa maior orientação das cadeias de fosfolipídios. (125, 131) Apesar das diferenças entre os métodos de medida de Cs⁻¹ e ɛ, o mesmo padrão de aumento com a introdução da quitosana foi notado (quando observados os valores de Cs⁻¹ para filmes com as mesmas pressões iniciais e finais). Na pressão inicial de 17 mN/m, a interação da quitosana com filmes de DPPC quase não provoca alterações no valor de elasticidade, que permanece em torno de 45-46 mN/m. Esse comportamento corrobora as conclusões obtidas com as isotermas de pressão de superfície. indicando que a quitosana a pressões mais altas não penetra na membrana. Ao contrário, para a monocamada de DPPG a elasticidade aumenta em 286 %, passando de 67,8 mN/m para 261,8 mN/m. Neste caso, a forte interação eletrostática da quitosana com as cabeças polares do lipídio forca um maior alinhamento das caudas, facilitando seu empacotamento. (125, 131) Mesmo o maior aumento percentual da elasticidade para o filme de DPPG a baixas pressões é devido a esse efeito eletrostático, que atua em conjunto com a penetração do polímero. Além disso, o aumento da parte imaginária da elasticidade de valores nulos para aproximadamente 34 mN/m, relacionada com a viscosidade do filme, também é conseqüência da forte interação entre os grupos carregados.

Ainda com relação ao efeito da quitosana sobre as propriedades mecânicas do filme de DPPC e DPPG, pode-se ver na figura 18 que a presença da quitosana dificulta a recuperação do estágio inicial de espalhamento das moléculas de fosfolipídio na interface. As curvas foram obtidas para filmes de DPPC e DPPG sobre tampão TS contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida. A curva de descompressão mostra queda rápida de pressão no início da abertura das barreiras. Essa histerese indica a formação de agregados irreversíveis durante a compressão do filme, o que não ocorre na ausência da quitosana. (129, 132)



Figura 18 - Curvas de compressão e descompressão para monocamadas de DPPC e DPPG formadas sobre tampão TS contendo 0,200 mg/mL quitosana dissolvida. Velocidade da barreira de 10 mm/min.

Medidas de potencial de superfície mostram que as propriedades elétricas dos filmes interfaciais também são alteradas pela interação da quitosana com os filmes de Langmuir. As curvas para filmes de DPPC e DPPG formados sobre subfase contendo diferentes quantidades de quitosana são mostradas, respectivamente, nas figuras 19 e 20.



Figura 19 - Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPC formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da fígura).



Figura 20 - Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de DPPG formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura).

De um modo geral, o perfil das curvas para os filmes de DPPC sobre subfase contendo qualquer concentração de quitosana é bastante parecido com aquele observado para o filme do lipídio sobre tampão puro, e mesmo para filmes formados sobre água. (133) Observa-se um aumento inicial rápido do sinal, seguido por uma região intermediária de aumento mais lento, e uma fase final novamente com inclinação maior da curva. A única exceção é a isoterma obtida com 0,300 mg/mL de quitosana na subfase, que mostra um aumento do sinal quase constante durante toda a medida. Para as menores concentrações de quitosana empregadas (0,050 e 0,075 mg/mL), o sinal inicial de potencial é praticamente o mesmo que o sinal inicial para o filme puro de DPPC, em torno de 0 V. Com a adição de quantidades maiores de quitosana, esse sinal inicial passa a ser positivo, devido à contribuição de grupos polares da interface. O fato de o potencial para o filme condensado não coincidir para todas as curvas indica que a quitosana, mesmo expulsa da interface, como sugerido pela análise das curvas de π -A, permanece na sub-superfície dos filmes afetando a membrana.

No caso das monocamadas de DPPG, o sinal inicial de potencial para o filme formado sobre tampão puro é positivo, em torno de 0,050 V, ao contrário do valor inicial negativo medido para filmes sobre água pura. (134) Essa diferença é causada provavelmente pela neutralização da dupla camada elétrica por parte dos sais do tampão. Com a introdução de qualquer quantidade de quitosana na subfase o sinal inicial passa a ser pelo menos três vezes maior. Esse aumento também é atribuído à introdução dos grupos polares e das cargas positivas da quitosana, como para o DPPC. O efeito é bem mais pronunciado para os filmes de DPPG devido à interação eletrostática mais forte da quitosana com esse fosfolipídio. Para os filmes de DPPG, o sinal final de todas as curvas são bastante próximos e situados em torno de 0,500 V.

Traçando o gráfico de potencial inicial *versus* concentração de quitosana (figuras 21 e 22) é possível confirmar a concentração de saturação de 0,200 mg/mL para o filme de DPPC - mesmo valor obtido para a pressão de superfície a grandes áreas. No caso dos filmes de DPPG (figura 22), essa concentração de saturação não pode ser constatada pelo sinal inicial de potencial. A forte interação eletrostática entre o lipídio carregado negativamente e a quitosana reflete um comportamento complexo, com dois regimes de aumento do potencial inicial sendo observados, um no intervalo de concentração de 0 a 0,075 mg/mL e outro de 0,100 a 0,300 mg/mL de quitosana. Isso demonstra que, enquanto as modificações sobre os filmes de DPPG causadas pela quitosana saturam em 0,200 mg/mL, a influência do polímero sobre as propriedades elétricas da interface continua a aumentar acima dessa concentração.



Figura 21 - Potencial de superficie inicial das curvas na figura 19 versus concentração de quitosana na subfase.



Figura 22 - Potencial de superficie inicial das curvas na figura 20 *versus* concentração de quitosana na subfase.

Filmes Langmuir-Blodgett (LB) com apenas 1 camada foram depositados para os sistemas compreendendo quitosana e monocamadas de DPPC e DPPG. Os filmes foram depositados no cristal de quartzo da microbalança na pressão de 40 mN/m. Para os filmes contendo quitosana, a concentração do polímero usada na subfase dos filmes de Langmuir precursores foi de 0,200 mg/mL. Os valores das taxas de transferência e da massa depositada em cada caso são dados na tabela 3.

istemus estududos				
Composição do Filme	TR	Massa depositada (ng)		
DPPC	0,91	303		
DPPC+quitosana	0,92	781		
DPPG	0,89	297		
DPPG+quitosana	0,86	809		

 Tabela 3 Taxas de transferência (TR) e massa depositada para os filmes LB de uma camada dos diferentes sistemas estudados

As taxas de transferência próximas da unidade indicam a deposição de uma monocamada em todos os casos. A mesma massa de material, aproximadamente 300 ng, foi depositada para os filmes puros de DPPC e DPPG. Para ambos os fosfolipídios, a introdução de quitosana na subfase dos filmes de Langmuir causou aumento da massa depositada de cerca de 500 ng. Essa diferença de massa pode ser atribuída à quitosana, que foi transferida

juntamente com os fosfolipídios. Dessa forma, comprova-se que a quitosana pode ser expulsa da interface para filmes com estágios de alta compactação (como indicado pelas isotermas π -A), entretanto, permanece incorporada à subsuperfície dos filmes de Langmuir (como sugerido pelas curvas de potencial), sendo transferida para os filmes LB.

No esquema 1 é mostrado um desenho que ilustra a disposição idealizada das moléculas de quitosana nas diferentes situações: (a) na ausência de um filme interfacial de fosfolipídio; (b) na presença de um filme de fosfolipídio em um estágio de compactação baixo (baixos valores de π); (c) na presença de um filme de fosfolipídio com um estágio de compactação alto (altos valores de π). Com os resultados obtidos até o momento, esse é o modelo que melhor descrevia a interação de quitosana com filmes de DPPC e DPPG.



Esquema 1 - Modelo de interação da quitosana com monocamadas de DPPC ou DPPG: (a) quitosana solúvel (sem atividade superficial) na ausência de filme interfacial; (b) interação da quitosana penetrando nas monocamadas a baixas pressões de superficie; (c) quitosana expulsa do interior dos filmes, permanecendo na subsuperficie dos mesmos.

A confirmação de que a massa "extra" adsorvida nos filmes formados sobre subfase contendo quitosana é mesmo uma massa do polímero que está sendo transferida só poderia ser obtida através de caracterizações químicas do filme LB. Contudo, esse tipo de caracterização é inviável para o filme de 1 monocamada, o qual é extremamente fino. A deposição de filmes com maior número de camadas é impossibilitada nesses sistemas pela baixa adesão dos fosfolipídios DPPC e DPPG a qualquer tipo de substrato. (135) Por esse motivo passamos a utilizar o fosfolipídio DMPA, que possui adesão maior sobre substratos sólidos devido a sua cabeça polar de ácido fosfatídico, permitindo a formação de filmes LB multicamadas. (135) Os resultados desses estudos são mostrados na próxima Seção.

4.2 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de DMPA

Como mencionado, o principal motivo para utilizar filmes de Langmuir do fosfolipídio DMPA como modelo de membrana foi a melhor adesão sobre diversos substratos, permitindo depositar filmes LB mais espessos e passíveis de serem caracterizados por maior número de técnicas. (135) Além disso, o fato de esse fosfolipídio possuir cabeça polar com ácido fosfatídico é interessante, pois o mesmo possui carga negativa quando desprotonado (ver figura 2). Especula-se que a interação da quitosana com fosfolipídios com carga negativa é bastante favorecida por interações eletrostáticas, e o uso de DMPA pode auxiliar também na compreensão desses efeitos.

Os experimentos com DMPA foram realizados sobre subfase de HCl 1 mM pH 3, na qual a quitosana foi dissolvida. Essa subfase foi usada porque a isoterma de pressão de superfície deste fosfolipídio é ligeiramente expandida sobre tampão Theorell-Stenhagen. Inicialmente, os filmes de Langmuir sobre subfase contendo diversas concentrações de quitosana foram caracterizados por medidas de pressão e potencial de superfície, e medidas de elasticidade estática e dinâmica, para que o efeito da quitosana fosse analisado comparativamente aos efeitos observados para filmes de DPPC e DPPG. Em seguida, filmes LB foram depositados e caracterizados por nanogravimetria em microbalança de cristal de quartzo (QCM), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de soma de freqüências (SFG) e microscopia de força atômica (AFM).

Na figura 23 são mostradas as isotermas de π -A para filmes de DMPA sobre subfase com diferentes concentrações de quitosana. A curva do fosfolipídio puro sobre subfase HCl 1 mM é semelhante à obtida para a monocamada sobre água pura. (136) O patamar de transição de fases LE-LC aparece a pressões baixas, em torno de 1-2 mN/m. A introdução da quitosana à subfase provoca o desaparecimento deste patamar e o aparecimento de uma fase líquidoexpandida mais extensa. Além disso, observou-se expansão crescente dos filmes com o aumento da concentração de quitosana na subfase, semelhantemente aos filmes de DPPC e DPPG. Para as monocamadas de DMPA, a mesma concentração de saturação de 0,200 mg/mL foi observada, e a reversão do efeito para concentração de 0,300 mg/mL é bastante acentuada. As mudanças nas isotermas, especialmente a expansão, confirmam que a quitosana migra para a superfície e interage com os filmes. Da mesma forma que para os filmes de DPPC e DPPG, essa expansão é maior a baixas pressões e menos acentuada em altos estágios de compactação da monocamada, com as isotermas coincidindo em valores semelhantes de área e π . Isso sugere expulsão da quitosana da interface quando o filme atinge altos graus de compactação.



Figura 23 - Isotermas π -A para filmes de Langmuir de DMPA sobre subfase de HCl 1 mM contendo diversas concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura).

O fator de compressibilidade, ou elasticidade no plano, foi calculado a partir das isotermas da figura 23, sendo mostrado na figura 24 em função de π . A incorporação da quitosana torna os filmes de Langmuir de DMPA menos elásticos (mais compressíveis) para qualquer valor de pressão, assim como para os outros lipídios estudados. De acordo com Davies e colaboradores, fases líquido-condensadas têm Cs⁻¹ entre 100 e 250 mN/m, e fases líquido-expandidas entre 10 e 100 mN/m. (98) A presença de uma maior porção das isotermas na fase líquido-expandida para os filmes com quitosana, mencionada acima, também fica clara neste gráfico.

A diminuição da elasticidade no plano é dependente da concentração de quitosana na subfase. Na figura 25, são traçados os valores de elasticidade no plano em função da concentração de quitosana para 40 mN/m. Na mesma figura é mostrada a área em função da concentração de quitosana. Enquanto a concentração de saturação para o efeito de expansão pode ser vista claramente na curva de área, observa-se que o efeito não se satura para a elasticidade no plano na pressão de 40 mN/m. Isso mostra que, apesar de a adsorção de quantidades de quitosana acima da concentração de saturação causar condensação da

monocamada, a incorporação do polissacarídeo à interface continua tornando o filme menos rígido. Do ponto de vista das aplicações de quitosana, conclui-se que mesmo concentrações acima da concentração de saturação podem provocar alterações nas propriedades de biomembranas.



Figura 24 - Cs⁻¹ para monocamadas de DMPA sobre subfase de HCl 1mM contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura).



Figura 25 - Variação de área por molécula e elasticidade no plano com a concentração de quitosana na subfase para filmes de Langmuir de DMPA na pressão de 40 mN/m.

A elasticidade superficial dinâmica dos filmes também foi avaliada com a técnica da gota pendente, e os resultados são mostrados na tabela 4. Foram feitas medidas para três valores de pressão, e para filmes de DMPA sobre subfase de HCl 1 mM puro ou contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida. O valor denotado por " ϵ " é a medida da elasticidade

dinâmica, e a amplitude do ângulo de fase está relacionada à parte imaginária da elasticidade e demonstra o quão grande é a componente viscosa do sistema.

π (mN/m)	ε <u>+</u> 0.5 (mN/m)		ângulo de fase (°)	
DMPA	DMPA DMPA+quitosana		DMPA	DMPA+quitosana
5	20,4	18,8	3,0	10,1
15	48,1	44,9	5,1	10,7
30	79,4	68,3	6,8	11,1

 Tabela 4 Elasticidade superficial dinâmica e viscoelasticidade obtida pelo método da gota pendente para monocamadas de DMPA e monocamadas mistas DMPA-quitosana.

A adição da quitosana provoca pequena diminuição de ε para todas as pressões, chegando ao máximo de decréscimo de 13% para 30 mN/m. Um efeito maior é observado na pressão de 5 mN/m. Especula-se que na pressão mais baixa a penetração da quitosana no filme de fosfolipídio seja maior e a interação das cadeias rígidas hidrocarbônicas seja diminuída, por isso a variação na componente viscosa é maior. O comportamento viscoelástico normalmente está relacionado a processos dissipativos e de difusão em monocamadas. (137)

A expansão induzida pela quitosana também pode ser vista nas curvas de potencial de superfície da figura 26. Ao contrário de um filme de DMPA sobre água pura, que tem potencial inicial negativo, (138) o sinal de ΔV para o filme de DMPA em pH 3 inicia em aproximadamente 0,13 V, devido à compensação parcial das cargas do fosfolipídio nesse pH. Além disso, o potencial máximo para esse filme é cerca de 0,40 V, também maior do que na subfase de água pura. (138) Com quitosana na subfase, a subida do sinal de potencial é deslocada para maiores áreas (expansão). Assim como para o DPPG, mesmo após a concentração de saturação das curvas de pressão de superfície, a curva de ΔV continua a sofrer expansão, o que confirma a interação diferenciada da quitosana com fosfolipídios carregados negativamente. O sinal máximo é de 0,50 V, independentemente da concentração de polímero. Esse valor máximo é cerca de 100 mV maior que o medido para o filme de DMPA puro. Ao contrário das curvas de pressão de superfície, essa diferença do sinal de potencial indica que mesmo ao final da compressão a quitosana permanece incorporada à interface. Nesse caso, a presença da quitosana pode contribuir para o aumento do potencial através de alguns fatores como: i) maior alinhamento das cadeias de fosfolipídio; ii) alteração

da carga dos grupos fosfato; iii) rearranjo das moléculas de água próximas à superfície, e; iv) momento de dipolo de grupos da quitosana.



Figura 26 - Isotermas ΔV-A para monocamadas de DMPA formadas sobre subfase de HCl 1mM contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura).

