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

**CONDUTÂNCIA LATERAL
EM FILME DE LANGMUIR E
FILMES MISTOS DE
FÁRMACOS COM FOSFOLIPÍDIOS**

Ailton Cavalli

Tese apresentada à área Interunidades em
Ciência e Engenharia dos Materiais da Escola
de Engenharia de São Carlos, ao Instituto de
Física de São Carlos e ao Instituto de
Química de São Carlos para a obtenção do
título de Doutor em Ciência e Engenharia
dos Materiais.

al

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.
Co-orientadora: Prof. Dra. Galina Borissevitch

/

São Carlos, 1.997

Ailton Cavalli

Condutância Lateral em Filmes de Langmuir e Filmes Mistos de
Fármacos com Fosfolipídios

Tese apresentada à área Interunidades em Ciência e Engenharia dos
Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos, ao Instituto de Física
de São Carlos e ao Instituto de Química de São Carlos para a obtenção
do título de Doutor em Ciência e Engenharia dos Materiais.

Filmes de Langmuir, Condutância Lateral, Coespalhamento

Área Interunidades

Ciência e Engenharia de Materiais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

Instituto de Física de São Carlos

Instituto de Química de São Carlos

CAIXA POSTAL - 369

CEP 13560-970 - São Carlos/SP - Brasil

Tel/Fax: (016) 274-9285

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE AILTON CAVALLI APRESENTADA JUNTO A ÁREA INTERUNIDADES EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA EESC-IFSC-IQSC, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 24/07/1997.

COMISSÃO JULGADORA:

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

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo - DF/UFPE

Profa. Dra. Íris C. Linares de Torriani - IFGW/UNICAMP

Dr. Luis Henrique Caparelli Mattoso - CNPDIA- EMBRAPA

Prof. Dr. José Alberto Giacometti - FCM/IFSC/USP

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E
INFORMAÇÃO

Aos meus filhos
Bruno e Jade

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e esposa por seu apoio incondicional em todos os momentos em que necessitei.

Aos Professores do grupo de polímeros Bernhard Gross, em especial ao professor Osvaldo Novais de Oliveira Jr, meu orientador, por seu inestimável incentivo e pela confiança depositada no meu trabalho.

À professora Galina Borissevitch, quem me introduziu na área de biofísica molecular e ao Doutor Vitor B. P. Leite por sua assistência no entendimento do modelo teórico.

Aos técnicos José Roberto Bertho, Níbio José Mangerona, Ademir Soares e Debora Terezia Balogh e a secretária Rosangela Marcondes, pelas incontáveis vezes que me prestaram auxílio.

À todos os pós-graduandos do grupo de polímeros Bernard Gross, em especial a Antonio Riul Jr., Carlos José Constantino, Sarita Vera Mello, que tornaram o local de trabalho um lugar agradável.

ÍNDICE

Lista de Figura.....	i
Abstract.....	v
Resumo.....	vi

Capítulo I Introdução

1.1 Introdução.....	1
1.1.1 A motivação para o presente projeto.....	3
1.1.2 Estrutura da tese.....	3
1.2 Referências.....	4

Capítulo II Revisão sobre filmes de Langmuir.

2.1 Introdução.....	6
2.2 Forças intermoleculares.....	7
2.3 Técnicas de caracterização.....	10
2.3.1 Pressão de superfície.....	10
2.3.2 Potencial de superfície.....	15
2.3.2a Modelo DF.....	17
2.3.2b Potencial da dupla camada.....	20
2.4 Filmes mistos.....	22
2.5 Referências.....	23

Capítulo III Procedimentos experimentais

3.1 Introdução.....	26
3.2 Sala limpa.....	26
3.3 Sistema de purificação da água.....	27
3.4 Materiais.....	28
3.5 Procedimentos.....	28
3.5.1 Técnica do coespalhamento.....	31
3.6 Aparelhos de medidas.....	32
3.6.1 A cuba de Langmuir.....	32
3.6.2 Eletrobalança com sensor de Wilhelmy.....	33
3.6.3 Prova do capacitor vibrante.....	34
3.7 Referências.....	36

Capítulo IV Condutância lateral em filmes de Langmuir

4.1 Introdução.....	37
4.2 Principais técnicas para medir a condução protônica.....	38
4.2.1 Medidas diretas.....	39
4.2.2 Medidas indiretas.....	40
4.2.2a Medidas de volume.....	40
4.2.2b Medidas de superfície.....	42
4.3 Mecanismo de transferência de prótons.....	50
4.4 Um novo sistema de medidas.....	57
4.5 Procedimento experimental.....	62
4.6 Resultados.....	62
4.6.1 Compostos tradicionais.....	63
Álcool araquídico (ALAR).....	63
Dihexadecil fosfato (DHP).....	66
Dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG).....	67
Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC).....	68
Dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC).....	70
4.6.2 Filmes mistos.....	70
Dibucaína-DPPC.....	70
Tetracaína-DPPC.....	71
Dipiridamol-DPPC.....	73
4.6.3 Polímero condutor.....	76
4.7 Discussão.....	76
4.7.1 Natureza da condução.....	77
4.7.2 Área crítica em filmes de Langmuir.....	80
4.7.3 Modelo de transferência de prótons aplicado a filmes de Langmuir...82	
4.7.4 Condutância em filmes de polímeros condutores.....	85
4.8 Conclusão.....	87
4.9 Referências.....	87

Capítulo V Filmes mistos de fosfolipídios e fármacos

5.1 Introdução.....	91
5.2 Filmes de Langmuir de fosfolipídios: um modelo de membrana.....	91
5.2.1 Metodos experimentais para a fabricação de biopolímeros e membranas sintéticas.....	92
5.3 História dos anestésicos.....	93
5.3.1 Classificação dos depressores do sistema nervoso.....	93
5.4 Anestésicos locais.....	94
5.4.1 A farmacologia dos anestésicos locais.....	94
5.4.2 Breve revisão.....	95
5.4.3 Sobre o pK da dibucaína.....	96

5.4.4 Localização dos anestésicos locais.....	97
5.5 Resultados.....	99
5.6 Discussão.....	103
5.7 Referências.....	108

Capítulo VI Conclusões

6.1 Conclusões.....	110
6.2 Trabalhos futuros.....	112
6.2.1 Aperfeiçoamento do sistema de medidas de condutância.....	112
6.2.2 Modelos para a interpretação da condutância lateral.....	113
6.2.3 Interação de fármacos com monocamadas de fosfolípidios.....	114
6.3 Referências.....	115