Para comprovar a hipótese de que a quitosana continua incorporada na membrana, localizada na sub-superficie, filmes Langmuir-Blodgett com 11 camadas foram depositados na pressão de 40 mN/m a partir de filmes de Langmuir de DMPA sobre subfase de HCl 1mM puro ou contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida. Essa pressão foi escolhida pelo fato de que nela as moléculas do filme possuem um estado de compactação semelhante ao de uma membrana celular real. (70) Filmes mais espessos não foram transferidos porque 11 camadas foram suficientes para a realização das medidas pretendidas. O sucesso da deposição foi primeiramente confirmado pelas taxas de transferência (fornecida pela cuba), que em todas as camadas, e para os filmes depositados sobre todos os substratos, ficou entre 0,97 e 1,05, valores considerados excelentes. Como houve transferência de massa na subida e na descida, os filmes formados foram do tipo Y.

Medidas da massa de material transferida aos filmes LB (QCM) mostram que existe uma diferença na quantidade de material adsorvida na presença e na ausência de quitosana. Essa diferença tem aproximadamente o mesmo valor para qualquer camada com exceção da primeira, que é irregular pela maior influência que sofre da rugosidade do substrato. A variação da massa total depositada sobre o cristal da microbalança com o número de camadas é mostrada na figura 27, e o acréscimo de massa para as camadas ímpares é dado na figura 28.



Figura 27 - Massa total depositada medida por nanogravimetria em QCM para filmes de DMPA e DMPA+quitosana.



Figura 28 - Acréscimo de massa para as camadas ímpares, calculadas a partir do gráfico da figura 27, para filmes de DMPA e DMPA+quitosana.

Pode-se observar que a massa aumenta linearmente com o número de camadas para ambos os filmes. Como mostra a figura 28, o aumento de massa para cada bicamada é aproximadamente 200 ng para o DMPA puro, enquanto que para o filme contendo quitosana esse aumento é cerca de 500 ng. Dividindo-se a massa total do filme pelo número total de camadas (11 camadas), obtém-se 109,5 ng/camada para o DMPA puro, e de 258,3 ng/camada para o filme de DMPA+quitosana. A diferença entre os filmes com e sem quitosana, de 148,8 ng, pode ser atribuída à massa de quitosana "carregada" junto com o fosfolipídio para o filme.

A confirmação da presença da quitosana nos filmes LB de 11 camadas foi obtida com medidas de FTIR dos filmes mistos depositados sobre CaF₂. Nos espectros dos filmes

transferidos a partir de subfases contendo ou não quitosana (figura 29), é possível observar o acréscimo de alguns picos característicos quando o polímero está presente. Primeiramente, para o filme de DMPA puro podem-se observar os picos em 2954 cm⁻¹, atribuído ao estiramento assimétrico do grupo CH₃; 2922 e 2848 cm⁻¹, atribuídos, respectivamente, aos estiramentos assimétricos e simétricos do grupo CH₂; 1738 e 1470 cm⁻¹, referentes, respectivamente, ao estiramento do grupo carbonila e ao modo de vibração *scissoring* do grupo CH₂ e; 1414 e 1377 cm⁻¹, referentes, respectivamente, ao modo de vibração δ (CH₂) *scissoring* acoplado aos grupos CO e PO, e ao "ombro" do modo de vibração δ (CH₃). Todos os picos estão de acordo com a literatura. (139)

Para o filme misto DMPA+Quitosana, a banda do estiramento dos grupos OH aparece em 3226 cm⁻¹. Essa banda é bem larga, devido às ligações de hidrogênio e à retenção de água no filme LB, e inclusive sobrepõe a banda dos grupos NH₂, que deveria aparecer na mesma região. Outro pico de menor intensidade, característico de quitosana, aparece em 1585 cm⁻¹, sendo atribuído à vibração de deformação angular (bending) dos grupos amina + a vibração do tipo amida II. (14) A presença dessas bandas comprova a transferência da quitosana para o filme LB.



Figura 29 - Espectro de FTIR para filmes LB de 11 camadas de DMPA e DMPA+quitosana.

Além da tradicional técnica de FTIR, outro tipo de espectroscopia vibracional pôde ser aplicada aos filmes LB de DMPA e DMPA-quitosana com a montagem do laboratório de espectroscopia não-linear de interfaces (LENI) no grupo de Polímeros Bernhard Gross pelo professor Paulo Barbeitas Miranda. Como já descrito, a espectroscopia de geração de soma de freqüências (SFG) possui a peculiaridade de ser seletiva a meios não centro-simétricos, como interfaces, e de ser altamente sensível. Em nosso caso, a técnica foi usada não apenas com o intuito de caracterizar os filmes quanto sua composição química, mas também para observar no nível molecular a conformação das moléculas de DMPA nos filmes LB, e o efeito da quitosana sobre sua nanoestruturação. Foram feitas medidas para filmes LB com 1 camada depositados a partir de filmes de Langmuir de DMPA, na pressão de 40 mN/m, formados sobre subfase de HCl 1mM puro ou de tampão com 0,200 mg/mL de quitosana. Os resultados das medidas na região de vibração do grupo CH (entre 2800 e 3100 cm⁻¹) são mostrados na figura 30.



Figura 30 - Espectros de SFG para filmes LB de DMPA e DMPA+quitosana com 1 camada.

Os espectros para os filmes, puro e misto, consistem basicamente de dois picos centrados em 2873 e 2944 cm⁻¹, referentes ao estiramento simétrico da ligação CH (r⁺), e a ressonância de Fermi associada ao *overtone* da torção simétrica (r⁺_{FR}) do grupo CH₃, respectivamente. Um "ombro" em 2843 cm⁻¹, atribuído ao estiramento simétrico dos grupos metileno (d⁺), também é observado com baixa intensidade. Os dois primeiros picos, em 2873 e 2944 cm⁻¹, aparecem devido ao alinhamento das cadeias de DMPA no filme LB, o que induz uma orientação preferencial média aos grupos CH₃ das terminações das cadeias de miristoil. O pico em 2843 cm⁻¹ só aparece se ocorrer pontos em que as cadeias possuem "dobras" ou "defeitos", caso contrário a orientação invertida dos dipolos de unidades metileno (CH₂) faz com que o sinal de cada unidade se cancele e na soma seja nulo.

O fato de os filmes, puro e misto, possuírem sinais muito parecidos leva à conclusão de que a quitosana incorporada à monocamada de DMPA possui distribuição aleatória, típica

de polímeros. Entretanto, a quitosana altera a razão de intensidades r^+/d^+ , que passa de 6,22 para 9,06. Embora ambos os filmes possuam defeitos, e a densidade de fosfolipídios no filme misto seja menor (filme expandido), a presença da quitosana confere maior orientação às moléculas de fosfolipídios. Essa constatação corrobora os dados de potencial de superfície, que indicam maior momento de dipolo no filme misto (discussão da figura 26). Provavelmente, os fatores i e iv (maior alinhamento das cadeias alquílicas e contribuição dos dipolos do polímero) levantados como hipóteses para explicar o aumento de potencial com a inserção da quitosana são os mais significativos.

A morfologia dos filmes LB foi avaliada através de medidas de microscopia de força atômica (AFM) para filmes com 1 camada de DMPA ou DMPA+quitosana depositados sobre mica. As imagens são mostradas na figura 31, e os dados de rugosidade são dados na tabela 5, juntamente com a espessura dos filmes. A superfície do filme de DMPA é bastante homogênea (figura 31A), com uma rugosidade RMS entre 0,20 e 0,26 nm para um filme com espessura de 1,7 nm. Esses valores têm a mesma ordem de grandeza que resultados publicados na literatura, (141) apenas com pequenas diferenças que podem ser atribuídas à diferente pressão de deposição e ao uso do método contato para as medidas, ao invés do método contato-intermitente.



Figura 31 - Imagens de AFM de filmes LB com 1 camada de DMPA [A] ou DMPA+quitosana [B].

Tabela 5 - Rugosidade (RMS - rugosidade média quadrática) e espessura de filmes LB de DMPA e DMPA+quitosana depositados sobre mica. Os valores foram calculados para imagens com 1, 5 ou 10 um².

Filme	Dimensão da Imagem	Rugosidade (nm)	Espessura (nm)
	$10 \ \mu m^2$	0,26	
DMPA	$5 \ \mu m^2$	0,22	1,7
	$1 \ \mu m^2$	0,20	
	$10 \ \mu m^2$	25,80	
DMPA+quitosana	$5 \ \mu m^2$	39,00	5,8-47,8
	1 μm ²	12,10	

Com a presença da quitosana, filmes bem mais irregulares são produzidos, onde podem ser vistos grandes aglomerados com altura entre 50 e 150 nm, os quais supostamente são moléculas de quitosana que penetram no filme de lipídio. A rugosidade para uma imagem

com área de 10 μ m² do filme misto é de 25,8 nm. Entretanto, esse valor depende muito da área analisada, como pode ser visto na tabela 5. Se a rugosidade é calculada em áreas onde não existem grandes aglomerados, como aquela destacada na figura 31B, a rugosidade é 3,2 nm, o que ainda é aproximadamente 12 vezes a rugosidade para o DMPA. Isso sugere que mesmo nas regiões onde não se observam agregados, a quitosana se encontra sob o filme de fosfolipídios. Também como conseqüência da presença dos agregados, a espessura do filme mostra grandes variações ao longo da amostras, variando de 5,8 a 47,8 nm. De modo geral, das imagens de AFM conclui-se que a quitosana penetra nas monocamadas de fosfolipídios e também se dispõe como um "colchão" para o DMPA no filme LB.

Os resultados para monocamadas de Langmuir de DMPA mostram que a interação da quitosana com os filmes desse fosfolipídio possui um padrão bastante parecido com aquele observado para os filmes de DPPC e DPPG. A quitosana adsorve nos filmes e modula as propriedades estruturais do mesmo, causando expansão das monocamadas e diminuição da elasticidade estática e dinâmica. Para as monocamadas de DMPA, as curvas de potencial de superfície com sinais finais mais altos para os filmes mistos produziram indícios de que a quitosana permanecia incorporada à membrana mesmo em altos estágios de compactação do filme, assim como foi para o DPPC.

Com o uso de filmes LB transferidos em uma pressão de superfície na qual as moléculas possuem um empacotamento equivalente ao de uma membrana celular real, foi possível determinar que a quitosana é transferida juntamente com as moléculas de fosfolipídio para o substrato sólido. Como a morfologia do filme misto sugere a formação de agregados de quitosana dispersos em uma matriz de filme de DMPA suportado pela quitosana, um novo cenário pode ser imaginado para a nanoestruturação das moléculas no sistema. Acredita-se que a quitosana pode penetrar no filme de Langmuir mesmo a altas pressões, e que o filme LB do tipo Y transferido a partir dessa monocamada mista possui uma bicamada de quitosana entre as bicamadas de fosfolipídio. Essa nova configuração do sistema é ilustrada no modelo do esquema 2.

Supõe-se que a interação entre os compostos ocorra por interações dipolares, hidrofóbicas, e eletrostáticas. Entretanto, as diferenças dos efeitos observados para os fosfolipídios carregados negativamente (DPPG e DMPA), com relação ao fosfolipídio zwiteriônico (DPPC), principalmente com respeito ao formato das curvas de potencial de superfície, indicam que interações eletrostáticas dos grupos PO_2^- dos fosfolipídios com o grupo NH_3^+ da quitosana desempenham papel muito importante na ação do polissacarídeo. Isso ficará mais evidente com o uso de membranas mistas de DMPA e colesterol, cujos resultados são mostrados na seção 4.4.



Esquema 2 - [A] modelo para a interação da quitosana com filmes de Langmuir de DMPA a altas pressões de superficie. [B] estrutura idealizada para um filme LB multicamadas DMPA+quitosana transferido a altas pressões de superficie.

4.3 Interação de quitosana com filmes de Langmuir de colesterol

Esteróis são encontrados em quantidades significativas em membranas celulares, e possuem a importante função de regular a elasticidade das membranas, tendo grande influência sobre a rigidez/fluidez das mesmas. (39) Com a finalidade de trabalhar com um modelo de membrana mais complexo, decidiu-se empregar filmes mistos de fosfolipídios e colesterol e estudar a interação da quitosana com esses filmes. Para tanto, uma caracterização prévia da interação da quitosana com monocamadas puras de colesterol foi realizada.

Na figura 32 são mostradas isotermas π -A para monocamadas de colesterol formadas sobre tampão Theorell-Stenhagen (TS) pH 3 puro, ou contendo diferentes concentrações de quitosana. A curva de colesterol sobre subfase de tampão puro é bastante condensada, com pressão de colapso em torno de 44 mN/m e área mínima de aproximadamente 40 Å²/mol. Essa curva é parecida com a obtida sobre água pura, (142) indicando que a monocamada não é afetada pelos sais do tampão.

O efeito da quitosana sobre monocamadas de colesterol foi parecido com o observado para as monocamadas de fosfolipídios. Com a adição do polímero à subfase, os filmes se tornam mais expandidos, e essa expansão aumenta gradativamente com a concentração. Isso ocorre até 0,300 mg/mL, em que o efeito satura e as curvas passam a ser mais condensadas com concentrações maiores de quitosana. No caso do colesterol, embora a pressão de colapso seja a mesma para os filmes na presença ou ausência de quitosana, a altas pressões de superfície as curvas não coincidem, apontando para a permanência de parte da quitosana incorporada ao filme.



Figura 32 - Isotermas de π -A para monocamadas de colesterol sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura)

Curiosamente, a concentração de saturação nesses experimentos é 3 vezes maior que aquela de trabalho anterior de nosso grupo com monocamadas de colesterol. (88) Nesse primeiro trabalho foi usada quitosana com massa molar de 108.700 g/mol, praticamente idêntica à quitosana dos resultados da figura 32. Entretanto, o grau de acetilação e a polidispersividade do polímero usado anteriormente eram, respectivamente, DA = 15% e PDI = 6,2, enquanto o DA e PDI da quitosana empregada agora são de 22% e 4,2.

As diferenças no efeito das duas amostras de quitosana sobre as monocamadas de colesterol sugerem que a ação do polímero é de alguma maneira regulada por suas características químicas. Nesse contexto, o número de grupos amina livre, que está diretamente relacionado com o grau de acetilação, parece desempenhar papel importante. Com o aumento do grau de acetilação diminui-se o número de grupos aminas que podem ser protonados e que participam de interações carga-dipolo. Como conseqüência, é necessário adicionar mais quitosana para interagir com todos os grupos do colesterol susceptíveis à interação, e o efeito sature. Essa necessidade da adição de quantidade maior reflete em uma expansão maior dos filmes. Por exemplo, a isoterma de colesterol para 0,300 mg/mL é muito mais expandida e compressível que a isoterma para 0,100 mg/mL da figura 2 da referência. (88) Provavelmente, isso provém do maior número de cadeias (ou segmentos de cadeias) que penetram na monocamada. Esses resultados demonstram a importância do controle da estrutura química da quitosana para aplicações biológicas.

Em outro trabalho da literatura, Wydro e colaboradores também utilizaram filmes de Langmuir de colesterol como modelo de membrana para estudar interações com quitosana. Os autores observaram que a expansão causada pela quitosana também satura em 0,100 mg/mL. Como a quitosana usada pelos autores tinha DA de 30% (o dobro do DA da quitosana usada em nosso trabalho de 2005 (88)), mas a mesma concentração de saturação foi observada, fica claro que outros fatores atuam em conjunto com as interações carga-dipolo na ação do polímero sobre as membranas. Esses fatores podem ter diversas origens, por exemplo, a massa molar da quitosana ($M_w = 330.000$ g/mol) que é cerca de três vezes no trabalho do grupo polonês. Outras características que provavelmente desempenham papel importante na interação da quitosana com biomembranas são a conformação do polímero em solução, e a ação sinergística das hidroxilas e da cadeia principal do polissacarídeo. (143)

Na figura 33 são mostradas curvas de elasticidade no plano calculadas a partir das isotermas π -A da figura 32. Assim como para os filmes de DMPA, os filmes contendo qualquer quantidade de quitosana têm elasticidade menor que o filme de colesterol puro, para qualquer valor de π . Os filmes mistos com quitosana são líquido-expandidos ao longo de toda a compressão, de acordo com a classificação de Davies and Rideal. (98) Essa grande diminuição da elasticidade, bem como a enorme expansão no gráfico anterior, também são maiores do que relatado na literatura. (90, 91) Isso fortalece a hipótese de que uma maior quantidade de quitosana adsorveu e foi incorporada ao filme nesses experimentos.



Figura 33 - Cs⁻¹ para monocamadas de colesterol sobre subfase de Tampão TS pH 3,0 contendo quitosana em diversas concentrações (indicadas no encarte da figura).

Os filmes sobre subfase contendo 0,400 e 0,500 mg/mL de quitosana têm elasticidade maior que o filme sobre subfase com 0,300 mg/mL, para a maioria dos valores de pressão. Isso indica que, juntamente com a reversão do efeito de expansão das isotermas, também ocorre inversão no perfil de diminuição da elasticidade no plano. Ou seja, a concentração de

saturação de 0,300 mg/mL também é válida para a elasticidade. Essa igualdade das duas concentrações de saturação fica evidente na figura 34, na qual é mostrada a variação da área por molécula e da elasticidade no plano com a concentração de quitosana na subfase, para monocamadas de colesterol na pressão de 30 mN/m. Em alguns casos, como no trabalho de Wydro e colaboradores, (91) esses valores não coincidem. Os autores mostraram que a concentração de saturação para a diminuição elasticidade é de 0,200 mg/mL, mas a concentração de saturação da expansão das isotermas é de 0,100 mg/mL. Mais uma vez é possível constatar que a estrutura química do polímero afeta diretamente suas propriedades.



Figura 34 - Variação da elasticidade no plano e da área por molécula versus concentração de quitosana na subfase para filmes de Langmuir de colesterol na pressão de 30 mN/m.

O potencial de superfície dos filmes também foi afetado pela interação da quitosana com as monocamadas de colesterol (figura 35). O potencial do filme de colesterol puro sobre tampão TS inicia em valor próximo a 0 V, e começa a aumentar a partir da área de 68 Å²/mol. Após uma subida com inclinação constante, a curva atinge o máximo de 0,35 V em uma área de aproximadamente 33 Å²/mol. Esse perfil é parecido com a curva de potencial do filme de colesterol sobre água. (144)

Para o filme sobre subfase contendo a menor concentração de quitosana, 0,050 mg/mL, o potencial inicial (ΔV_i) também é nulo, mas o valor máximo é 50 mV maior que para o filme de colesterol puro. Embora o formato da curva seja praticamente o mesmo, para o filme sobre quitosana o potencial começa aumentar praticamente no início da compressão, o que faz com que a curva toda seja expandida. Com concentrações maiores de quitosana ocorre um aumento gradativo de ΔV_i , até a saturação em 0,300 mg/mL; e para as concentrações de 0,400 e 0,500 mg/mL ΔV_i é menor. Esse perfil de ΔV_i , que pode ser visto no gráfico da figura

36, reflete o grau de incorporação da quitosana ao filme. Ao final da compressão, os potenciais para todos os filmes mistos contendo quitosana praticamente coincidem, indicando a expulsão de uma parte do polímero da interface. Entretanto, a diferença entre o sinal máximo dessas curvas e o sinal máximo da curva de colesterol puro indica que a quitosana ainda está incorporada aos filmes, contribuindo para o potencial ou afetando a nanoestruturação das moléculas de colesterol, o que está de acordo com as curvas de π -A.

De modo geral, conclui-se que a quitosana afeta as monocamadas de colesterol da mesma maneira que afeta as monocamadas de fosfolipídios: tornando-as mais expandidas e menos elásticas.



Figura 35 - Isotermas de potencial de superfície para monocamadas de colesterol formadas sobre subfase de tampão TS pH 3,0 contendo diferentes concentrações de quitosana (indicadas no encarte da figura).



Figura 36 - Potencial de superficie inicial (ΔV_i) das curvas na figura 35 *versus* concentração de quitosana na subfase.

4.4 Interação de quitosana com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos DMPA-colesterol

Após estudar a interação de quitosana com filmes puros de DMPA (capítulo 4.2) e filmes puros de colesterol (capítulo 4.3), passamos a estudar a interação de quitosana com filmes de Langmuir e LB mistos DMPA-colesterol. Inicialmente, as membranas mistas formadas sobre tampão puro foram caracterizadas com relação à miscibilidade dos materiais por curvas de pressão e potencial de superficie. O efeito da quitosana sobre essas membranas foi então avaliado pelas mesmas técnicas, e um comportamento bastante peculiar foi observado, como será mostrado. O estudo das interações no filme misto DMPA-colesterol foi conduzido principalmente com técnicas de espectroscopia vibracional de PM-IRRAS e SFG, que fornecem informações sobre grupos específicos e sua organização na membrana. Como os princípios físicos de funcionamento dessas técnicas são distintos, informações complementares podem ser obtidas. Para efeito de comparação, filmes monocomponentes de DMPA ou colesterol interagindo com quitosana também foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas, e os resultados são detalhados neste capítulo.

4.4.1 Propriedades das membranas mistas e efeito da quitosana

Na figura 37 são mostradas isotermas π -A para filmes de colesterol e DMPA puros, e para filmes mistos dos dois materiais em diferentes proporções molares. A curva para o filme de DMPA puro no tampão TS pH 3,0 tem área mínima em torno de 60 Å²/mol, ao contrário da isoterma da figura 23 para a monocamada sobre HCl pH 3,0, que tem área mínima em torno de 45 Å²/mol. Essa expansão do filme se deve provavelmente aos contra-íons do tampão, que se acumulam na região adjacente às cabeças polares do fosfolipídio, aumentando a repulsão. (145, 146) A isoterma de colesterol, por sua vez, praticamente não é alterada pelo tampão, como visto no capítulo 4.3. As curvas para os filmes mistos com diferentes proporções de colesterol e DMPA estão compreendidas em valores de área por molécula intermediários àqueles observados para os filmes puros, como esperado. Contudo, existem evidências da formação de misturas não-ideais entre os dois compostos, o que será discutido adiante.



Figura 37 - Isotermas π -A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3. A área por molécula foi calculada com a massa molar de cada componente ponderada pela quantidade dos mesmos na mistura.

As isotermas de Δ V-A da figura 38 mostram que em um estado de alta compactação dos filmes (baixos valores de área por molécula) o sinal de potencial de superfície é aproximadamente o mesmo para todos os filmes mistos, independentemente da proporção DMPA:colesterol. O valor atingido, entre 0,45 e 0,50 V, é o mesmo alcançado pela monocamada pura de DMPA, o que demonstra que são as moléculas de fosfolipídio que governam as propriedades elétricas do filme compacto. Além disso, o sinal inicial (ΔV_i) nulo e o sinal final menor (em torno de 0,30 V) para o filme puro de colesterol comprovam que a contribuição das moléculas de colesterol para o potencial é menos significativa. O alto valor de ΔV_i para o filme puro de DMPA se deve à protonação parcial, ou complexação com os contra-íons do tampão, dos grupos ácidos fosfatídicos no pH utilizado (pH = 3), o que elimina o efeito negativo da dupla camada elétrica. O sinal de ΔV_i é dependente da composição do filme, e diminui com o aumento gradual da quantidade de colesterol. Essa diminuição pode ser atribuída simplesmente à diluição das moléculas de DMPA com moléculas de colesterol. É importante salientar que no início da compressão o sinal de potencial é determinado majoritariamente pela contribuição das cabeças polares, ao contrário dos altos estágios de compactação, nos quais a contribuição da região apolar das membranas também é importante. Por esse motivo, a diluição mencionada acima afeta significativamente o ΔV_i e não afeta tanto o sinal final.



Figura 38 - Isotermas ΔV-A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3.

Segundo o método proposto por Goodrich, (147) uma mistura ideal num filme de Langmuir deve respeitar a regra de adição, de acordo com a qual a área por molécula de uma monocamada mista (A₁₂) pode ser calculada pela proporção em mol de cada componente através da equação 16:

$$A_{12} = X_1 A_1 + X_2 A_2 \tag{16}$$

 A_1 e A_2 são as áreas por molécula de cada composto em uma monocamada pura (para uma determinada pressão de superfície), e X_1 e X_2 são as frações molares de cada componente na mistura. Se os valores de área medidos para as monocamadas mistas concordam com os valores calculados pela equação 16, os materiais formam uma mistura ideal, sem interações repulsivas ou atrativas entre os componentes.

Na figura 39A pode ser visto que, para baixos valores de pressão de superfície, no caso 5 mN/m, ocorre um desvio negativo da idealidade. Esse comportamento indica um efeito de condensação induzido pelo colesterol sobre os filmes de DMPA, com uma energia livre da mistura (ΔG_{mix}) negativa, a qual torna a monocamada mais estável. (148, 149) Esses resultados são consistentes com dados da literatura, pois um efeito de condensação é geralmente atribuído ao colesterol, que reduz a mobilidade das cadeias hidrocarbônicas de fosfolipídios. (150) Isso ocorre através da interação do esterol em forças de Van der Waals com as cadeias alquílicas dos fosfolipídios, o que limita movimentos cooperativos das

102

mesmas e aumenta a ordem orientacional, conseqüentemente reduzindo sua mobilidade. O fenômeno é bem conhecido para lipídios que têm cabeças polares constituídas de colina (150-152) e etanolamina. (142)



Figura 39 - Variação da área por molécula medida (retirada da figura 37) e calculada (pela equação 16) com a proporção de DMPA nos filmes mistos DMPA-colesterol: [A] $\pi = 5$ mN/m, e; [B] $\pi = 30$ mN/m.

O comportamento das áreas médias para os filmes mistos a altas pressões de superficie (30 mN/m) mostra um inesperado desvio positivo da idealidade (figura 39B), com ΔG_{mix} positivo, indicando um efeito de expansão causado pelo colesterol. Ainda que pouco comum, essa expansão já foi observada por alguns autores. (142, 146, 153-156) Gómez-Serranillos e colaboradores, (153) e Wu e colaboradores (154) afirmam que a repulsão de grupos carregados é aumentada pela presença de colesterol, e alguma expansão pode acontecer em decorrência disso. Korchowiec e colaboradores (156) mostraram que o colesterol pode expandir inclusive monocamadas de fosfolipídios zwiteriônicos se a proporção de colesterol nas misturas for maior que 50%. Da mesma forma, a expansão em nossos resultados para estados de compactação da monocamada correspondentes ao de uma biomembrana real (30 mN/m) (68) pode ser explicada em termos do aumento da repulsão entre as moléculas de DMPA, causado pelo aumento da dissociação dos grupos fosfato na presença de colesterol.

Os filmes mistos DMPA-colesterol sobre uma subfase contendo quitosana também foram estudados por curvas de π -A e Δ V-A, e os resultados são mostrados nas figuras 40 e 41, respectivamente. A concentração de quitosana na subfase foi de 0,200 mg/mL, que é a concentração de saturação para o DMPA.



Figura 40 - Isotermas π -A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A porcentagem de DMPA é mostrada no encarte da figura.



Figura 41 - Isotermas ΔV-A para filmes mistos DMPA-colesterol com várias proporções, sobre subfase de tampão TS pH 3 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A porcentagem de DMPA é mostrada no encarte da figura.

Surpreendentemente, as monocamadas mistas são expandidas pela interação com quitosana sempre da mesma maneira, independentemente da proporção da mistura. Essa expansão é idêntica àquela observada para o filme de DMPA puro, como mostrado na figura 40. Como as moléculas de colesterol interagindo com quitosana ocupam áreas por molécula menores que as moléculas de DMPA (ver isoterma de colesterol puro na mesma figura), era esperado que filmes com maior porcentagem de colesterol fossem menos expandidos. Contudo, nos filmes mistos interagindo com quitosana, ambos os lipídios ocupam a mesma área por molécula.

À primeira vista, esse comportamento sugere um papel inerte do colesterol na interação da quitosana com membranas mistas, com o efeito sendo totalmente dirigido pelas interações eletrostáticas DMPA-quitosana. Entretanto, o perfil das isotermas dos filmes mistos interagindo com quitosana só pode ser explicado se o colesterol possui um dos seguintes papéis: i) controle da extensão da expansão do DMPA; ii) preenchimento de áreas maiores, através de mudanças de orientação, dependendo da proporção do filme, ou; iii) regulagem do grau de penetração da quitosana nas monocamadas.

Nos resultados das figuras 39A e 39B, observa-se que de fato o colesterol controla a área ocupada pelas moléculas de DMPA, fazendo com que ela seja menor a baixas pressões (condensação) e maior a altas pressões (expansão). Porém, pressupondo que o esterol desempenha esse mesmo papel nos filmes mistos interagindo com quitosana, o comportamento da figura 40 não pode ser explicado pela primeira hipótese, pois a curva

reflete um mesmo efeito (expansão) para todos os regimes de pressão. A hipótese ii) também pode ser descartada, visto que a reorientação do colesterol necessária para o "ajuste" da área por molécula seria muito grande, e pouco provável, pois não é vista nem nos filme de DMPA+colesterol na ausência de quitosana, e nem nos filmes puros de colesterol interagindo com o polímero. De fato, os dados de espectroscopia apresentados posteriormente neste capítulo mostram que não ocorre reorientação das moléculas de colesterol.

Como a penetração da quitosana em monocamadas de DMPA foi comprovada pelas medidas de caracterização no capítulo 4.2, acredita-se que o papel do colesterol está relacionado com aquele proposto na terceira hipótese. Ou seja, as moléculas de colesterol regulam a extensão da penetração da quitosana no filme. Acredita-se que esse efeito combinado com as fortes interações eletrostáticas entre os grupos PO_4^- do fosfolipídio e os grupos NH_3^+ da quitosana, as quais ocorrem em número limitado para uma concentração fixa de polímero, são os responsáveis pelo perfil das curvas da figura 40.

A principal informação fornecida pelos resultados de potencial de superfície da figura 41 é de que a introdução de colesterol ao filme de DMPA não altera a orientação e nem o grau de dissociação das moléculas de fosfolipídios. Essas duas variações causariam a modificação das isotermas de potencial, o que não foi observado. As curvas Δ V-A dos filmes mistos com qualquer proporção são idênticas às curvas do filme puro de DMPA sobre quitosana. Esse comportamento das isotermas é condizente com a penetração da quitosana em diferentes quantidades na região hidrofóbica das monocamadas (pois as cadeias que penetram têm orientação aleatória), associado ao número fixo de grupos carregados interagindo com a parte polar das membranas. Portanto, o perfil das curvas de potencial fortalece a hipótese iii) acima, de que a penetração da quitosana é modulada pelas moléculas de colesterol.

4.4.2 Caracterização espectroscópica dos filmes mistos DMPA-colesterol+quitosana

4.4.2.1 PM-IRRAS

Filmes de Langmuir puros de DMPA

Inicialmente, os filmes de Langmuir puros de DMPA e colesterol foram caracterizados pela técnica de PM-IRRAS. Os espectros foram obtidos para o intervalo de número de ondas de 500 a 4000 cm⁻¹, mas somente as regiões nas quais existiam bandas de interesse serão mostradas. Para os filmes sobre subfase contendo quitosana, a concentração do polímero em todos os experimentos foi 0,200 mg/mL. Em todas as medidas foi usado tampão Teorell-Stenhagen (TS) como subfase. No caso das membranas mistas (inclusive nas medidas de SFG da seção 4.4.2.2) foi usada a proporção de DMPA:colesterol de 1:1 em mol para todos os filmes.

Na figura 42A são mostrados espectros na região das vibrações das ligações C-H das cadeias alquílicas, a diferentes pressões de superfície. Duas bandas intensas aparecem com máximo em 2911-2918 cm⁻¹ e 2841-2848 cm⁻¹, atribuídas aos estiramentos assimétrico $v_{ass}(CH_2)$ e simétrico $v_s(CH_2)$ das ligações do grupo metileno, respectivamente. Associado à banda $v_{ass}(CH_2)$ pode ser visto um pequeno "ombro" com máximo em 2890 cm⁻¹, referente ao estiramento simétrico do grupo metileno $v_s(CH_3)$. A posição dessas bandas para DMPA está de acordo com a literatura, (157) e sua intensidade aumenta com a pressão de superfície devido ao aumento da densidade do filme, como ilustrado para a banda $v_s(CH_2)$ na figura 42B. O máximo da banda de $v_{ass}(CH_2)$ se desloca de 2918 cm⁻¹ para o filme no estado gasoso para 2911 cm⁻¹ na pressão de 40 mN/m. Essa alteração no espectro reflete o aumento da ordem, e consequentemente do número de confôrmeros *trans* ao longo da cadeia hidrofóbica. (158)


Figura 42 - [A] Região entre 2800 e 2950 cm⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura). [B] variação do máximo da banda da vibração υ_s(CH₂) com a pressão de superfície.