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Diminuição da dimensão dos dispositivos eletrônicos a partir de 1940 com extrapolação (linha tracejada) para o ano 2020, LSI e VLSI são as siglas de integração em grande escala e integração em muito grande escala respectivamente.....	2
FIGURA 2.1- Curva ΠxA de um composto genérico com longa(s) cadeia(s) alifática(s) e as configurações moleculares de cada fase: A- gasosa, B-líquido-expandida e C- sólida.....	11
FIGURA 2.2- Gráfico de ΠxA do ácido esteárico. A pressão nula indica a fase gasosa. Áreas entre 24-21Å ² correspondem à fase líquido expandida. Abaixo deste intervalo o filme está na fase sólida.....	12
FIGURA 2.3- Curvas de ΠxA de três compostos com um cadeia alifática: ácido esteárico; ácido oléico que possui uma dupla ligação na cauda e C ₁₆ H ₃₇ N(CH ₃) ₃ ⁺ que possui uma cabeça carregada.....	14
FIGURA 3.1 - Representação das estruturas dos compostos tradicionais no estudo de filmes de Langmuir usados nesta tese.....	29
FIGURA 3.2 - Representação da estrutura molecular dos dois anestésicos locais (dibucaina e tetracaina), do vaso dilatador (dipiridamol) e do polímero condutor (PANI).....	30
FIGURA 3.3 - Diagrama esquemático da cuba de Langmuir: 1- Reservatório de água. 2- Barreiras móveis, 3- Eletrobalança com sensor de Wilhelmy. 4- Prova de potencial do capacitor vibrante.....	32
FIGURA 3.4 - Diagrama esquemático do método nulo. Com este circuito as contribuições do volume de água e do "gap" de ar são subtraídos do potencial de superfície.....	35
FIGURA 4.1 Diagrama das cubas do grupo francês 1- monocamada; 2- subfase aquosa; 3- barreiras móveis; 4- agitador; 5- área de observação da fluorescência 6- barreiras de vidro que limitam a área de condução.....	39
FIGURA 4.2 Diagrama da cuba utilizada por Sakurai 1- Apenas a subfase 2- Com monocamada. 3- A curva da condução lateral mostra um aumento de ΔV quando o filme atinge uma concentração crítica.....	42
FIGURA 4.3 1- diagrama do sistema de medidas do grupo de Bangor. 2- detalhe do efeito menisco. 3- curvas do ácido esteárico.....	43
FIGURA 4.4 Resultados obtidos por Menger da pressão de superfície e condutância lateral versus a área por molécula para um fosfolípido.....	44

FIGURA 4.5 Diagrama do sistema de medidas de Shapovalov. 1- eletrodos planos geradores de corrente; 2 eletrodos para o registro do potencial; 3- barreiras flutuantes para eliminar o efeito menisco. σ/σ_0 é a condutância ($\times 10^4$) da subfase com o filme (linha cheia) e sem o filme (linha tracejada).....45

FIGURA 4.6 Diagrama do sistema de anéis concêntricos de Shapovalov. Note que os eletrodos de registro do potencial não estão na área onde adsorve-se a monocamada σ/σ_0 é a condutância ($\times 10^4$) da subfase sem (linha cheia) e com (linha tracejada) o filme.....46

FIGURA 4.7 Diagrama das cubetas de Goryunov e curvas de potencial. O potencial aqui representa condutância, pois foi medido num resistor colocado em paralelo com os eletrodos e submetidos a uma diferença de potencial. 1- A cubeta de vidro possui ΔV_1 positivo; 2- Na cubeta de Teflon ΔV_2 é negativo, pois o material é hidrofóbico.....48

FIGURA 4.8 Modelo de densidade de cargas de Bjerrum para a molécula de água. P indentifica a posição dos prótons, "e" a posição dos elétrons e O a posição do oxigênio.....50

FIGURA 4.9 Diagrama esquemático da propagação do defeito ativo em uma rede. Os círculos pequenos representam prótons. A mudança da posição do próton na rede pode se propagar induzindo a mudança para moléculas vizinhas51

FIGURA 4.10 O próton pula da molécula de água para o íon hidroxila promovendo uma alteração de posição entre eles. A linha tracejada representa a ponte de hidrogênio entre a molécula e o íon.....53

FIGURA 4.11 O oxigênio (O) liga-se a um próton (P), o qual forma uma ponte de hidrogênio com o oxigênio da molécula vizinha, formando uma rede de pontes de hidrogênio que facilita a condução de prótons.....55

FIGURA 4.16 Diagrama esquemático do sistema diferencial de medidas de condutância lateral. Nos terminais A e B registramos a tensão através de um amplificador síncrono.....58

FIGURA 4.13 Diagrama do sistema de medidas da condutância. Utilizamos a fonte geradora do sinal do lock in, com o mesmo registramos o sinal de saída. Os eletrodos são posicionados com seu topo coincidindo com a superfície da água.....60

FIGURA 4.14 - Gráfico de $\Pi \times A$, $\Delta V \times A$ e $\Delta G \times A$ do álcool araquídico.....64

FIGURA 4.15 - Gráfico de $\Pi \times A$, $\Delta V \times A$ e $\Delta G \times A$ para correntes direta e alternada do DHP. Note-se que a amplitude da condutância é aproximadamente a mesma para ambas as correntes. O efeito menisco não está totalmente mostrado na figura.....65

FIGURA 4.16 - O gráfico do dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG) mostra as isotermas de pressão e potencial de superfície e condutância lateral versus a área disponível para uma molécula do lipídio.....67