Outra região do espectro, na qual é vista a banda referente à vibração assimétrica das ligações P=O das cabeças polares v_{ass} (P=O), é mostrada na figura 43. Essa banda é ligeiramente mais larga que as bandas de C-H, e está centrada em 1226 cm⁻¹ para todas as pressões de superfície. O número de onda em que a banda aparece é aproximadamente o mesmo que aquele para filmes de Langmuir de DPPG (1223 cm⁻¹). (158) Segundo Hübner e colaboradores, (159) o deslocamento dessa banda de valores em torno de 1250 cm⁻¹ para filmes secos, para números de onda em torno de 1230 cm⁻¹ para o filme de Langmuir, demonstra a hidratação e o maior número de ligações de hidrogênio de que o grupo participa com as moléculas de água na interface ar-água. Outro comportamento peculiar dessa banda é

que sua intensidade diminui com o aumento da pressão de superfície. Isso sugere alteração da orientação das cabeças polares durante a compressão, ou o efeito de *screening* (bloqueio), provocado pela mudança do índice de refração da região hidrofóbica do filme com a compressão, o que causa grande desvio da luz refletida nos grupos fosfato parcialmente imersos na água.



Figura 43 - Região entre 1200 e 1240 cm⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0, medido a várias pressões de superfície (indicadas no encarte da figura).

Filmes de Langmuir de DMPA+quitosana

O espectro para filmes de DMPA sobre subfase contendo quitosana na região das ligações CH é mostrado na figura 44. As mesmas bandas de estiramento simétrico $v_s(CH_2)$ e assimétrico $v_{ass}(CH_2)$ do grupo metileno, e de estiramento simétrico $v_s(CH_3)$ do grupo metil do fosfolipídio, podem ser vistas. Há grande diminuição da intensidade da banda de $v_{ass}(CH_2)$ em relação à banda de $v_s(CH_2)$, que se deve provavelmente ao alargamento da mesma. Entretanto, uma análise mais precisa desse efeito é dificultada pela superposição com a banda de $v_s(CH_3)$.

Comparativamente ao filme puro de fosfolipídio, da figura 42A, existem duas principais alterações no espectro que indicam aumento da ordem das cadeias lipídicas decorrentes da interação com a quitosana: i) a banda de $v_{ass}(CH_2)$, em 2915 cm⁻¹ para a pressão de 0 mN/m sofre grande deslocamento com a compressão, e desloca-se para 2908 cm⁻¹ para $\pi = 40$ mN/m. (158) Tanto o valor a baixas pressões, quanto o valor na pressão de 40 mN/m, são deslocados em 3 cm⁻¹ para menores números de onda na presença de quitosana, comparado com o filme de DMPA puro; ii) a banda de $v_s(CH_3)$ para o filme com quitosana, em 2892 cm⁻¹, é bem mais evidente que no espectro do filme de lipídio puro e tem intensidade relativa comparável à intensidade da banda de $v_{ass}(CH_2)$. O aumento do sinal dessa banda com a compressão do filme já foi descrito na literatura para filmes do fosfolipídio dipalmitoil fosfatidil serina (DPPS). (160) Esses indicativos de aumento da ordem com a introdução de quitosana corroboram os dados de potencial de superfície para filmes de Langmuir e de SFG para filmes LB do sistema DMPA+quitosana, mostrados no capítulo 4.2.



Figura 44 - Região entre 2800 e 2950 cm⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana, medido a várias pressões de superficie (indicadas no encarte da figura).

Para a região do espectro que compreende a banda de estiramento assimétrico do grupo $v_{ass}(P=O)$ na figura 45, observa-se para $\pi = 0$ mN/m uma banda em 1227 cm⁻¹, aproximadamente o mesmo número de onda medido para o filme puro de DMPA. A intensidade dessa banda também diminui com a compressão, novamente indicando reorganização das cabeças polares, ou o aparecimento do efeito de "screening". Entretanto, para o filme sobre subfase contendo quitosana, a pressões mais altas, o máximo da banda se desloca de 1227 para 1224 cm⁻¹ e a banda se alarga muito, parecendo se dividir em duas. Mendelsohn e colaboradores (161) afirmam que a banda de $v_{ass}(P=O)$ em 1225 cm⁻¹ indica que o grupo fosfato está di-hidratado, e o deslocamento dessa banda para valores em torno de 1238 cm⁻¹ indica que esse grupo se encontra monohidratado. Como a banda adicional nas pressões de 30 e 40 mN/m aparece em 1234 cm⁻¹, supõe-se que a interação com a quitosana causou a desidratação da cabeça polar do fosfolipídio. Obviamente, essa desidratação ocorre pelas fortes interações eletrostáticas dos grupos amina da quitosana com o grupo fosfato, as quais são amplificadas com a compactação do filme. Além disso, há maior concentração de quitosana na região hidrofílica da membrana para o filme compacto, devido à expulsão parcial do polímero do interior do filme.



Figura 45 - Região entre 1210 e 1240 cm⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana, medido a várias pressões de superficie (indicadas no encarte da figura).

A presença da quitosana na interface pôde ser comprovada pelo aparecimento de duas bandas de amina entre 1520 e 1570 cm⁻¹ (figura 46), centradas em 1535 e 1556-1560 cm⁻¹. A primeira banda, em 1535 cm⁻¹, é atribuída à torção simétrica da ligação N-H dos grupos amina protonados (NH₃⁺) da quitosana. (162) A segunda banda, em 1560 cm⁻¹ para o filme na fase gasosa, pode ser atribuída à vibração amida II (-NH-CO-) dos grupos acetilados da quitosana. (163) Contudo, alguns autores observaram que a banda de NH₃⁺ da quitosana, originalmente em 1535 cm⁻¹, pode ser deslocada para 1557-1558 cm⁻¹ quando o polímero interage com grupos carboxilatos de surfactantes (164) ou com o grupo fosfato de fosfolipídios. (165) Como há poucos grupos acetilados de quitosana, pois o grau de acetilação é 22%, acredita-se que a banda em 1560 cm⁻¹ é uma combinação das bandas de amida II com a banda de NH₃⁺ que participam de interação com o grupo fosfato, com predominância da segunda.



Figura 46 - Região entre 1520 e 1570 cm⁻¹ do espectro de PM-IRRAS de um filme de Langmuir de DMPA sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana, medido a várias pressões de superficie (indicadas no encarte da figura).

As bandas do grupo amina ficam mais intensas com a compressão do filme de DMPA+quitosana até que a pressão de 20 mN/m é atingida, e para pressões maiores o sinal da banda diminui. Esse comportamento poderia ser provocado pela reorganização das cadeias da quitosana, induzida pelo alto empacotamento da monocamada (acima de 20 mN/m). Entretanto, essa diminuição do sinal para estágios de compactação mais altos provavelmente está relacionada à expulsão de parte do polímero do filme, que foi inferida pelas isotermas de pressão de superfície do capítulo 4.2. Outra alteração nos espectros obtidos para o filme em estágios de alta compactação é o deslocamento da banda de NH₃⁺/amida II de 1560 cm⁻¹ para 1556 cm⁻¹ a partir da pressão de 15 mN/m. Esse deslocamento reflete a maior interação eletrostática entre o grupo amina e as cabeças polares dos fosfolipídio a pressões altas, que também foi detectada pela banda do fosfato nas pressões de 30 e 40 mN/m (figura 45 e discussões).

Filmes de Langmuir de colesterol e colesterol+quitosana

Foi mostrado no capítulo 4.3 que a quitosana na subfase expande monocamadas puras de colesterol, até a concentração de saturação de 0,300 mg/mL. Entretanto, como as medidas de PM-IRRAS para o filme puro de colesterol foram feitas para servir de subsídio para a análise dos resultados de filmes mistos DMPA-colesterol, a concentração de quitosana usada foi a concentração de saturação do DMPA (0,200 mg/mL). Na figura 47 são mostrados os espectros na região entre 2875 e 2975 cm⁻¹ para monocamadas de colesterol na ausência e na presença de quitosana na subfase, ambos obtidos na pressão de 30 mN/m. Os dois espectros são muitos semelhantes, indicando que a quitosana não modifica substancialmente a ordenação das moléculas de colesterol no filme. São vistas as bandas de estiramento simétrico do grupo CH₂, em 2930 cm⁻¹, que aparece superposta com a banda do estiramento assimétrico do grupo CH₃, em 2946 cm⁻¹. Em geral, as bandas são mais largas e um pouco deslocadas com relação à posição em que são observadas em filmes sólidos ou em bicamadas lipídicas, (166, 167) devido à disposição das moléculas na interface ar-água.



Figura 47 - Espectro de PM-IRRAS na região entre 2875 e 2975 cm⁻¹ para um filme de Langmuir de colesterol sobre tampão TS pH 3,0 puro (curva preta) ou contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida (curva vermelha). Pressão de superfície de 30 mN/m.

Para o filme de colesterol puro, nenhuma banda aparece entre 1500 e 1600 cm⁻¹, como esperado. A figura 48A mostra que com a adição de quitosana à subfase, a banda de torção simétrica da ligação N-H dos grupos amina protonados (NH_3^+) e a banda de amida II (- NH_3^+) e a

CO-) são vistas em 1527-1530 cm⁻¹ e 1568 cm⁻¹, respectivamente. Essas bandas têm sua intensidade diminuída com a compressão, como ilustrado para a banda de NH₃⁺ na figura 48B. Essa diminuição confirma que o polímero também é expulso das membranas de colesterol com a compactação do filme, mas ainda está presente na pressão de 40 mN/m. O aparecimento da banda de amina protonada em menores número de onda (1527-1530 cm⁻¹), com relação à banda para o sistema DMPA+quitosana (1535 cm⁻¹), indica que a interação da quitosana com colesterol é mais fraca que sua interação com DMPA. Essa banda também apresenta ligeiro deslocamento e alargamento com o aumento da pressão, o que também é conseqüência da expulsão do polímero da interface.

Ao contrário da banda de NH_3^+ , a banda de amida II da quitosana na presença de colesterol está centrada em um número de onda mais alto (1568 cm⁻¹) do que observado para o polímero interagindo com DMPA (1556-1560 cm⁻¹). Neste caso, acredita-se que essa banda é puramente de amida II por dois motivos: i) O deslocamento da banda de NH_3^+ após interação com grupos polares, observado por Grant e colaboradores, (164, 165) ocorre no máximo até números de onda de 1957-1558 cm⁻¹; ii) a molécula de colesterol possui apenas uma hidroxila como grupo polar, e esta se encontra "diluída" pelos anéis fundidos da estrutura, o que diminui substancialmente o número e a força das ligações polares com o grupo NH_3^+ da quitosana.



Figura 48 - [A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 1500 e 1600 cm⁻¹ para um filme de Langmuir de colesterol sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção da banda em 1527-1530 cm⁻¹ (NH₃⁺) com a pressão do filme.

Filmes de Langmuir de DMPA-colesterol

Para o sistema misto DMPA-colesterol, na região das vibrações das ligações C-H, as bandas de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos metileno das cadeias alquílicas de DMPA são muito intensas e aparecem em 2850 e 2920 cm⁻¹, respectivamente (figura 49A). A

intensidade dessas bandas aumenta com a compressão, como mostrado na figura 49B para a banda de v_{ass} (CH₂). O máximo desta banda se desloca de 2920 para 2917 cm⁻¹, refletindo o aumento da ordem induzido pela compressão. Para baixas pressões, a banda de v_s (CH₃) em 2889 cm⁻¹ pode ser vista como "ombro" muito sutil. Entretanto, para o filme na pressão de 40 mN/m essa banda desaparece. Como a banda de v_s (CH₃) é indicativa de ordem das cadeias de fosfolipídio, pode-se dizer que o filme de DMPA-colesterol é menos compacto que o filme de DMPA puro, para o qual o sinal era mais evidente (ver figura 42). Esta constatação das medidas de PM-IRRAS está de acordo com a expansão a altas pressões, mostrada nos gráficos de área ideal (calculada) e área medida da figura 39B. A presença de colesterol, embora não contribua significantemente para o sinal de v_s (CH₃), pode ser atestada pela pequena banda de v_{ass} (CH₃) em 2950 cm⁻¹.



Figura 49 - [A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 2800 e 3000 cm⁻¹ para um filme de Langmuir misto de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 puro. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção da banda em 2917-2920 cm⁻¹ (v_{ass}(CH₂)) com a pressão do filme.

A banda de fosfato da monocamada mista DMPA-colesterol na fase gasosa está centrada em 1221 cm⁻¹, e com a compressão do filme a 40mN/m ela passa para 1223 cm⁻¹ (figura 50A). Ambos os valores são menores que para o DMPA puro, que era 1226 cm⁻¹, o que indica um pequeno aumento da hidratação (161) decorrente da maior ionização e distanciamento das cadeias de DMPA promovidos pelo colesterol. Um comportamento semelhante foi descrito por Bin e colaboradores para DMPC, (168) que relataram que o colesterol, além de causar a ionização, também aumenta a densidade de defeitos gauche nas

cadeias de DMPC, o que é consistente com a expansão provocada. No caso da membrana mista, a banda de v_{ass} (P=O) também diminui com a compressão (figura 50B), mostrando o mesmo efeito de reorientação ou *screening* observado para o DMPA puro.



Figura 50 - [A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 1200 e 1240 cm⁻¹ para um filme de Langmuir misto de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 puro. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção da banda em 1221-1223 cm⁻¹ (v_{ass}(P=O)) com a pressão do filme.

Filmes de Langmuir de DMPA-colesterol+quitosana

A região entre 2800 e 3000 cm⁻¹ do espectro de PM-IRRAS para o filme misto DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre subfase contendo 0,200 mg/mL de quitosana, na pressão de 30 mN/m, é mostrada na figura 51. Para efeito de comparação, o espectro da monocamada mista na ausência de quitosana (no mesmo valor de π) também é mostrado. A interação da quitosana com a monocamada mista faz com que as bandas de $v_s(CH_3)$ e $v_{ass}(CH_3)$, respectivamente em 2882 e 2958 cm⁻¹, se tornem mais evidentes, indicando que as moléculas de fosfolipídio estão mais ordenadas após a interação com o polímero. Como discutido acima, a adição de colesterol faz com que as moléculas de DMPA fiquem menos orientadas para uma determinada pressão de superfície, confirmando o que havia sido observado pelas isotermas de π -A e pelos valores de área por molécula. A quitosana, entretanto, tem um efeito contrário ao do colesterol, induzindo ordem ao filme de DMPA (capítulo 4.2). O gráfico da figura 51 demonstra que, embora ambos os efeitos atuem simultânea e competitivamente, a ação da quitosana prevalece, tornando o filme mais ordenado.



Figura 51 - Espectro de PM-IRRAS na região entre 2800 e 3000 cm⁻¹ para um filme de Langmuir de DMPAcolesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 puro (curva preta) ou contendo 0,200 mg/mL de quitosana dissolvida (curva vermelha). Pressão de superfície de 30 mN/m.

Para o espectro na região do grupo fosfato na figura 52, o filme misto na presença de quitosana apresenta a banda de $v_{ass}(P=O)$ em 1225 cm⁻¹ na pressão de 30 mN/m. Esse valor é apenas 2 cm⁻¹ maior que aquele visto para o filme DMPA-colesterol antes da interação com o

polímero, que também é mostrado no gráfico. Na pressão de 30 mN/m, a banda para o filme de DMPA puro estava originalmente em 1226 cm⁻¹ (figura 43), e com a adição de colesterol passou para 1223 cm⁻¹, indicando que a hidratação desses grupos havia aumentado. Concluise que a interação com quitosana faz com que as cabeças polares do DMPA recuperem aproximadamente o mesmo estágio inicial, em termos de sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com a água. Esse perfil de comportamento, com a quitosana agindo no sentido contrário à ação do colesterol sobre as moléculas de fosfolipídio, é o mesmo discutido em parágrafo anterior para a orientação das cadeias, inferido pela variação da intensidade das bandas de CH₃.



Figura 52 - Espectro de PM-IRRAS na região entre 1200 e 1240 cm⁻¹ para um filme de Langmuir misto de DMPA-colesterol (1:1 em mol) sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. Ambos os espectros foram medidos na pressão de 30 mN/m e tiveram sua intensidade normalizada.

As bandas referentes às vibrações da ligação N-H dos grupos amina e acetamido da quitosana podem ser vistas na região entre 1500 e 1600 cm⁻¹, mostrada na figura 53A. No caso do filme misto DMPA-colesterol+quitosana, a banda do grupo NH_3^+ aparece em 1520 cm⁻¹, ou seja, bastante deslocada em relação a sua posição em todos os outros sistemas contendo quitosana (em torno de 1535 cm⁻¹). Esse deslocamento é causado provavelmente pelas diferentes interações de que o grupo NH_3^+ participa na membrana mista. A banda de amida II, por sua vez, está centrada em 1560, mesmo número de onda observado para o filme puro de fosfolipídio.

Como mostrado na figura 53B, a intensidade das bandas varia de maneira diferente com a compressão. Enquanto a intensidade da banda de amida II aumenta linearmente com o

aumento da pressão do filme, a intensidade da banda de NH_3^+ atinge seu máximo na pressão de 15 mN/m, sofrendo uma queda para a pressão de 20 mN/m e passando a aumentar novamente após esse valor. Para o filme de DMPA+quitosana foi observado um comportamento parecido, com a intensidade máxima da banda de NH_3^+ sendo atingida também em 15 mN/m. Entretanto, naquele caso para pressões maiores foi observada diminuição constante do sinal. É possível especular que para o filme misto DMPA-colesterol, o grupo NH_3^+ da quitosana sofre reorientação abrupta na pressão de 15 mN/m, o que não ocorre com os grupos acetamido. Curiosamente, o aumento de ambas as bandas sugere que a quitosana permanece incorporada à monocamada mista em uma quantidade praticamente constante, pois o sinal aumenta com a compressão. Esse fato não foi observado para os filmes puros de DMPA e colesterol.



Figura 53 - [A] Espectro de PM-IRRAS na região entre 1500 e 1600 cm⁻¹ para um filme de Langmuir de DMPA-colesterol sobre tampão TS pH 3,0 contendo 0,200 mg/mL de quitosana. A pressão de superfície na qual cada curva foi obtida é mostrada no encarte da figura. [B] Variação do máximo de absorção das bandas em 1520 e 1560 cm⁻¹ (NH₃⁺ e amida II, respectivamente) com a pressão do filme.

Resumo dos resultados de PM-IRRAS

Os resultados de PM-IRRAS para as monocamadas de DMPA, colesterol e DMPAcolesterol, interagindo ou não com quitosana, são sumarizados na tabela 6. São dados os valores de número de onda nos quais as bandas estão centradas. Comentários quanto ao formato e intensidade das bandas, ou seu perfil de alteração com a compressão, são fornecidos para algumas vibrações no corpo da tabela ou no rodapé da mesma. Objetiva-se com esse resumo facilitar o entendimento das principais alterações nos espectros causadas pelas mudanças dos componentes do sistema e por suas interações.

Com relação à ordem, é possível analisar comparativamente a posição em que aparece a banda de $v_s(CH_2)$. Tomando por base a faixa de números de onda em que essa banda aparece para o DMPA, observa-se deslocamento para maiores números de onda com a interação com colesterol (DMPA-col), e para menores números de onda após a interação com quitosana (DMPA+qui). Além disso, a banda de $v_s(CH_3)$, que era um ombro no espectro de DMPA puro, praticamente desaparece quando colesterol é co-espalhado na interface. Entretanto, com a interação de DMPA com quitosana essa banda se torna mais evidente do que era no filme do fosfolipídio puro. As alterações em ambas as bandas refletem a expansão (diminuição da ordem) causada pelo colesterol sobre as moléculas de DMPA, e o aumento da orientação induzida pela quitosana ao fosfolipídio. (158, 167)

Também é possível observar na tabela que as bandas referentes ao grupo amina e amida da quitosana aparecem em todas as monocamadas de Langmuir formadas sobre subfase contendo quitosana, indicando a incorporação do polímero aos filmes. Para a monocamada pura de colesterol, a intensidade das bandas decresce desde o início da compressão indicando a depleção do polímero da interface. Tanto para a monocamada pura de DMPA quanto para o filme misto DMPA-colesterol, a banda dos grupos amina protonados (~1520-1535 cm⁻¹) sofre mudança de comportamento para pressões de superfície em torno de 15 a 20 mN/m. Para o filme de DMPA puro essa banda tinha a intensidade crescente, mas que passa a diminuir, mostrando que nesse caso o polímero também é parcialmente expulso. Para o filme misto DMPA-colesterol, a banda em geral é crescente, mas sofre queda de intensidade abrupta nessa faixa de pressão, apontando para algum fenômeno de reorientação do polímero na interface.

As alterações nos sinais das bandas de $v_{ass}(PO_2)$ e $\delta_s(NH_3^+)$, somente para o filme DMPA+quitosana, são prova direta de que os sistemas têm suas propriedades governadas pelas interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ e o grupo PO_2^- . Ambas as bandas são afetadas pela compressão do filme e sofrem alterações significativas somente para o filme em estágio de compactação alto (superior a 15 mN/m). O máximo das duas bandas se desloca para menores números de onda com a compressão e, além disso, a banda de $v_{ass}(PO_2)$ parece se dividir em duas e a banda de $\delta_s(NH_3^+)$ fica menos intensa no filme compacto.

Materiais	$v_{ass}(CH_3)$	$\upsilon_{ass}(CH_2)$	$v_s(CH_3)$	$\upsilon_s(CH_2)$	(-NH-CO-)	$\delta_{s}(NH_{3}^{+})$	$v_{ass}(PO_2)$
					amida II		
DMPA	-	2911-2918 ^a ←	2890 ^b	$2841\text{-}2848^{\mathrm{a}} \rightarrow$	-	-	1226 ^c
			ombro				
DMPA-col	2950	2917-2920 ^a ←	2889	2850 ^a	-	-	$1221-1223^{c} \rightarrow$
	fraca		muito fraca				
DMPA+qui	-	2908-2915 ^a ←	2892 ^a	2850 ^a	$1556-1560^{d} \leftarrow$	1535 ^d	1224-1227 ^c ←
			intensa				ombro em 1234
col	2946	2930	2890	-	-	-	-
col+qui	2946	2930	2890 ^f	-	1568 ^c	1527-1530 ^c ←	-
DMPA-col+qui	2958	2918	2882	2850	1560 ^a	1520 ^e	1225

Tabela 6 - Valor de máximo das bandas presentes nos espectros de PM-IRRAS (cm⁻¹) de filmes de Langmuir por DMPA, colesterol (col) e quitosana (qui).

^a Intensidade aumenta linearmente com a compressão; ^b Torna-se menos visível com a compressão; ^c Intensidade decresce linearmente com a compressão; ^d Intensidade aumenta até 20 mN/m e depois passa a decrescer; ^e Intensidade aumenta até 15 mN/m, sofre uma queda, mas depois volta a aumentar; ^f Um pouco mais evidente que no filme de colesterol puro. Obs: as setas indicam o sentido do deslocamento do máximo da banda com a compressão, dentro do intervalo indicado.

4.4.2.2 SFG

Medidas de espectroscopia de soma de freqüências (SFG) foram feitas para filmes Langmuir-Blodgett (LB) com 1 camada depositados sobre sílica fundida (grau infravermelho) na pressão de 40 mN/m, usando velocidade do dipper de 5,0 mm/min. Filmes LB puros de DMPA e colesterol ou filmes mistos DMPA-colesterol, DMPA-quitosana, colesterol-quitosana e DMPA-colesterol-quitosana foram produzidos. A razão de transferência foi sempre próxima de 1, o que indica boa qualidade de deposição, com recobrimento total do substrato. Para todos os filmes mistos contendo quitosana a concentração do polímero na subfase foi de 0,200 mg/mL. A massa de material depositada para cada filme, medida por nanogravimetria em QCM, é mostrada na tabela 7.

Tabela 7 - Medidas de nanogravimetria em QCM para monocamadas contendo DMPA, colesterol e quitosana (em diversas combinações) transferidas da interface ar-água para suportes sólidos na pressão de superfície de 40 mN/m.

Materiais	Massa depositada (ng)	Massa de quitosana (ng)
DMPA	109,5	-
DMPA+quitosana	258,2	148,8
DMPA-colesterol	90,1	-
DMPA-	237,5	147,4
colesterol+quitosana		
colesterol	70,0	-
colesterol+quitosana	104,6	34,6

Os valores para filmes de DMPA e DMPA+quitosana já foram descritos no capítulo 4.2. A massa extra adsorvida na presença de quitosana na subfase, 148,8 ng, pode ser atribuída ao polímero transferido para o substrato junto com o DMPA. Fazendo a mesma aproximação para o filme de colesterol+quitosana, uma massa "extra" bem menor foi depositada, apenas 34,6 ng. Credita-se esse fato à interação mais forte do polímero com o fosfolipídio (eletrostática) do que com o esterol (ligações de hidrogênio). Para o filme misto DMPA-colesterol+quitosana, praticamente a mesma quantidade de quitosana foi depositada em comparação com o filme DMPA+quitosana, 147,4 ng contra 148,8 ng, respectivamente. Isso demonstra que a incorporação de colesterol ao filme de DMPA não interfere na

quantidade de quitosana transferida, ou seja, o "carregamento" de moléculas do polímero só depende da quantidade de fosfolipídio na interface. Novamente, o filme misto DMPA-colesterol se comporta como um filme puro de DMPA em relação à interação com a quitosana. A hipótese de que existe um número limitado fixo de ligações entre o polímero e o fosfolipídio também é fortalecida pelos resultados de QCM.

Os espectros de SFG para os filmes LB são mostrados na figura 54. As quatro principais bandas estão centradas em 2840, 2873, 2944 e 2958 cm⁻¹ e são atribuídas, respectivamente, ao estiramento simétrico $v_s(CH_2)$, ao estiramento simétrico $v_s(CH_3)$, à ressonância de Fermi do grupo CH₃, e ao estiramento assimétrico $v_{ass}(CH_3)$. Em medidas adicionais, filmes com a simples imersão dos substratos em soluções de quitosana 0,200 mg/mL não mostraram sinal de SFG na região de vibração das ligações C-H, indicando que a quitosana adsorvida tem orientação aleatória nos filmes. Portanto, as bandas dos espectros são provenientes de grupos químicos de DMPA e colesterol, e qualquer influência dos grupos CH₂ e CH₃ do polímero pode ser descartada.



Figura 54 - Espectros de SFG na região das vibrações das ligações C-H: [A] filmes LB contendo DMPA e/ou colesterol transferidos a partir de filmes de Langmuir sobre subfase de tampão TS sem quitosana; [B] filmes LB contendo DMPA e/ou colesterol transferidos a partir de filmes de Langmuir sobre subfase de tampão TS contendo 0,200 mg/mL de quitosana. Os filmes mistos DMPA-colesterol têm proporção de 1:1 em mol dos compostos.

A análise da intensidade das bandas de estiramento simétrico $v_s(CH_2)$ e $v_s(CH_3)$ em espectros de SFG é uma maneira conveniente de determinar e comparar o grau de orientação das cadeias lipídicas para diferentes sistemas. (169) O $v_s(CH_2)$ das cadeias de fosfolipídios só é ativo em SFG se houver defeitos do tipo "gauche" (dobramentos das cadeias). Por outro lado, a intensidade do estiramento simétrico dos grupos CH₃ aumenta quando as cadeias alquílicas dos fosfolipídios estão alinhadas. Portanto, quanto maior a razão de intensidades $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$ maior é o alinhamento das moléculas do filme, e vice-versa. Os valores $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$ (parâmetro de ordem) calculados a partir das figuras 54A e 54B para os diversos sistemas são dados em um gráfico de barras na figura 55.

Observa-se na figura 54A o aumento da banda do estiramento simétrico de CH_2 , em ~2840 cm⁻¹, para o filme misto DMPA-colesterol em relação ao filme puro de DMPA, com o parâmetro de ordem diminuindo de 6,62 para 4,58 (figura 55). Esse efeito é contrário ao indicado por resultados de SFG da literatura para filmes mistos DPPC-colesterol, que mostram que o colesterol aumenta a ordem das cadeias alquílicas desse fosfolipídio. (150) Enquanto o esterol tem um efeito de condensação sobre filmes de DPPC, devido ao aumento de interações hidrofóbicas das cadeias alquílicas, o efeito sobre DMPA é de expansão, devido às alterações na ionização do grupo fosfato (discutido anteriormente). Assim, as curvas da figura 54A confirmam o que foi proposto na seção 4.4.1.

Para os filmes mistos transferidos a partir de monocamadas sobre subfase contendo quitosana (figura 54B) o efeito do colesterol no espectro de SFG é similar ao provocado na ausência do polímero. A incorporação do esterol diminui o parâmetro de ordem de 12,91 para 5,97 em monocamadas de DMPA depositadas a partir de subfase contendo quitosana. O aumento da ordem de monocamadas puras de DMPA induzido pela interação com quitosana, proposto no capítulo 4.2, também pode ser visualizado na figura 55, pois o parâmetro aumenta de 6,62 para 12,91 com a adição do polímero. O mesmo perfil é observado nos filmes mistos de DMPA-colesterol, que têm parâmetro de ordem de 4,58 na ausência de quitosana e de 5,97 na presença do polímero. Para o filme de colesterol, a adsorção de quitosana provoca alteração desprezível na orientação das cadeias, com $v_s(CH_3)/v_s(CH_2)$ permanecendo em torno de 0,94-0,95. Isso fortalece a hipótese de que as interações eletrostáticas entre a quitosana e DMPA são o principal fator na promoção do alinhamento das cadeias alquílicas das moléculas.



Figura 55 - Razão das intensidades das bandas $\nu(CH_3)/\nu(CH_2)$ nos espectros de SFG da figura 55, representando a ordem das cadeias alquílicas das monocamadas. DMPA = PA; Colesterol = Col e Quitosana = Qui.

De modo geral, a quitosana é capaz de adsorver sobre todas as monocamadas lipídicas estudadas, provocando expansão em todos os casos. A interação eletrostática entre os grupos fosfato e amina, respectivamente de DMPA e quitosana, domina as propriedades dos filmes interfaciais, independentemente da presença de colesterol. O filme misto DMPA-colesterol, em relação ao filme puro de DMPA, tem a ordem reduzida, porque o esterol provoca expansão do filme, proporcionando maior liberdade para as cadeias alquílicas se moverem. Quando a quitosana é incorporada a esses filmes mistos, a ordem conformacional das cadeias hidrofóbicas é novamente recuperada, num efeito parecido com aquele provocado pelo polímero sobre os filmes puros de DMPA.

5 CONCLUSÕES

Filmes puros de DPPC, DPPG, DMPA ou colesterol

A interação do polissacarídeo quitosana com membranas celulares foi estudada neste trabalho utilizando filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) como modelos. Até o início deste estudo, os modelos mais usados eram lipossomos e bicamadas suportadas em substratos sólidos. Portanto, uma caracterização básica em termos dos grupos que interagem e das forças envolvidas foi realizada.

A primeira constatação foi que a quitosana, um polieletrólito solúvel e sem atividade superficial intrínseca em soluções aquosas com pH ácido, migra para a interface ar-água na presença de um filme de lipídio. Este resultado demonstra inequivocamente que o polímero tem afinidade por membranas lipídicas. No caso dos fosfolipídios DPPC e DPPG, observou-se grande diferença no perfil de adsorção. Para o fosfolipídio de carga neutra (DPPC) a quantidade de quitosana adsorvida aumenta com a pressão superficial do filme, e para o lipídio carregado negativamente (DPPG) a adsorção de polímero diminui para monocamadas mais compactas. Esse comportamento foi o primeiro indício de que a interação da quitosana com as membranas é fortemente afetada pela carga da cabeça polar dos fosfolipídios, e que interações hidrofóbicas e eletrostáticas devem atuar concomitantemente.