FIGURA 4.17 - Isotermas de Π , ΔV , $\Delta G \times A$ do DSPC, um fosfolípido com duas caudas hidrofóbicas e uma cabeça polar "zwiteriônica".....	68
FIGURA 4.18 - Gráfico do DPPC para pressão e potencial de superfície e condutância lateral versus a área por molécula. Os resultados obtidos são a média de pelo menos 70 experimentos onde mudamos a diluição em clorofórmio, a quantidade de material adsorvido na água e a velocidade de compressão das barreiras.....	69
FIGURA 4.19 - Isotermas de Π , ΔV e $\Delta G \times A$ do DPPC puro (linha cheia) e do filme misto DIB-DPPC (linha pontilhada) com 25% de anestésico local na mistura.....	71
FIGURA 4.20 - Gráficos de $\Pi \times A$ (linha cheia), $\Delta V \times A$ (linha tracejada) e $\Delta G \times A$ (linha pontilhada) do filme misto coespalhado de TTC-DPPC com 20% de anestésico na mistura.....	72
FIGURA 4.21 - Gráfico de condutância lateral versus a área por molécula do filme misto coespalhado DIP-DPPC para as seguintes concentrações do vaso dilatador: 0% (linha cheia), 0.4% (linha tracejada), 10% (linha pontilhada) e 25% (linha tracejada e pontilhada).....	74
FIGURA 4.22 - O gráfico mostra a variação da condutância do filme de Langmuir de PANI para vários pHs da subfase obtidos pela adição de HCl na água.....	76
FIGURA 4.23 - Modelo de Kiefer. Conforme a distância entre dois núcleos diminui, a energia necessária para o próton transferir-se de um núcleo para o outro também diminui. A aproximação de dois poços (R_2 , R_3) é válida até $2.7\text{\AA}$, após o que a melhor aproximação é a do poço simples (R_1).....	83
FIGURA 4.24 - Aplicação do modelo unidimensional de Kiefer para a previsão da área crítica de filmes de Langmuir de ácidos graxos sobre a água.....	84
FIGURA 5.1 - Resultados de pressão de superfície versus área por molécula de fosfolípido de filmes mistos de TTC-DPPC coespalhados para as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40% de TTC na mistura.....	99
FIGURA 5.2 - Resultados de pressão superficial versus área por molécula de DPPC para filmes mistos de DIB-DPPC coespalhados para as seguintes concentrações: 0, 9.1, 16.6, 25 % de DIB na mistura.....	100
FIGURA 5.3 - Gráfico da área calculada da TTC para a pressão de superfície de 31mN/m versus a concentração de anestésico na mistura coespalhada sobre a água.....	101
FIGURA 5.4 - Gráfico da área calculada para a molécula de DIB para a pressão superficial de 31mN/m versus concentração do anestésico na mistura coespalhada sobre a água.....	101
FIGURA 5.5 - Gráfico de potencial versus área por molécula de fosfolípido da mistura TTC-DPPC.....	102

FIGURA 5.6 - Gráfico do potencial de superfície versus área por molécula de fosfolípido para a mistura coespalhada de TTC-DPPC.....	102
FIGURA 5.7 - Representação da posição ocupada pelos anestésicos locais: a) DIB e b) TTC na matriz de fosfolípido DPPC.....	106

ABSTRACT

A differential system has been developed for overcoming the main difficulties associated with the measurement of an enhanced protonic conductance at the Langmuir film/water interface. These difficulties are: a) small increase in conductance due to the film as compared to the bulk water conductance; b) decrease in the electrode immersed area for surface tensions lower than that of the subphase water; c) obtaining an impurity-free subphase. With the new system the lateral conductance of traditional Langmuir films (possessing amphiphilic molecules with long hydrocarbon tails), of mixed films made up of phospholipid and pharmaceutical drugs and of a conducting polymer. Measurements were also performed of monolayer surface pressure and surface potential. The conductance and surface potential results obtained with the traditional compounds have indicated that the critical area (at which the conductance appears and the surface potential increases abruptly) is the area for which a H-bonded network is formed. The critical area for fatty acids was calculated, employing a unidimensional proton transfer model, which is consistent with the measured value. Results obtained using the differential system with a conducting polymer also show that it is possible to detect an electronic contribution to the lateral conductance. A study of mixed films from phospholipid and local anesthetics (tetracaine and dibucaine) was conducted using the co-spreading technique. This method offers the advantage, compared to the traditionally employed Langmuir adsorption method, of making sure that all changes in the film properties are caused by incorporation of the drugs added to the phospholipid monolayer. Both anesthetics caused the phospholipid matrix to expand. The results showed that tetracaine has stronger hydrophobic interaction than dibucaine, and therefore tetracaine penetrates deeper into the phospholipid matrix.

RESUMO

Um sistema diferencial foi desenvolvido para resolver as principais dificuldades na medida do aumento da condução protônica na interface filme de Langmuir-água, a saber: a) pequeno aumento da condução devido ao filme comparado com a condução da água; b) diminuição da área imersa dos eletrodos para tensões superficiais diferentes da tensão da água; c) obtenção de uma subfase isenta de impurezas. Com o novo sistema mediu-se a condutância de filmes de Langmuir tradicionais (moléculas anfipáticas com cadeias de hidrocarbonos longas), de filmes mistos de fosfolipídio-fármacos e de um polímero condutor. Realizaram-se, também, medidas de pressão de superfície e potencial de superfície. Os resultados da condutância lateral e do potencial de superfície obtidos com os filmes tradicionais indicam que a área crítica (área em que a condutância do filme aparece e o potencial de superfície aumenta abruptamente) é a área em que se forma uma rede de pontes de hidrogênio. Cálculos de área crítica realizados para os ácidos graxos, utilizando um modelo unidimensional para a transferência de prótons, reproduzem os resultados experimentais. Resultados obtidos com o polímero condutor mostram que é possível medir a contribuição eletrônica para a condutância com o novo sistema diferencial. Um estudo de filmes mistos de fosfolipídios-anestésicos locais (tetracaína e dibucaína) foi realizado utilizando a técnica de coespalhamento. Esta técnica tem a vantagem, sobre a de adsorção de Langmuir usada tradicionalmente, de se ter certeza de que todas as mudanças nas propriedades do filme sejam causadas pelos compostos adicionados na monocamada. Ambos os anestésicos expandiram a matriz de fosfolipídios. Os resultados mostraram que a tetracaína possui ligações hidrofóbicas mais fortes que a dibucaína, fazendo com que a tetracaína penetrasse mais profundamente na matriz de fosfolipídio.

Capítulo I

Introdução

1.1 INTRODUÇÃO

A área de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) foi implantada no Grupo de Polímeros Prof. Bernhard Gross em 1991, e desde então uma variedade de estudos tem sido realizada para investigar propriedades fundamentais de materiais simples, tais como os compostos alifáticos, ou o processamento de materiais macromoleculares, como os polímeros condutores. Um filme de Langmuir é formado a partir de moléculas anfipáticas adsorvidas em um líquido de alta tensão superficial, com espessura de uma camada molecular [1]. Os filmes Langmuir-Blodgett (LB) são obtidos através da transferência de monocamadas para um substrato sólido, que pode ser de vidro, quartzo, material semicondutor ou metálico. Para essa transferência, o substrato é imerso e retirado da subfase aquosa, passando pela monocamada que se transfere para o substrato [2]. A repetição desse procedimento permite a deposição de várias camadas em um mesmo substrato. A técnica de Langmuir-Blodgett (LB), em homenagem a dois cientistas americanos Irving Langmuir e Katharine Blodgett, foi aperfeiçoada na década de 1930, mas o princípio de transferência de um filme para um substrato já havia sido utilizado antes da era cristã. A técnica de impressão suminagashi, desenvolvida há milhares de anos no Japão, constituía-se na produção de filmes sobre a superfície da água, depositando-se uma quantidade de proteínas e outras substâncias orgânicas sobre a superfície, colorindo-a [3]. Os padrões formados na técnica suminagashi eram utilizados para estampar tecidos e papéis.