Após adsorver sobre as monocamadas lipídicas a quitosana provoca a expansão dos filmes, a qual foi detectada para todos os lipídios empregados (DPPC, DPPG, DMPA e colesterol). Em todos os casos existe uma concentração de quitosana na subfase para qual o efeito satura. Essa concentração para o filme de DPPC foi de 0,200 mg/mL no regime de baixas pressões de superfície, e de 0,100 mg/mL para filmes mais compactos. Para as monocamadas puras dos outros fosfolipídios a concentração foi a mesma para toda a isoterma, sendo 0,200 mg/mL para DPPG e DMPA, e 0,300 mg/mL para colesterol. O principal reflexo biológico dessas concentrações de saturação é que, para valores acima dela, uma quantidade desnecessária de material pode estar sendo empregada, para o caso em que a expansão estabiliza. Além disso, um efeito contrário pode ser obtido, como ocorre para alguns fosfolipídios, em que se observa condensação acima da concentração de saturação.

A expansão dos filmes causada pela adsorção da quitosana é acompanhada por uma diminuição de elasticidade, observada tanto por medidas estáticas (C_s^{-1}) e dinâmicas (ϵ) para DPPC, DPPG e DMPA. Para os três fosfolipídios, após a interação com quitosana, as monocamadas de Langmuir mostraram estar em um estado líquido-expandido ($C_s^{-1} < 150$ mN/m) durante todo o intervalo de pressão. Esses resultados são relevantes do ponto de vista biológico, pois alterações na fluidez podem acarretar em diferentes coeficientes de particionamento de moléculas na membrana, bem como em mudanças conformacionais de proteínas e polissacarídeos na interface. (68) Além disso, a estrutura de bicamada pode ser afetada e a estabilidade da célula comprometida, como comprovado, por exemplo, na aplicação da quitosana como agente bactericida. (33)

Paralelamente aos objetivos principais da tese, pela comparação de resultados de monocamadas de colesterol mostrados no capítulo 4.3 com resultados da literatura, (88, 90) foi possível concluir que as características químicas da amostra de quitosana têm grande efeito sobre sua ação em biomembranas. Amostras com diferentes graus de acetilação, massa molar e polidispersividade possuem diferentes atividades. Por exemplo, o simples aumento do grau de acetilação do polímero de 15% para 22%, acompanhado da diminuição de sua polidispersividade de 6,2 para 4,2, causou aumento de três vezes na concentração de saturação do efeito de expansão. Esses resultados demonstram a necessidade de bom controle sobre as características químicas da quitosana, para que a ação desejada de um medicamento à base de quitosana seja alcançada, sem efeitos colaterais.

De modo geral, as isotermas π -A e Δ V-A para os filmes de Langmuir de DPPC e DPPG mostraram que ao final da compressão (próximo ao colapso dos filmes - em estágios de compactação equivalentes ao de uma biomembrana real) havia expansão muito menor das membranas, indicando a expulsão da quitosana da interface. Entretanto, pequenas diferenças nas curvas para quitosana em relação aos filmes espalhados sobre subfase de tampão puro, como a pressão de colapso entre 2 e 7 mN/m maior para os filmes de DPPG e o sinal final maior de Δ V-A para os filmes de DPPC, indicam que o polímero permanece na interface, em parte incorporado aos filmes e em parte disposto na subsuperfície das membranas. Essas observações foram a principal motivação de se trabalhar com o fosfolipídio DMPA, o qual permitiu que estudos em filmes LB multicamadas pudessem ser realizados.

Com a caracterização de filmes LB de 11 camadas de DMPA ou DMPA+quitosana pode-se concluir que o polímero realmente não é expulso totalmente da interface. Os filmes LB mistos DMPA+quitosana possuem massa transferida de 149 ng maior que o filme de DMPA puro. Comprovou-se através de medidas de FTIR que essa massa adicional é referente a quitosana transferida junto com o DMPA, pois são observadas bandas características da quitosana, como as de amida em 1585 cm⁻¹ e de hidroxila + N-H em 3226 cm⁻¹. Imagens de AFM para filmes com 1 camada mostraram que a quitosana penetra no filme de DMPA formando agregados com até 150 nm de altura, e a quitosana também se dispõe como uma sub-camada, pois a rugosidade do filme nas regiões sem agregados aumenta em mais de 10 vezes. Medidas de SFG para esses filmes mistos comprovaram o indício obtido pelas isotermas de Δ V-A de que as moléculas do fosfolipídio ficam mais orientadas após a interação com quitosana. Essa constatação, embora pareça contraditória com o sentido mais comum de expansão, pode ser compreendida pelo fato de que a quitosana é uma substância incorporada ao filme a partir da subfase. Por esse motivo, ela não é contada para o cálculo das áreas por molécula, causando o efeito que denominamos de expansão; e como um material mais "mole" ela faz com que o filme seja mais compressível e, consequentemente, menos elástico.

Filmes mistos DMPA-colesterol.

Grande parte do doutorado foi dedicada ao estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) mistos de DMPA e colesterol, inéditos na literatura. A formação de filmes miscíveis entre os materiais foi comprovada por isotermas com formatos intermediários, e localização no eixo de áreas por molécula compreendida entre as isotermas dos materiais puros. Entretanto, a energia livre de mistura (ΔG_{mix}) positiva a baixas pressões, e negativa a altas pressões, demonstra um comportamento ambíguo do colesterol. Para o estágio de baixas pressões do filme, ele tem efeito de condensação sobre as moléculas de DMPA, idêntico ao descrito na literatura para outros lipídios (DPPC e DPPG). Esse efeito é decorrente da interação do colesterol através de forças de Van der Waals com as cadeias alquílicas do DMPA, que originam efeitos cooperativos de organização das cadeias. Entretanto, para altos valores de pressão de superfície o colesterol provoca expansão do filme de DMPA, provavelmente porque a molécula altera o grau de ionização dos grupos fosfatos da cabeça polar, aumentando a repulsão entre as mesmas e conferindo mais espaços para as cadeias alquílicas.

Esse efeito de expansão provocado pelo colesterol a altas pressões também foi detectado por medidas de PM-IRRAS para o filme de Langmuir. A banda de estiramento

simétrico do grupo CH₃, centrada em 2890 cm⁻¹, se torna mais visível para filmes mais orientados. Essa banda pode ser observada como um ombro no espectro filme puro de DMPA a pressões acima de 30 mN/m; entretanto, ela não aparece para o filme compacto DMPA-colesterol. A indução de ordem provocada pelas quitosana às cadeias de DMPA também pôde ser comprovada por medidas de PM-IRRAS.

A análise do potencial de superfície de filmes DMPA-colesterol mostrou que as propriedades elétricas da monocamada mista são dominadas pelo DMPA, pois quanto mais fosfolipídio maior o potencial inicial, que se aproximava do sinal do DMPA puro. Da mesma forma, pela análise das isotermas Δ V-A dos filmes com quitosana, observa-se que o Δ V dos filmes mistos é o mesmo para a monocamada de DMPA puro, indicando papel inerte do colesterol. Inclusive as isotermas de π -A das monocamadas com diversas proporções DMPA:colesterol mostram que a ação da quitosana sobre as membranas mistas, em termos de expansão e variação da elasticidade, é totalmente dirigida pela interação com o DMPA.

O comportamento anômalo das curvas de π -A e Δ V-A para as monocamadas mistas DMPA-colesterol foi entendido com um modelo que prevê o colesterol atuando como regulador da penetração da quitosana nas membranas. Supõe-se também que existe um número máximo e constante de pontos de interação entre as moléculas de quitosana e DMPA, o que explica por que os efeitos da quitosana são independentes da proporção de colesterol no filme.

A predominância das interações eletrostáticas fica evidente nos resultados de PM-IRRAS para o sistema DMPA+quitosana, para o qual as bandas de $v_{ass}(PO_2)$ e $\delta_s(NH_3^+)$ sofrem alterações significativas somente para o filme com pressão superior a 15 mN/m. Isso comprova que existem fortes interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ da quitosana e o grupo PO_2^- do DMPA. Provavelmente essas interações dominam os efeitos atribuídos à quitosana, inclusive para os filmes mistos DMPA-colesterol, pois a interação colesterol-quitosana causa modificações desprezíveis nos espectros de PM-IRRAS.

Finalmente, é possível fazer uma análise do sistema de três componentes da seguinte maneira: i) a adição de colesterol ao filme de DMPA com compactação semelhante à de uma membrana real provoca expansão da monocamada, fazendo com que as caudas apolares das moléculas tenham mais área disponível e passem a ser menos orientadas. Essa expansão acompanhada da desordem das cadeias reflete no deslocamento das bandas de fosfato e de C-H nos espectros de PM-IRRAS de filmes de Langmuir, e na diminuição do parâmetro de ordem medido por SFG para filmes LB. ii) a interação da quitosana com as membranas mistas faz com que as moléculas de DMPA fiquem mais orientadas, num efeito contrário ao imposto

pelo colesterol. Essa ação é semelhante àquela provocada pela quitosana aos filmes puros de DMPA, e pode ser detectada pelas mesmas bandas de PM-IRRAS e pelo parâmetro de ordem do SFG. Em todos esses indicativos, praticamente o mesmo estágio inicial do filme de DMPA puro é recuperado.

6 PERSPECTIVAS

Embora os resultados mostrados nesta tese forneçam um bom panorama da interação de quitosana com modelos de membrana celular formados por filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de fosfolipídios, eles também abrem grande número de lacunas de conhecimento que deverão ser preenchidas com novos projetos e experimentos complementares aos reportados aqui.

No que diz respeito ao modelo empregado, uma vez que o estudo da interação de quitosana com esse tipo de filme é inédito, foi necessário que trabalhássemos inicialmente com monocamadas de um só componente, e num segundo momento com filmes mistos de apenas um tipo de fosfolipídio e colesterol. Com os subsídios fornecidos por este trabalho, abre-se a perspectiva do uso de modelos mais completos e com semelhança maior com uma membrana plasmática real. Obviamente, o próximo passo é a incorporação de proteínas transmembrana e proteínas periféricas, as quais fazem parte da estrutura de biomembranas e desempenham papel importantíssimo em sua interação com polímeros e outros agentes externos em contato com a célula. Alguns estudos já estão em andamento no Grupo de Polímeros Bernhard Gross com a proteína mucina, que é o principal componente do muco, líquido que reveste superfícies de tecidos do corpo humano. Porém, outras proteínas podem ser utilizadas. Uma classe de enzimas que também já vem sendo testada são as lipases, relevantes para a digestão e em que a quitosana atua como interferente.

Ainda com relação aos filmes de Langmuir como modelos, outra estratégia que se pretende utilizar é o espalhamento na interface ar-água de extratos lipídicos de membranas naturais. Esses extratos são disponíveis comercialmente, e também podem ser obtidos pelo tratamento de células com soluções específicas de detergentes. Neles estão contidos quase em sua totalidade os lipídios da membrana plasmática e nas membranas internas. Dependendo do tratamento de extração, algumas proteínas transmembrana também podem estar presentes. Com o uso desses extratos, juntamente com misturas complexas de lipídios, em proporção semelhante às que ocorrem em determinadas células, é possível obter modelos mais próximos das membranas reais. Além disso, o uso de outros modelos, como vesículas de diversos tamanhos e bicamadas lipídicas suportadas, é importante, pois outros tipos de fenômenos, como transporte intermembrana e difusão lateral de moléculas, podem ser estudados.

Do ponto de vista da estrutura química da quitosana, uma vasta gama de estudos ainda deve ser realizada para obter maior controle sobre a relação estrutura-propriedade do polímero. Por se tratar de um biopolímero produzido por um processo químico a partir de outro biopolímero, a quitosana tem grande diversidade de características químicas, dependendo da fonte. Normalmente em estudos com esse polímero, usam-se materiais compreendidos em faixas de massas molares, polidispersividade e graus de acetilação próximos, pois é virtualmente impossível obter um material com características exatamente definidas e reprodutíveis. Esses parâmetros estruturais devem afetar a ação da quitosana sobre biomembranas, mudando a concentração de saturação do polímero, como foi mostrado, ou alterando as interações de que participa, a modulação da orientação dos fosfolipídios, ou a formação de domínios na membrana.

Alguns estudos em nosso grupo já usam quitosanas de baixa massa molar, quitosana quase monodispersa, oligômeros de quitosana e quitosana extensivamente acetilada, a fim de estudar o efeito da massa molar, da polidispersividade e do grau de acetilação no efeito sobre modelos de membrana. O polieletrólito linear poli[cloreto de alilamina], que contém grupos amina primários idênticos ao da quitosana, vem sendo usado para comparar e elucidar os efeitos da cadeia principal. Além disso, misturas das unidades repetitivas em proporções molares que refletem o grau de acetilação do polímero vêm sendo empregadas para modelar a cadeia. Outros parâmetros estruturais que provavelmente afetam a ação da quitosana são temas de um projeto de doutorado em andamento. São eles, a conformação da quitosana em solução, a orientação relativa da adsorção do polímero à interface, e a ação sinergística das hidroxilas da cadeia.

Finalmente, para completar os estudos dos sistemas utilizados nesta tese, técnicas que possuem maior especificidade para grupos químicos devem ser utilizadas para identificar os sítios de interação entre a quitosana e as moléculas de fosfolipídios. Acredita-se que a técnica mais adequada deve ser selecionada entre as técnicas de espectroscopia fotoelétrica de raios X (XPS), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia paramagnética de ressonância (EPR).

1 SYNOWIECKI, J. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, n. 2, p. 145-171, 2003.

2 RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

3 ROBERTS, G. A. F. Chitin Chemistry. Hempshire: Macmillan, 1992.

4 SORLIER, P.; DENUZIÈRE, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. Biomacromolecules, v. 2, n. 3, p. 765-772, 2001.

5 GOOSEN, M. F. A. Applications of chitin and chitosan. Boca Raton: CRC Press LLC, 1997.

6 KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

7 DOS SANTOS JR., D. S.; RIUL JR., A.; MALMEGRIM, R. R.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JR., O. N.; MATTOSO, L. H. C. A layer-by-layer film of chitosan in a taste sensor application. *Macromolecular Bioscience*, v. 3, n. 10, p. 591-595, 2003.

8 KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

9 FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA JR., O. N.; TORRESI, S. I. C. Enzymemediated amperometric biosensors prepared with the layer-by-layer (LbL) adsorption technique. Biosensors and Bioelectronics, v. 19, n. 12, p. 1611-1615, 2004.

10 RIUL JR., A.; DE SOUSA, H. C.; MALMEGRIM, R. R.; DOS SANTOS JR., D. S.; CARVALHO, A. C. P. L. F.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JR., O. N.; MATTOSO, L. H. C. Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks. *Sensors and Actuators B*, v. 98, n. 1, p. 77–82, 2004.

12 KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 12, p. 6017-6084, 2004.

13 SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, v. 9, n. 7, p. 1837-1842, 2008.

14 MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chemical Reviews*, v. 109, n. 2, p. 259-302, 2009.

15 WONG, S. Y.; PELET, J. M.; PUTNAM, D. Polymer systems for gene delivery-Past, present, and future. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 8-9, p. 799-837, 2007.

16 KIM, T-H; JIANG, H-L; JERE, D.; PARK, I-K; CHO, M-H; NAH, J-W; CHOI, Y-J; AKAIKE, T.; CHO, C-S. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 7, p. 726-753, 2007.

17 PALSSON, B.; HUBBELL, J. A.; PLONSEY, R.; BRONZINO, J. D. Tissue Engineering. Boca Raton: CRC Press, 2003. (Principles and Applications in Engineering series).

18 KIM, I-Y; SEO, S-J; MOON, H-S; YOO, M-K; PARK, I-Y; KIM, B-C; CHO, C-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2008.