Cientistas retomaram nos anos 60 e 70 o processo de fabricação de filmes ultrafinos pela técnica de Langmuir-Blodgett, que estava esquecida por um longo período. A principal virtude dessa tecnologia é o amplo espectro de aplicação na pesquisa básica, como para a síntese de novos compostos orgânicos, já que compostos para formação dos filmes estão na

fronteira das pesquisas em ciência dos materiais, ou na compreensão das membranas celulares, pois filmes de Langmuir servem como um modelo monomolecular simples das membranas. Modelando uma membrana celular é possível estudar, em nível molecular, a interação de drogas e enzimas com esta. Estudos realizados com a membrana "in vitro" dificultam a interpretação de resultados por as membranas celulares serem constituídas de muitos grupos de biopolímeros. Um outro campo muito promissor é o da fabricação de sensores a partir da técnica de Langmuir-Brodgett, já que os filmes possuem uma espessura fina e muito bem determinada. Alguns autores [1,3] prevêm que a utilização dos filmes LB na confecção de circuitos deve ocorrer por volta do ano 2020, ocasionando uma diminuição no tamanho dos circuitos eletrônicos. Esta previsão é baseada na diminuição das dimensões de circuitos ao longo do tempo, como mostra a figura 1. Como podemos ver, o universo de

FIGURA 1.1 - Diminuição da dimensão dos dispositivos eletrônicos a partir de 1940 com extrapolação (linha tracejada) para o ano 2020, LSI e VLSI são as siglas de integração em grande escala e integração em muito grande escala respectivamente.

aplicações dos filmes LB e filmes de Langmuir é vasto e ocupa espaços nas mais diversas áreas, incluindo física, biologia, química e em várias áreas interdisciplinares. O estudo e caracterização destes filmes é uma aventura maravilhosa diante deste universo.

1.1.1 A MOTIVAÇÃO PARA O PRESENTE PROJETO

* Estudo da condutância em filmes de Langmuir para verificar existência de condução protônica nos filmes, que seria indicativo de transporte de prótons ao longo das membranas celulares e daria suporte à teoria da quimiosmose localizada. É dada continuidade ao trabalho de mestrado [4], agora com o desenvolvimento de uma nova montagem experimental para permitir maior confiabilidade dos resultados experimentais.

* Nesta tese também é introduzida e explorada a abordagem de produção de filmes de Langmuir por coespalhamento (co-spreading). Como será discutido mais tarde, essa nova abordagem traz grandes vantagens no estudo de interação de fármacos com filmes de Langmuir de fosfolípidios, que simulam, de maneira simples, uma membrana celular.

1.1.2 ESTRUTURA DA TESE

No Capítulo II faremos uma revisão das principais técnicas para a caracterização de filmes de Langmuir, preparando os leitores para o entendimento dos resultados e discussão sobre eles. Nele traremos o conceito de pressão de superfície, de potencial de superfície e de filmes mistos. Apresentaremos os principais modelos para explicar as medidas de potencial nos filmes. No Capítulo III mostraremos nossos procedimentos experimentais, assim como nossos equipamentos. Será enfatizada a necessidade de limpeza para obtenção de bons resultados, e as diferenças entre as técnicas para a montagem de filmes mistos: adsorção de Langmuir e coespalhamento.

O Capítulo IV mostrará nossos resultados de condutância lateral para filmes de

Langmuir formados por: compostos tradicionais, filmes mistos coespalhados e filmes de um polímero condutor. Faremos uma revisão dos principais artigos de condutância lateral em filmes de Langmuir. As técnicas diretas e indiretas de medidas de transporte de cargas serão apresentadas, nestas situaremos as medidas de condutância lateral em filmes de Langmuir. Discutiremos o mecanismo de condução de prótons, fornecendo evidências de que a condução é ocasionada por pulos de prótons seguidos de uma rotação da molécula (mecanismo chamado de *hop and turn*). Os resultados obtidos serão discutidos em termos da área crítica (em comparação com a área crítica do potencial de superfície) e da intensidade das medidas de condutância. Um novo sistema de medidas será descrito, com o qual foi possível resolver as principais dificuldades das medidas de condutância lateral em filmes de Langmuir. Tais dificuldades, também apresentadas por pesquisadores de outros países, serão citadas e discutidas. Finalmente mostraremos que nosso novo sistema de medidas permite medir a condutância para subfases com diferentes pHs.

O capítulo V é reservado para o estudo de filmes mistos de relevância farmacológica. A importância dos anestésicos locais, sua ação farmacológica e uma divisão dos depressoires do sistema nervoso serão brevemente relatados. As vantagens da técnica do coespalhamento serão apresentadas. Medidas de potencial e pressão de superfície, para várias concentrações de anestésico local coespalhado com uma matriz de fosfolipídio, serão apresentadas e discutidas. Nossos resultados fornecerão evidências para propor possíveis localizações dos dois anestésicos estudados: dibucaína e tetracaína. Por fim, o Capítulo VI mostrará as principais conclusões deste trabalho e indicará trabalhos futuros.

1.2 REFERÊNCIAS

[1] G. G. Roberts; Langmuir Blogett Films, Plenum Press, N. Y. 1990

Capítulo II

Revisão sobre filmes de Langmuir

2.1 - INTRODUÇÃO

Filmes de Langmuir são formados a partir de pequenas quantidades de moléculas anfipáticas, que possuem uma parte hidrofóbica e uma hidrofílica, adsorvidas em uma superfície suficientemente extensa de um líquido de alta tensão superficial. Se a molécula for atraída mais fortemente pelo líquido do que por outras moléculas [1], será formada uma monocamada sobre a superfície do líquido. O fenômeno da formação de filmes sobre a superfície da água já era conhecido desde antes da era Cristã [2]. No final do século XVIII, Benjamin Franklin realizou o primeiro trabalho científico com filmes de óleo sobre um pequeno lago em Londres. Na mesma época foi patenteado um dispositivo, por um escocês chamado John Shields, que jorrava óleo no mar [2]. Seu intuito era acalmar mares bravios facilitando o atracamento dos barcos. O óleo depositado sobre a superfície da água forma uma película muito fina, que diminui a intensidade das ondas ou ondulações da água.