19 MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.

20 TANIGAWA, J.; MIYOSHI, N.; SAKURAI, K. Characterization of chitosan/citrate and chitosan/acetate films and applications for wound healing. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 110, n. 1, p. 608-615, 2008.

21 CHEN, K-Y; LIAO, W-J; KUO, S-M; TSAI, F-J; CHEN, Y-S; HUANG, C-Y; YAO, C-H. Asymmetric chitosan membrane containing collagen-I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules*, v. 10, p. 1642-1649, 2009. DOI: 10.1021/bm900238b.

22 PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, n. 3, p. 117-131, 2007.

23 COSTA-SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

24 MUN, S.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Influence of Interfacial Composition on in Vitro Digestibility of Emulsified Lipids: Potential Mechanism for Chitosan's Ability to Inhibit Fat Digestion. *Food Biology*, v. 1, n. 1, p. 21-29, 2006.

25 PARK, G. Y.; MUN, S.; PARK, Y.; RHEE, S.; DECKER, E. A.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J.; PARK, Y. Influence of encapsulation of emulsified lipids with chitosan on their in vivo digestibility. *Food Chemistry*, v. 104, n. 2, p. 761-767, 2007.

26 RABEA, E. I.; BADAWY, M. E.-T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

27 GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros:* ciência e tecnologia, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

28 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO / SANTISTA TÊXTIL. Instituto de Física de São Carlos. Alessandra Luzia Da Róz, Luiza Vietri Pereiro, Felippe José Pavinatto, Frank Nelson Crespilho, Valtencir Zucolotto, Antonio José Felix de Carvalho e Osvaldo Novais de Oliveira Jr. **Produto a base de quitosana e processo de impregnação do mesmo em têxteis**. BR n. PI 0.802.290-9, 27 novembro 2008 (data depósito).

29 LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 79, n. 7, p. 1324-1335, 2001.

30 AYALA-NÚÑEZ, N. V.; VILLEGAS, H. H. L.; TURRENT, L. C. I.; PADILLA, C. R. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant staphylococcus aureus: nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*, v. 5, n. 1-4, p. 2-9, 2009. Doi.10.1007/s12030-009-9029-1.

142

31 RAAFAT, D.; VON BARGEN, K.; HAAS, A.; SAHL, H-G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.

32 HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E.-L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, n. 2-3, p. 235-244, 2001.

33 LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.

34 LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. E. *Molecular cell biology*. New York: W. H. Freeman and Company, 1999.

35 YEAGLE, P. L. The membranes of cells, San Diego: Academic Press, 1993.

36 PETTY, H. R. *Molecular biology of membranes: structure and function*. New York: Plenum Press, 1993.

37 SHINITZKY, M. *Biomembranes:* structural and functional aspects. Weinheim: VCH, 1994.

38 LIPOWSKY, R.; SACKMANN, E. Handbook of biological physics: volume 1A: structure and dynamics of membranes. New York: Elsevier Science, 1995.

39 FINEGOLD, L. Cholesterol in membrane models. Boca Raton: CRC Press, 1993.

40 YEAGLE, P. L. The structure of biological membranes, Boca Raton: CRC Press, 1991.

41 JONES, M. N.; CHAPMAN, D. Micelles, monolayers and biomembranes. New York: Wiley-Liss, Inc., 1994.

42 SHAIKH, S. R.; EDIDIN, M. A. Membranes are not just rafts. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 144, n. 1, p. 1-3, 2006.

43 SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v. 175, n. 23, p. 720-731, 1972.
44 SINGER, S. J. Some early history of membrane molecular biology. *Annual Review in Physiology*, v. 66, n. 1, p. 1-27, 2004.

45 ENGELMAN, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, v. 438, p. 578-580, 2005. DOI: 10.1038/nature04394.

46 LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917.

47 BLODGETT, K. Monomolecular films of fatty acids on glass. *Journal of the American Chemical Society*, v. 56, n. 2, p. 495-495, 1934.

48 BLODGETT, K. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *Journal of the American Chemical Society*, v. 57, p.1007-1022, 1935. DOI: 10.1021/ja01309a011.

49 ROBERTS, G. Langmuir-Blodgett films. New York: Plenum Press, 1990.

50 ULMAN, A. Organic thin films, San Diego: Academic Press, 1995.

51 RAYLEIGH, A. Surface Tension. *Nature*, v. 43, p. 437-439, 1891. DOI: 10.1038/043437c0.

52 POCKELS, A. On the relative contamination of the water-surface by equal quantities of different substances. *Nature*, v. 46, p. 418-419, 1892. doi:10.1038/046418e0.

53 FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA JR., O. N. 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, 2005.

54 MASTERS, J. R. *Animal cell culture: a practical approach 3rd ed.*. New York: Oxford University Press, 2000.

55 ZEPIK, H. H.; WALDE, P.; KOSTORYZ, E. L.; CODE, J.; YOURTEE, D. M. Lipid vesicles as membrane models for toxicological assessment of xenobiotics. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 38, n. 1, p. 1-11, 2008.

56 EDIDIN, M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, v. 32, p. 257-283, 2003. DOI: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.142439.

57 HENRIKSEN, I.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J. Interactions between liposomes and chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 101, n. 3, p. 227-236, 1994.

58 MERTINS, O.; SEBBEN, M.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Production of soybean phosphatidylcholine–chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 138, n. 1-2, p. 29-37, 2005.

59 MERTINS, O.; CARDOSO, M. B.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Structural Evaluation of Phospholipidic Nanovesicles Containing Small Amounts of Chitosan. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, n. 8, p. 2425-2431, 2006.

60 MARÓN, L. B; COVAS, C. P.; DA SILVEIRA, N. P.; POHLMANN, A.; MERTINS, O.; TATSUO, L. N.; SANT'ANNA, O. A. B.; MORO, A. M.; TAKATA, C. S.; DE ARAUJO, P. S.; DA COSTA, M. H. B. LUVs Recovered with Chitosan: A New Preparation for Vaccine Delivery. *Journal of Liposome Research*, v. 17, n. 3-4, p. 155-163, 2007.

61 QUEMENEUR, F.; RAMMAL, A.; RINAUDO, M. PÉPIN-DONAT, B. Large and giant vesicles "decorated" with chitosan: effects of pH, salt or glucose stress, and surface adhesion. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 8, p. 2512-2519, 2007.

62 QUEMENEUR, F.; RINAUDO, M.; PÉPIN-DONAT, B. Influence of molecular weight and pH on adsorption of chitosan at the surface of large and giant vesicles. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 1, p. 396-402, 2008a.

63 QUEMENEUR, F.; RINAUDO, M.; PÉPIN-DONAT, B. Influence of polyelectrolyte chemical structure on their interaction with lipid membrane of zwitterionic liposomes. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 8, p. 2237-2243, 2008b.

64 MERTINS, O.; LIONZO, M. I. Z.; MICHELETTO, Y. M. S.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Chitosan effect on the mesophase behavior of phosphatidylcholine supramolecular systems. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, n. 2, p. 463-469, 2009.

65 MADY, M. M.; DARWISH, M. M.; KHALIL, S.; KHALIL, W. M. Biophysical studies on chitosan-coated liposomes. *European Biophysics Journal*, v. 38, n. 8, p. 1127-1133, 2009.

66 ROSETTI, C. M.; MAGGIO, B.; OLIVEIRA, R. G. The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. Molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778, n. 7-8, p. 1665-1675, 2008.

67 BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 100-102, p. 563-584, 2003. DOI: 10.1016/S0001-8686(02)00071-4.

68 MARSH, D. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.

69 FENG, S. S. Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. *Langmuir*, v. 15, n. 4, p. 998-1010, 1999.

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

71 MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1462, n. 1, p. 109-140, 1999.

72 GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; BLUM, L. J. Enzyme association with lipidic Langmuir–Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 116, n. 1-3, p. 205-225, 2005.

73 LEBLANC, R. M. Molecular recognition at Langmuir monolayers. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, n. 6, p. 529-536, 2006.

74 NISHIMURA, S-I.; MIURA, Y.; REN, L.; SATO, M.; YAMAGISHI, A.; NISHI, N.; TOKURA, S.; KURITA, K.; ISHI, S. An efficient method for the syntheses of novel amphiphilic polysaccharides by regio- and thermoselective modifications of chitosan. *Chemistry Letters*, v. 22, n. 9, p. 1623-1626, 1993.

75 LI, M.; YAO, K.; MIYASHITA, T. N-Alkyl chitosan: Interaction with water and LB film. *Designed Monomers and Polymers*, v. 5, n. 2-3, p. 277-283, 2002a.

76 LI, M.; XIN, M.; MIYASHITA, T. Preparation of N,N-dilauryl chitosan Langmuir-Blodgett film. *Polymer International*, v. 51, n. 10, p. 889-891, 2002b.

77 LI, M.; XIN, M. N,N-Dilauryl chitosan self-assembled vesicles for drug delivery. *Designed Monomers and Polymers*, v. 9, n. 1, p. 89-97, 2006.

78 LI, M.; SU, S.; XIN, M.; LIAO, Y. Relationship between N,N-dialkyl chitosan monolayer and corresponding vesicle. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 311, n. 1, 285-288, 2007.

79 TONG, Y.; WANG, S.; XU, J.; CHUA, B.; HE, C. Synthesis of O,O'-dipalmitoyl chitosan and its amphiphilic properties and capability of cholesterol absorption. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, n. 2, p. 229-233, 2005.

80 WU, Y.; HISADA, K.; MAEDA, S.; SASAKI, T.; SAKURAI, K. Fabrication and structural characterization of the Langmuir–Blodgett films from a new chitosan derivative containing cinnamate chromophores. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 4, p. 766-772, 2007.

81 VOLINSKY, R.; KOLUSHEVA, S.; BERMAN, A.; JELINEK, R. Investigations of antimicrobial peptides in planar film systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, n. 9, p. 1393-1407, 2006.

82 SCHULZ, P.C.; RODRÍGUEZ, M.S.; DEL BLANCO, L.F.; PISTONESI, M.; AGULLO, E. Emulsification properties of chitosan. *Colloid and Polymer Science*, v. 276, n. 12, p. 1159-1165, 1998.

83 BABAK, V.; LUKINA, I.; VIKHOREVA, G.; DESBRIÉRES, J.; RINAUDO, M. Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, v. 147, n. 1-2, p. 139-148, 1999.

84 GARGALLO, L.; LEIVA, A.; URZÚA, M.; ALEGRÍA, L.; MIRANDA, B.; RADÍC, D. Modification of the air-water interface by a chitosan adsorption process. Effect on an amphiphilic polymer monolayer. *Polymer International*, v. 53, n. 11, p.1652-1657, 2004.

85 QUN, G.; AJUN, W. Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 64, n. 1, p. 29-36, 2006.

86 PEPIC, I.; FILIPOVIC-GRCIC, J.; JALSENJAK, I. Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. *Colloids and Surfaces A:* physicochemical and engineering aspects, v. 327, n. 1-3, p. 95-102, 2008.

87 STENGER, P. C.; PALAZOGLU, O. A.; ZASADZINSKI, J. A. Mechanisms of polyelectrolyte enhanced surfactant adsorption at the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1788, n. 5, p. 1033-1043, 2009.

88 PAVINATTO, F. J.; DOS SANTOS JR., D. S.; OLIVEIRA JR., O. N. Interaction between cholesterol and chitosan in Langmuir monolayers. *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 15, n. 2, p. 91-91, 2005.

89 FANG, N.; CHAN, V. Chitosan-induced restructuration of a mica-supported phospholipid bilayer: an atomic force microscopy study. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 6, p.1596-1604, 2003.

90 PARRA-BARRAZA, H.; BURBOA, M. G.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, M. JUÁREZ, J.; GOYCOOLEA, F. M.; VALDEZ, M. A. Chitosan-cholesterol and chitosan-stearic acid interactions at the air-water interface. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 5, p. 2416-2426, 2005.

91 WYDRO, P.; KRAJEWSKA, B.; HAC-WYDRO, K. Chitosan as a lipid binder: a Langmuir monolayer study of chitosan lipid interactions. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 8, p. 2611-2617, 2007.

92 RIGBY, M. Forces between molecules. Oxford: Clarendon Press, 1986.

93 ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces. London: Academic Press, 1991.

94 MYERS, D. Surfaces, Interface and Colloids: principles and applications 2nd ed. New York: Wiley-VHC, 1999.

95 VARGAFTIK, N. B.; VOLKOV, B. N.; VOLJAK, L. D. International tables of the surface tension of water. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 12, n. 3, p. 817-820, 1983.

96 TANFORD, C. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, New York: Wiley, 1973.

97 SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. *Polymer Bulletin*, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1999.

98 DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. Interfacial potentials. *Canadian Journal of Physics*, v. 33, n. , p. 947-960, 1955.

99 DEMCHAK, R. J.; FORT JR., T. J. 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, 1974.

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

101 YAMINS, H.G.; ZISMAN, W. A. A new method of studying the electrical properties of monomolecular films on liquids. *Journal of Chemical Physics*, v. 1, n. 9, p. 656-661, 1933.

102 YU, Z-W.; JIN, J.; CAO, Y. Characterization of the liquid-expanded to liquidcondensed phase transition of monolayers by means of compressibility. *Langmuir*, v. 18, n. 11, p. 4530-4531, 2002.

103 DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. Interfacial phenomena. New York: Academic Press, 1961.

104 NOBRE, T. M. *Estudo da interação entre polissacarídeos sulfatados e substâncias anfifilicas.* 2007. 142 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

105 LUCASSEN, J.; VAN DEN TEMPEL, M. Dynamic measurements of dilatational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering* Science, v. 27, n. 6, p. 1283-1291, 1972.

106 GREENLER, R. G. Infrared study of adsorbed molecules on metal surfaces by reflection techniques. *The Journal of Chemical Physics*, v. 44, p. 310-315, 1966. DOI: 10.1063/1.1726462.

107 DLUHY, R. A.; CORNELL, D. G. In Situ measurement of the infrared spectra of insoluble monolayers at the air-water interface. *Journal of Physical Chemistry*, v. 89, n. 15, p. 3195-3797, 1985.

108 DLUHY, R. A. Quantitative external reflection infrared spectroscopy analysis of insoluble monolayers spread at the air-water interface. *Journal of Physical Chemistry*, v. 90, n. 7, p. 1373-1379, 1986.

109 GOLDEN, W. G.; SAPERSTEIN, D. D.; SEVERSON, M. W.; OVEREND, J. A method for measuring infrared reflection-absorption spectra of molecules adsorbed on low-area surfaces at monolayer and submonolayer concentrations. *Journal of Catalysis*, v. 71, n. 2, p. 395-404, 1981.

110 BLAUDEZ, D.; BUFFETEAU, T.; CORNUT, J. C.; DESBAT, B.; ESCAFRE, N.; PEZOLET, M.; TURLET. J. M. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. *Applied Spectroscopy*, v. 47, n. 7, p. 869-874, 1993.

111 BLAUDEZ, D.; BUFFETEAU, T.; CORNUT, J. C.; DESBAT, B.; ESCAFRE, N.; PEZOLET, M.; TURLET. J. M. Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface. *Thin Solid Films*, v. 242, n. 1-2, p. 146-150, 1994.

112 BARNER, B. J.; GREEN, M. J.; SBEZ, E. I.; CORN, R. M. Polarization modulation Fourier transform infrared reflectance measurements of thin films and monolayers at metal surfaces utilizing real-time sampling electronics. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 55-60, 1991. DOI: 10.1021/ac00001a010.

113 GREEN, M. J.; BARNER, B. J.; CORN, R. M. Real-time sampling electronics for double modulation experiments with Fourier transform infrared spectrometers. *Reviews in Science and Instrumentation*, v. 62, p. 1426-1430, 1991. DOI: 10.1063/1.1142462.

114 BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.

115 WIESENDANGER, R. *Scanning probe microscopy and spectroscopy:* methods and applications. Berlin: Springer, 1998.

116 LEITE, F. L. *Estudos de filmes de polímeros condutores por microscopia de força atômica: processos de adsorção e propriedades eletrônicas.* 2006. 182 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

117 JANSHOFF, A.; GALLA, H-J.; STEINEM, C. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - an alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie*, v. 39, n. 22, p. 4004-4032, 2000.