Lord Rayleigh propôs que uma gota de óleo colocada em uma superfície de água suficientemente extensa espalharia até alcançar a espessura de uma única molécula. Contudo, foi no início do século XX que Irving Langmuir introduziu o uso de substâncias puras, principalmente ácidos graxos, para a produção de filmes sobre a superfície da água. Graças ao seu trabalho, teórico e experimental, a área que pesquisa monocamadas sobre a superfície de líquidos foi consolidada [3].

Para formar filmes de Langmuir pode ser usada água ou soluções aquosas. O surfactante contido em solução de solvente volátil, depositado em uma superfície líquida, espalha-se sobre toda esta e o solvente evapora. Para criar uma monocamada é necessário que as moléculas do filme (a ser formado), antes de seu empacotamento, não interajam fortemente uma com as outras. Este estado, ou seja, o estado em que as moléculas não interagem entre si é denominado estado gasoso ou fase gasosa. Quando as moléculas do

surfactante estão empacotadas estas alcançam um alto ordenamento; o estado do filme de maior ordenamento é conhecido como fase sólida ou estado líquido-condensado. O estado intermediário, em que as moléculas já interagem, mas não estão totalmente ordenadas, é denominado estado líquido-expandido ou fase líquida.

O empacotamento de filmes de Langmuir é realizado numa Cuba de Langmuir, a qual consiste basicamente de um reservatório (cuba) para a subfase líquida, barreiras móveis que vinculam apenas as moléculas do filme e um sensor de pressão. A utilização de água e soluções aquosas ao invés de outros líquidos de alta tensão superficial (por exemplo, mercúrio) se deve ao fato que é mais fácil e barato obter água ultrapura do que outros líquidos.

2.2 - FORÇAS INTERMOLECULARES

A pressão de superfície em um filme de Langmuir é oriunda de várias interações entre as moléculas do filme e também entre moléculas do filme e a água da subfase.

A mais importante força intermolecular é conhecida como força de van der Waals. Por simplicidade, consideremos primeiro a interação de dois átomos suficientemente distantes para que não possa haver ligação covalente. A densidade de carga eletrônica terá seu centro fluando dependendo da posição do núcleo do átomo. Isto resultará em um dipolo elétrico fluante; o campo elétrico resultante tenderá a produzir uma polarização no outro átomo, cujo campo reagirá ao campo do primeiro átomo. Para este simples caso, a energia de interação entre os dois átomos é:

$$W(r) = -\frac{3\alpha_1\alpha_2I_1I_2}{2(4\pi\epsilon_0)^2 r^6(I_1+I_2)} \quad (1)$$

onde α é a polarizabilidade dos átomos 1 e 2, I é o potencial de ionização, r a distância entre os dois núcleos e ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo. Esta expressão é aproximada, pois várias simplificações foram usadas na sua dedução:

a) Na Hamiltoniana para o sistema, a expressão para a energia potencial associada às interações entre os dois átomos é inversamente proporcional a r . A mais baixa ordem dos termos que não são nulos é inversamente proporcional a r^3 , a qual leva a uma dependência com r^6 , quando se calcula a energia do estado fundamental do sistema. Termos de multipolos de ordem superior são ignorados por decaírem muito rapidamente com o aumento de r .

b) Os cálculos por perturbação que levam à equação acima envolvem todos os estados excitados do átomo de paridade ímpar. A diferença entre a energia destes estados e do estado fundamental do átomo não perturbado é tomada como sendo igual à energia de ionização. Isto claramente não é real, mas é sempre uma boa aproximação.

c) Nos sistemas de vários átomos, aparecem termos envolvendo a distância entre grupos e a orientação de grupos de três, quatro ou mais átomos. Sua energia, que é aproximadamente 15% da energia na equação acima, é, entretanto, desprezada.

A maioria das outras forças atrativas importantes pode ser explicada por termos eletrostáticos. A mais simples delas é a energia de interação entre dois íons monovalentes esféricos com cargas opostas. Sua equação é dada abaixo:

$$W(r) = -\frac{q^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon r} \quad (2)$$

onde ϵ é a permeabilidade relativa do meio e q a carga do íon.

A energia de interação entre um íon e uma molécula esférica não carregada possuindo uma polarizabilidade α é:

$$W(r) = -\frac{\alpha q^2}{2(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2 r^3} \quad (3)$$

Claramente uma molécula não pode ser tratada como uma esfera, mas é uma aproximação usual na maioria dos casos.

A energia de interação entre um dipolo fixo e uma molécula simétrica esférica polarizável depende do ângulo Θ entre o eixo do dipolo e a linha que passa no centro da molécula e no dipolo. Para um dipolo com momento μ , o campo a uma distância r e um ângulo Θ é dado por:

$$E = \frac{\mu(1+3\cos^2\theta)^{\frac{1}{2}}}{4\pi\epsilon_0 r^3} \quad (4)$$

e a energia de interação é:

$$W(r,\theta) = -\frac{\mu^2\alpha(1+3\cos^2\theta)}{2(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2 r^6} \quad (5)$$

Como podemos ver a energia varia com o inverso de r^6 como a energia de van der Waals. A razão para esta dependência da distância é óbvia. O campo causado pelo dipolo varia com o inverso da distância ao cubo induzindo um dipolo na molécula. Este dipolo molecular produz um campo que varia inversamente com r^3 .

Para dois dipolos intrínsecos, a energia de interação é dada por:

$$W(r,\theta_1,\theta_2,\phi) = \frac{\mu_1\mu_2(\sin\theta_1\sin\theta_2\cos\phi - 2\cos\theta_1\cos\theta_2)}{4\pi\epsilon_0\epsilon r^3} \quad (6)$$

onde Θ_1 e Θ_2 são os ângulos entre a linha entre os dipolos e os eixos dos dipolos 1 e 2 respectivamente, os quais possuem momentos μ_1 e μ_2 . ϕ é o ângulo azimutal entre os dipolos.

As forças intermoleculares descritas acima serão utilizadas para descrever as interações entre as moléculas de filmes de Langmuir na seção 2.3.1.

2.3 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

O estudo de filmes de Langmuir é realizado através da análise das mudanças nas suas propriedades, tais como empacotamento, orientação e ionização das moléculas. Apresentaremos neste tópico as técnicas de caracterização usadas no desenvolvimento deste trabalho.

2.3.1 - PRESSÃO DE SUPERFÍCIE

A adsorção de surfactantes sobre a superfície de um líquido fará com que a tensão superficial da mistura seja menor que a do líquido puro [4]. Isto se dá pela tendência de as moléculas do surfactante se repelirem em contraponto com as moléculas do líquido puro, que tendem a se contrair. Sendo a tensão superficial do líquido puro σ_0 , e a tensão da mistura σ , define-se a pressão de superfície como:

$$\Pi = \sigma_0 - \sigma \quad (7)$$

As mudanças de fases podem ser identificadas pela curva de pressão de superfície versus área por molécula. Isto é o equivalente bidimensional da isoterma de pressão versus volume do sistema gás-líquido-sólido. A figura 2.1 mostra um gráfico hipotético para um composto anfipático de longa(s) cadeia(s) alifática(s). O gráfico não representa todos os

Figura 2.1- Curva $\Pi \times A$ de um composto genérico com longa(s) cadeia(s) alifática(s) e as configurações moleculares de cada fase: A- gasosa, B-líquido-expandida e C- sólida.

compostos anfipáticos, mas oferece uma descrição detalhada das fases ou estados dos filmes de longas cadeias de hidrocarbonos.

No estado gasoso, as moléculas da monocamada estão suficientemente distantes para não atuarem entre si. Quando se diminui a área superficial disponível para a molécula, as cadeias de hidrocarbonos começam a interagir. O estado líquido, ou fase líquido-expandida, é formado. As cadeias de hidrocarbonos das moléculas neste estado possuem uma organização aleatória, contudo sua orientação é determinada por sua anfipaticidade, seus grupos polares estão sempre em contato com a subfase. Se a área por molécula for progressivamente diminuída, a fase líquido-condensada ou estado sólido pode aparecer. As moléculas no estado sólido estão totalmente empacotadas, sua área é a menor possível e é igual à área da secção transversal da cadeia de hidrocarbonos (cerca de $20\text{\AA}^2$ para compostos

de uma cadeia e $40\text{\AA}^2$ para compostos com duas cadeias). Além disso, cada vez que uma nova fase surge pode ser inicialmente acompanhada por uma patamar de pressão constante (como o da figura 2.1). Estas etapas estão associadas a mudanças de entalpia na monocamada [5].

Figura 2.2- Gráfico de $\Pi \times A$ do ácido esteárico. A pressão nula indica a fase gasosa. Áreas entre $24\text{-}21\text{\AA}^2$ correspondem à fase líquido expandida. Abaixo deste intervalo o filme está na fase sólida.

As monocamadas podem ser comprimidas para pressões maiores que a pressão de espalhamento. A pressão de superfície continua a subir com a diminuição da área por molécula até o ponto em que não é mais possível comprimir o filme. Ou seja, qualquer diminuição na área por molécula leva a uma situação em que a pressão passa a ser constante ou decai. A este fenômeno chamamos de colapso do filme [6].

A curva de pressão de superfície do ácido esteárico, um dos surfactantes mais

conhecidos e tradicionais para o estudo de filmes de Langmuir, pode ser vista na figura 2.2. A primeira parte, para grandes áreas por molécula onde as moléculas não interagem entre si, corresponde à fase gasosa. A tensão deste estado é constante e igual à tensão superficial da subfase. A tensão de superfície da água é igual a 72,3 mN/m na temperatura ambiente. Para áreas de $24\text{\AA}^2$ até aproximadamente $21\text{\AA}^2$ há um incremento na pressão de superfície mostrando que as moléculas do filme começam a interagir. Esta fase líquido-expandida coincide com o raio de interação de van der Waals. Quando a pressão de superfície aumenta muito rapidamente para pequenas mudanças na área por molécula o filme está no estado condensado, em que a área disponível por molécula é $20\text{\AA}^2$, ou seja, a área da secção transversal da cadeia de hidrocarbonos. Para áreas menores que esta o filme colapsa. Para moléculas mais complicadas, ou seja, moléculas que não possuem sua parte hidrofílica e hidrofóbica distintas, a interpretação da curva de pressão de superfície se torna mais difícil. Contudo, ainda se pode observar a adsorção das moléculas na superfície assim como a área que estas ocupam [7].

Através de curvas de pressão superficial é possível analisar sistemas com mais que um surfactante. Um cientista familiarizado com este tipo de caracterização pode responder onde e como as moléculas estão agrupadas através das mudanças no empacotamento da matriz (filme de Langmuir em que se adiciona um segundo componente). Uma mudança acentuada na curva de $\Pi \times A$ quando se adiciona um segundo componente é geralmente causada por interações hidrofóbicas fortes entre os dois componentes. Já se a curva de pressão de superfície versus área por molécula é aproximadamente a mesma que a curva da matriz pode-se concluir que o segundo componente não realiza interações hidrofóbicas fortes. Cabe ressaltar que esta discussão é válida para compostos nos quais as forças de van der Waals prevalecem sobre as demais forças eletrostáticas.

No sub-item 2.2 descrevemos as principais forças intermoleculares. Apresentaremos

agora três curvas de $\Pi \times A$ (fig. 2.3) e comentaremos como as forças intermoleculares determinam as suas formas. Para a curva do ácido esteárico vemos que as forças intermoleculares são muito fracas até próximo da área (disponível para a molécula) do raio de interação de van der Waals ($24 \text{ \AA}^2$). Quando se diminui esta área, a pressão de superfície aumenta rapidamente e o filme alcança com uma pequena diminuição da área o

Figura 2.3- Curvas de $\Pi \times A$ de três compostos com uma cadeia alifática: ácido esteárico; ácido oléico que possui uma dupla ligação na cauda e $C_{16}H_{37}N(CH_3)_3^+$ que possui uma cabeça carregada

estado condensado ($20 \text{ \AA}^2$). A baixa compressibilidade do filme mostra que há agora uma grande repulsão entre as cadeias das moléculas do ácido esteárico para áreas muito próximas de $20 \text{ \AA}^2$. De fato esta é a área da seção transversal das cadeias de hidrocarbonos. Para áreas no intervalo de $24 \text{ \AA}^2 - 20 \text{ \AA}^2$ por molécula, o filme consiste de ilhas ou domínios, as quais foram formadas pelas forças coesivas de van der Waals entre as caudas hidrofóbicas das moléculas do ácido esteárico.

Se, agora, introduzimos uma dupla ligação na cadeia hidrofóbica, aumenta drasticamente a interação da cauda com a água, pois a dupla ligação confere caráter levemente hidrofílico. A curva $\Pi \times A$ do ácido olêico mostra que esta substância é mais expandida que os filmes de ácido esteárico. Neste tipo de filme a dupla ligação é responsável por uma interação do tipo dipolo-dipolo ($\propto 1/r^3$) que é de maior alcance que as forças de van der Waals ($\propto 1/r^6$).