118 SAUERBREY, G. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, v. 155, n. 2, p. 206-222, 1959.

119 FOSCHINI, M. Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados. 2009. 134 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

120 MANUAL QCM200, revisão 2.0 de 08/02/2004, disponível em: <<u>http://www.thinksrs.com/downloads/PDFs/Manuals/QCM200m.pdf</u>>. Acesso em 2010.

121 SHEN, Y. R. Surface properties probed by second-harmonic and sum-frequency generation. *Nature*, v. 337, p. 519-525, 1989. doi:10.1038/337519a0

122 SHEN, Y. R.; OSTROVERKHOV, V. Sum-frequency vibrational spectroscopy on water interfaces: polar orientation of water molecules at interfaces. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 4, p. 1140-1154, 2006.

123 LAMBERT, A. G.; DAVIES, P. B.; NEIVANDT, D. J. Implementing the theory of sum frequency generation vibrational spectroscopy: a tutorial review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 40, n. 2, p. 103-145, 2005.

124 SILVA, H. S. *Espectroscopia vibracional de filmes automontados de polieletrólitos através da geração de soma de freqüências*. 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

125 FANG, N.; CHAN, V.; MAO, H-Q; LEONG, K. W. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules*, v. 2, n. 4, p. 1161-1168, 2001.

126 HUANG, Y-Z.; GAO, J-Q.; LIANG, W-Q.; NAKAGAWA, S. Preparation and characterization of liposomes encapsulating chitosan nanoparticles. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 2, p. 387-390, 2005.

127 AROTI, A.; LEONTIDIS, E.; MALTSEVA, E.; BREZESINSKI, G. Effects of Hofmeister anions on DPPC Langmuir monolayers at the air-water interface, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 39, p. 15238-15245, 2004.

128 SCHMIDT, T. F.; CASELI, L.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA JR., O. N. Interaction of horseradish peroxidase with Langmuir monolayers of phospholipids.

Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects, v. 321, n. 1-3, p. 206-210, 2008.

129 MIÑONES JR., J.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; MIÑONES, J.; RODRIGUEZ-PATINO, J. M.; IRIBARNEGARAY, E. Orientational changes in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol Langmuir monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 265, n. 2, p. 380-385, 2003.

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

131 KOZARAC, Z.; COSOVIC, B.; MOBIUS, D.; DOBRIC, M. Interaction of polysaccharides with lipid monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 226, n. 2, p. 210-217, 2000.

132 NIÑO, M. R. R.; LUCERO, A.; PATINO, J. M. R. Relaxation phenomena in phospholipid monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A:* physicochemical and engineering aspects, v. 320, n. 1-3, p. 260-270, 2008.

133 SHAPOVALOV, V. L; SHUB, B. R.; OLIVEIRA JR., O. N. Thermal Marangoni flows and macroscopic domain movement in monolayer surface potential experiments. *Colloids and Surfaces A:* physicochemical and engineering aspects, v. 198-200, p. 195-206, 2002.

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

135 LEE, Y-L.; LIN, J-Y.; CHANG, C-H. Thermodynamic characteristics and Langmuir-Blodgett deposition behavior of mixed DPPA/DPPC monolayers at air/liquid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 296, n. 2, p. 647-654, 2006.

136 GINER-CASARES, J. J.; CAMACHO, L.; MARTÍN-ROMERO, M. T.; LÓPEZ-CASCALES, J. J. A DMPA Langmuir monolayer study: from gas to solid phase. an atomistic description by molecular dynamics simulation. *Langmuir*, v. 24, n., p. 1823-1828, 2008.

137 IVANOV, I. B.; DANOV, K. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; LIPS, A. Interfacial rheology of adsorbed layers with surface reaction: on the origin of the dilatational surface viscosity. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 114-115, p. 61-92, 2005. DOI: 10.1016/j.cis.2004.11.001.

138 AHUJA, R. C.; CARUSO, P-L.; MOBIUS, D. Molecular organization via interactions at interfaces. 1. monolayers and LB films of cyclic bisbipyridinium tetracations and dimyristoylphosphatidic acid. *Langmuir*, v. 9, n. 6, p. 1534-1544, 1993.

139 LOZANO, P.; FERNÁNDEZ, A. J.; RUIZ, J. J.; CAMACHO, L.; MARTÍN, M. T.; MUÑOZ, E. Molecular organization of LB multilayers of phospholipid and mixed phospholipid/viologen by FTIR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 106, n. 25, p. 6507-6514, 2002.

140 LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRONDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 8, p. 2533-2541, 2007.

141 DE SOUZA, N. C.; CAETANO, W.; ITRI, R.; RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA JR., O. N.; GIACOMETTI, J. A.; FERREIRA, M. Interactions of small amounts of bovine serum albumine with phospholipid monolayers investigated by surface pressure and atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 297, n. 2, p. 546-553, 2006.

142 CHAPMAN, D.; OWENS, N. F.; PHILLIPS, M. C.; WALKER, D. A. Mixed monolayers of phospholipids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 183, n. 3, p. 458-465, 1969.

143 PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; BARROS-TIMMONS, A.; OLIVEIRA JR., O. N. Electrostatic interactions are not sufficient to account for chitosan bioactivity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 2, n. 1, p. 246-251, 2010.

144 HODA, K.; IKEDA, Y.; KAWASAKI, H.; YAMADA, K.; HIGUCHI, R.; SHIBATA, O. Mode of interaction of ganglioside Langmuir monolayer originated from echinoderms: three binary systems of ganglioside/DPPC, ganglioside/DMPE, and ganglioside/cholesterol. *Colloids and Surfaces B:* biointerfaces, v. 52, n. 1, p. 57-75, 2006.

145 AHUJA, R. C.; MAACK, J.; TACHIBANA, H. Unconstrained cis-trans isomerization of azobenzene moieties in designed mixed monolayers at the air/water interface. *Journal of Physical Chemistry*, v. 99, n. 22, p. 9221-9229, 1995.

146 POTT, T.; MAILLET, J-C.; DUFOURC, E. J. Effects of pH and cholesterol on DMPA membranes: a solid state ²H- and ³¹P=NMR study. *Biophysical Journal*, v. 69, n. 5, p. 1897-1908, 1995.

147 GOODRICH, F. C. International Congress of Surface Activity. *Angewandte Chemie*, v. 69, n. 16, p. 536-536, 1957.

148 GAINES JR., G. L. Thermodynamic relationships for mixed insoluble monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 21, n. 3, p. 315-319, 1966.

149 BACON, K. J.; BARNES, G. T. Two-component monolayers IV. The excess enthalpies and entropies of mixing in the octadecanol-docosyl sulfate system. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 67, n. 1, p. 70-77, 1978.

150 OHE, C.; SASAKI, T.; NOI, M.; GOTO, Y.; ITOH, K. Sum frequency generation spectroscopy study of the condensation effect of cholesterol on a lipid monolayer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 388, n. 1, p. 73-79, 2007.

151 KIM, Y-H.; TERO, R.; TAKIZAWA, M.; URISU, T. Characterization of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayers investigated by atomic force microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. *Japanese Journal of Applied Physics*, v. 43, n. 6B, p. 3860-3864, 2004.

152 SU, Y.; LI, Q.; CHEN, L.; YU, Z. Condensation effect of cholesterol, stigmasterol, and sitosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine in molecular monolayers. *Colloids and Surfaces A*: Physicochemical Engineering Aspects, v. 293, n. 1-3, p. 123-129, 2007.

153 GÓMEZ-SERRANILLOS, I. R.; MIÑONES JR., J.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; MIÑONES, J.; IRIBARNEGARAY, E. Miltefosine-cholesterol interactions: a monolayer study. *Langmuir*, v. 20, n. 3, p. 928-933, 2004.

WU, J-C.; LIN, T-L.; YANG, C-P.; JENG, U-S.; LEE, H-Y.; SHIH, M-C. X-ray reflectivity and BAM studies on the LB film of mixed DPPC/DC-cholesterol monolayer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 284-285, p. 103-108, 2006. DOI: doi:10.1016/j.colsurfa.2005.12.039.

155 ZHAO, L.; FENG, S-S. Effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within the lipid monolayer at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 300, n. 1, p. 314-326, 2006.

156 KORCHOWIEC, B.; PALUCH, M.; CORVIS, Y.; ROGALSKA, E. A Langmuir film approach to elucidating interactions in lipid membranes: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine/cholesterol/metal cation systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 144, n. 2, p. 127-136, 2006.

157 WU, F.; CORSICO, B.; FLACH, C. R.; CISTOLA, D. P.; STORCH, J.; MENDELSOHN, R. Deletion of the helical motif in the intestinal fatty acid-binding protein reduces its interactions with membrane monolayers: Brewster angle microscopy, IR reflection-absorption spectroscopy, and surface pressure studies. *Biochemistry*, v. 40, n. 7, p. 1976-1983, 2001.

158 DICKO, A.; BOURQUE, H.; PÉZOLET, M. 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, 1998.

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

160 FLACH, C. R.; BRAUNER, J. W.; MENDELSOHN, R. Calcium ion interactions with insoluble phospholipid monolayer films at the A/W interface. External reflection-absorption IR studies. *Biophysical Journal*, v. 65, n. 5, p. 1994-2001, 1993.

161 MENDELSOHN, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1798, n. 4, p. 788-800, 2010.

162 ESPINOSA-ANDREWS, H.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum arabicchitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 3, p. 541-546, 2010.

163 KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of Nacetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 4, p. 497-508, 2008.

164 GRANT, J.; CHO, J.; ALLEN, C. Self-assembly and physicochemical and rheological properties of a polysaccharide-surfactant system formed from the cationic. Biopolymer chitosan and nonionic sorbitan esters. *Langmuir*, v. 22, n. 9, p. 4327-4335, 2006.

165 GRANT, J.; BLICKER, M.; PIQUETTE-MILLER, M.; ALLEN, C. Hybrid films from blends of chitosan and egg phosphatidylcholine for localized delivery of paclitaxel. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 94, n. 7, p. 1512-1527, 2005.

166 PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques: 1. FTIR spectroscopy. *International Journal of Dairy Technology*, v. 55, n. 3, p. 127-132, 2002.

167 BROSSEAU, C. L.; BIN, X.; ROSCOE, S. G.; LIPKOWSKI, J. DMPC + cholesterol bilayers prepared using Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer deposition. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 621, n. 2, p. 222-228, 2008.

BIN, X.; LIPKOWSKI, J. Electrochemical and PM-IRRAS studies of the effect of cholesterol on the properties of the headgroup region of a DMPC bilayer supported at a Au(111) electrode. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 51, p. 26430-26441, 2006.

169 GUYOT-SIONNEST, P.; HUNT, J; SHEN, Y. R. Sum-frequency vibrational spectroscopy of a Langmuir film: study of molecular orientation of a two-dimensional system. *Physical Review Letters*, v. 59, n. 14, p. 1597-1600, 1987.

Publicações resultantes do projeto de doutorado

- PAVINATTO, F. J.; PAVINATTO, A.; CASELI, L.; DOS SANTOS JR., D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA JR., O. N. Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 5, p. 1633-1640, 2007.
- PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; PAVINATTO, A.; DOS SANTOS JR., D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; SILVA, H. S.; MIRANDA, P.; OLIVEIRA JR., O. N. Probing chitosan and phospholipid interactions using Langmuir and Langmuir-Blodgett films as cell membrane models. *Langmuir*, v. 23, n. 14, p. 7666-7671, 2007.
- PAVINATTO, F. J.; PASCHOLATTI, C.; MONTANHA, E. A.; CASELI, L.; SILVA, H. S.; MIRANDA, P.; VIITALA, T.; OLIVEIRA JR., O. N. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Langmuir*, v. 25, n. 17, p. 10051-10061, 2009.
- PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; OLIVEIRA JR., O. N. Chitosan in nanostructured thin films. *Biomacromolecules*, v. 11, n. 8, p. 1897-1908, 2010.

Publicações no período de doutorado resultantes de trabalhos paralelos e colaborações

- CERIDÓRIO, L.; CARDOSO, M. R.; PAVINATTO, F. J.; CARVALHO, A. J. F.; MENDONÇA, C. R.; BALOGH, D. T. Photoinduced birefringence in blends of a polyurethane bearing azobenzene moieties and a poly(amide-imide). *Polymer International*, v. 55, n. 9, p. 1069-1074, 2006.
- MENDONÇA, C. R.; NEVES, U. M.; DE BONI, L.; ANDRADE, A. A.; DOS SANTOS JR., D. S.; PAVINATTO, F. J.; ZÍLIO, S. C.; MISOGUTI, L.; OLIVEIRA JR., O. N. Two-photon induced anisotropy in PMMA film doped with disperse red 13. *Optics Communications*, v. 273, n. 2, p. 435-440, 2007.
- DE BONI, L.; CORREA, D. S.; PAVINATTO, F. J.; DOS SANTOS JR., D. S.; MENDONÇA, C. R.; Excited state absorption spectrum of chlorophyll a obtained with white-light continuum. *The Journal of Chemical Physics*, v. 126, n. 16, p. 165102/1-165102/4, 2007.

- CASELI, L.; PAVINATTO, F. J.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA JR., O. N. Chitosan as a removing agent of β-lactoglobulin from membranes. *Langmuir*, v. 24, n. 8, p. 4150-4156, 2008.
- PAVINATTO, F. J.; GAMEIRO, A. F.; HIDALGO, A. A.; DINELLI, L. R.; ROMUALDO, L. L.; BATISTA, A. A.; NETO, N. M. B.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JR., O. N. Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) of tetrapyridyl metalloporphyrins. *Applied Surface Science*, v. 254, n. 18, p. 5946-5952, 2008.
- PAVINATTO, F. J.; BARLETTA, J. Y.; SANFELICE, R. C.; CARDOSO, M. R.; BALOGH, D. T.; MENDONÇA, C. R.; OLIVEIRA JR., O. N. Synthesis of azopolymers with controlled structure and photoinduced birefringence in their LB films. *Polymer*, v. 50, n. 2, p. 491-498, 2009.
- SCHMIDT, T.; PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; GONZAGA, M.; SOARES, S.; RICARDO, N.; OLIVEIRA JR., O. N. Interaction of polysaccharide protein complex from *Agaricus Blazei* with Langmuir and Langmuir-Blodgett films of phospholipids. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 330, n. 1, p. 84-89, 2009.
- VIEIRA, V. C. C.; SEVERINO, D.; OLIVEIRA JR., O. N.; PAVINATTO, F. J.; ZANIQUELLI, M. E. D.; RAMOS, A. P.; BAPTISTA, M. Langmuir films of petroleum at the air-water interface. *Langmuir*, v. 25, n. 21, p. 12585-12590, 2009.
- PASCHOLLATI, C.; LOPERA, E. P.; PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; VIITALA, T.; D'SILVA, C.; OLIVEIRA JR., O. N. The interaction of an antiparasitic peptide active against *African Sleeping Sickness* with cell membrane models. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, v. 74, n. 2, p. 504-510, 2009.
- MONTANHA, E. A.; PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; KACZMAREK, O.; LIEBSCHER, J.; HUSTER, D.; OLIVEIRA JR., O. N. Properties of lipophilic nucleoside monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, v. 77, n. 2, p. 161-165, 2010.

- NOBRE, T. M.; PAVINATTO, F. J.; COMINETTI, M. R.; DE ARAÚJO, H. S. S.; ZANIQUELLI, M. E. D.; BELTRAMINI, L. The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. *Biochimica et Biophysica Acta*. *Biomembranes*, v. 1798, n. 8, p. 1547-1555, 2010.
- PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; BARROS-TIMMONS, A.; OLIVEIRA JR., O. N. Electrostatic interactions are not sufficient to account for chitosan bioactivity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 2, n. 1, p. 246-251, 2010.
- ALESSIO, P.; PAVINATTO, F. J.; OLIVEIRA JR., O. N.; DE SAJA SAÉZ, J. A.; CONSTANTINO, C. J. L.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L. Detection of catechol using mixed Langmuir-Blodgett films of a phospholipid and phthalocyanines as voltammetric sensors. *Analyst*, v. 135, n. 10, p. 2591-2599, 2010.