A presença de cargas elétricas nas moléculas que formam o filme aumenta sua pressão de superfície. A terceira curva de $\Pi \times A$ mostra que a pressão exercida por um filme ionizado é muito maior comparada a uma monocamada não ionizada, devido à repulsão iônica entre as moléculas ionizadas do filme. Apesar de a força de van der Waals estar presente, esta começa a ser mais efetiva para curtas distâncias, sendo que para grandes distâncias a força do tipo íon-íon prevalece.

2.3.2 - POTENCIAL DE SUPERFÍCIE

Os modelos de potencial de superfície para filmes de Langmuir relacionam os dipolos permanentes das moléculas com a amplitude do potencial medido, fornecendo dados sobre a estruturação do filme. O primeiro modelo utilizado para o potencial de superfície foi o modelo de Helmholtz [8]. Nele, a monocamada, ou mais precisamente os dipolos elétricos da monocamada, é tratada como um capacitor de placas paralelas. Pode-se obter a equação de Helmholtz para o potencial dos filmes de Langmuir como descrito abaixo:

Considerando uma distribuição homogênea de dipolos elétricos em um plano infinito como em um capacitor de placas paralelas [8], a capacitância é descrita por:

$$C = \frac{D\epsilon_0 A}{l} \quad (8)$$

onde A é a área do capacitor, l a distância entre as placas, D a constante dielétrica do meio e ϵ_0 a permissividade do vácuo. Sendo a capacitância igual à razão entre a carga total pelo potencial entre as placas tem-se que $C=q/\Delta V$, podemos escrever:

$$\Delta V = \frac{ql}{AD\epsilon_0} \quad (9)$$

Como o momento de dipolo é igual ao produto da carga e a distância temos:

$$\Delta V = \frac{\mu_{\perp}}{D\epsilon_0 A} \quad (10)$$

Esta equação que relaciona o potencial com o momento de dipolo é conhecida como equação de Helmholtz, e serve de modelo para o potencial de superfície de filmes de Langmuir no estado condensado. Para tal denominamos A como a área por molécula, D como a constante dielétrica do filme e μ o momento de dipolo orientado perpendicularmente à superfície da água.

Quando o filme está no estado condensado, para compostos simples pode-se calcular teoricamente o momento de dipolo e estimar o potencial, uma vez que o filme está totalmente estruturado com as moléculas igualmente organizadas sobre a superfície do líquido. Há uma discrepância entre os resultados dos momentos de dipolos calculados a partir do modelo de Helmholtz e os resultados obtidos do valor observado experimentalmente para o potencial de superfície de filmes de Langmuir. Os valores calculados com a equação de Helmholtz para moléculas tradicionais (como ácidos graxos, álcoois e ésteres) são muito superiores. A discrepância dos resultados é usualmente atribuída a um valor incorreto da constante dielétrica do meio [6].

O modelo de Helmholtz foi inicialmente aperfeiçoado por Davies e Rideal [9] que

parametrizaram as contribuições do momento de dipolo da molécula e da água. O modelo de Davies e Rideal é apresentado na equação 11.

$$\Delta V = \frac{1}{D\epsilon_0 A} \sum_{i=1}^3 \mu_i \quad (11)$$

onde i refere-se: à parte hidrofóbica ou cauda, à parte hidrofílica ou cabeça polar e à camada de água reorientada. Na presença de uma monocamada, as camadas mais superficiais de água se reorientam devido à interação com as moléculas do filme. Como a molécula da água possui um momento de dipolo intrínseco, a interação com as moléculas do filme podem ser: íon-dipolo, se a cabeça polar do filme estiver carregada, ou dipolo-dipolo, se o filme for neutro. Um refinamento do modelo de Davies e Rideal foi proposto por Demchak e Fort [10].

2.3.2a - Modelo DF

Os modelos de Helmholtz e o modelo de Davies e Rideal consideravam o filme de Langmuir como um único dielétrico. A contribuição de Demchak e Fort foi a de considerar o filme como um dielétrico de três camadas (fig. 2.1): cauda hidrofóbica, cabeça polar e a água reorientada. Segundo o modelo DF:

$$\Delta V = \frac{1}{A\epsilon_0} \sum_{i=1}^3 \left(\frac{\mu}{D} \right)_i \quad (12)$$

em que cada camada tem sua respectiva constante dielétrica, possibilitando uma maior aproximação entre o momento dipolar calculado teoricamente e o observado experimentalmente. Escrevendo:

$$\mu_{\perp} = \frac{\mu_1}{D_1} + \frac{\mu_2}{D_2} + \frac{\mu_3}{D_3} \quad (13)$$

onde 1 denota a contribuição da reorientação das moléculas de água, 2 a contribuição da cabeça polar e 3 a contribuição da cauda, Demchak e Fort observaram o potencial de superfície de vários compostos terfenílicos, ora com caudas iguais, ora com cabeças polares iguais. Com base nesses resultados e usando dados da literatura sobre os momentos de dipolo das partes polar e hidrofóbica das moléculas, Demchak e Fort obtiveram os seguintes resultados para as constantes dielétricas: $D_3 = 5.3$ e $D_2 = 7.6$. A contribuição da reorientação das moléculas de água foi usada como parâmetro de ajuste. Propuseram um valor de 40 mD para ajustar os valores experimentais aos valores teóricos.

Os resultados apresentados por DF para as constantes dielétricas são excessivamente altos para compostos alifáticos, como foi demonstrado por Oliveira et al [11]. Baseados em estudos apresentados na literatura para potenciais de filmes obtidos a partir de compostos halogenados [12], Oliveira et al [11] analisaram resultados da parte apolar, em que apenas a parte hidrofóbica era trocada. Como os momentos de dipolo e constantes dielétricas da reorientação da água e da parte polar da molécula permaneciam inalterados, foi possível obter a constante dielétrica da parte hidrofóbica D_3 a partir de μ_3 . Os resultados encontrados para parte hidrofóbica dos compostos alifáticos, $D_3 = 2.8$, levaram a uma melhor aproximação dos resultados da literatura para μ_3 .

Oliveira [6] sugeriu que apesar de o modelo DF ser um avanço no entendimento do potencial de superfície de filmes de Langmuir, diferentes valores de μ_1/D_1 , D_2 e D_3 são necessários para diferentes classes de compostos, como é o caso de Dynarowicz e Paluch [13,14] que realizaram primeiramente medidas em ácido acético, ácido tricloroacético e álcoois obtendo os seguintes valores: $D_2 = 4.2$ e $D_3 = 2.4$ (1.7 para os álcoois) para um ajuste

de μ_1/D_1 entre 100 e 200 mD e posteriormente os valores de $D_2 = 1.4$ e $D_3 = 1.0$ com $\mu_1/D_1 = 100\text{mD}$ para grupos aromáticos. Os filmes adsorvidos sobre a superfície da água de Dynarowicz e Paluch não são considerados filmes de Langmuir. Todavia, como no caso dos filmes de Langmuir, a constante dielétrica da parte polar da molécula é consistentemente maior que D_3 . Para os compostos alifáticos estudados por Oliveira [6] os valores obtidos para a constante dielétrica da parte polar da molécula e do parâmetro de ajuste da água foram $D_2 = 6.4$ e $\mu_1/D_1 = -65$ mD respectivamente.

Os trabalhos discutidos acima referem-se apenas a filmes no estado sólido. Análises para filme nos estados líquido e gasoso eram complicados por: a) desconhecimento da orientação das moléculas e b) irreprodutibilidade dos resultados para grandes áreas por molécula. Com o avanço nos métodos de purificação da água foi possível obter resultados reprodutíveis para filmes expandidos [15]. Oliveira Jr. e co-autores estenderam a utilização do modelo DF para um filme expandido do ácido esteárico [16]. A análise quantitativa realizada só foi possível a partir de uma importante constatação: o aumento abrupto para o potencial de superfície para uma área que se denominou área crítica, A_c , é causado por um decréscimo - também abrupto - da constante dielétrica da interface filme água, D_2 . Os autores chegaram a esta conclusão porque a reorientação de dipolos na A_c não poderia ser tão drástica. Nesta região a área disponível para a molécula é relativamente restrita, de forma que a molécula já se encontra parcialmente orientada. D_3 aumenta com a compressão do filme diminuindo o potencial medido, e a contribuição da reorientação da água é relativamente menor. De qualquer forma, uma mudança drástica na contribuição da água equivaleria a mudar drasticamente algo na interface. Assim, a constante dielétrica da interface filme-água, tomada como sendo 78.5 (constante dielétrica da água) para áreas maiores que a área crítica, decai para 6.4 no estado sólido para a monocamada de ácido esteárico, causando um aumento abrupto do potencial.

2.3.2b - Potencial da dupla camada.

Alguns filmes de Langmuir são ionizados, ou parcialmente ionizados para certos pHs da subfase. Havendo ionização, aparece a dupla camada constituída pelos grupos ionizados na camada e pelos contra-íons da subfase, pois existirá uma migração de cargas na subfase em direção à superfície para equilibrar a densidade de carga líquida do filme. Esta dupla camada contribui positivamente (se a carga do filme for positiva) para o potencial de superfície, podendo inclusive ser considerada como uma camada adicional de dipolos elétricos. Ψ_0 é a contribuição da dupla camada para o potencial de superfície.

Usando o exemplo de um filme de Langmuir ionizado negativamente, como é o caso do ácido esteárico, mostraremos agora o formalismo da dupla camada. A variação do pH da subfase para valores mais básicos (pHs altos) faz com que a molécula do ácido perca um próton para a subfase dando ao filme uma densidade líquida negativa de carga. Como na subfase há íons, existirá uma migração de cargas positivas; desta maneira a concentração de cátions será maior na vizinhança do filme do que no interior da subfase. Gouy [17] e Chapman [18] formularam, de maneira independente, uma teoria para a dupla camada, baseada nas seguintes hipóteses: a superfície carregada (no caso o filme de Langmuir) deve ser impenetrável e uniformemente carregada; os contra-íons devem ser tratados como pontuais e distribuídos na subfase de acordo com a equação de Boltzmann. Gouy e Chapman resolveram a equação de Poisson utilizando estas hipóteses, em que a distribuição de íons era descrita em termos de um potencial Ψ próximo à superfície carregada. A energia potencial é dada por $ze\Psi$, onde z é o número atômico e " e " a carga do elétron. A probabilidade de se encontrar um íon a certa distância da superfície é dada por $e^{(-ze\Psi/KT)}$, de forma que a concentração de íons pode ser dada por:

$$n^{\pm} = n_0 \exp^{\pm \left(\frac{ze\psi}{kT} \right)} \quad (14)$$

sendo que a densidade líquida, ρ , é igual a.

$$\rho(x) = ze(n^{+} - n^{-}) \quad (15)$$

Esta densidade quando integrada no volume da subfase deve equivaler à densidade superficial.

$$\sigma = \int_0^{\infty} \rho(x) dx \quad (16)$$

e finalmente o potencial da dupla camada pode ser escrito da seguinte maneira:

$$\psi_0 = \frac{2kT}{e} \sinh^{-1} \left[\frac{e\alpha}{A(5,88 \cdot 10^{-7} c \epsilon T)^{\frac{1}{2}}} \right] \quad (17)$$

ψ_0 é, portanto, a diferença de potencial entre a superfície carregada e uma referência no interior da subfase, longe da região da dupla-camada.

As limitações dessa abordagem são devidas às aproximações introduzidas. Um modelo mais realista deve considerar também: a) a queda da constante dielétrica da água próxima à superfície. b) a polarização da água devido à indução pelas cabeças polares. c) e o volume, não desprezível, dos íons. Na situação real íons específicos podem ser adsorvidos nas cabeças polares da monocamada ou podem penetrá-la, contudo os íons na solução estão, geralmente, solvatados (envolvidos por moléculas de água orientadas) e a distância mínima que podem se aproximar da superfície deve ser maior que o raio da solvatação.

O modelo teórico de Gouy-Chapman para a dupla camada é geralmente proposto

como válido para baixa concentração iônica e baixa densidade de cargas superficiais. Segundo simulações teóricas, espera-se que a teoria de Gouy-Chapman seja uma boa aproximação quando $\sigma \leq 0.2 \text{ Cm}^{-2}$ e $c \leq 0.1 \text{ M}$ [19]. Oliveira Jr [6] em sua tese notifica que mesmo quando σ excede 0.2 Cm^{-2} a teoria de Gouy-Chapman pode ser aplicada com sucesso, provavelmente porque há compensação dos efeitos não contemplados na teoria.

Uma consequência importante da dupla camada é a mudança do pH da interface, pH_s .

$$\text{pH}_s = \text{pH}_b + \left(\frac{e\psi}{2.3KT} \right) \quad (18)$$

onde pH_b é o pH do volume da solução e "e" ($1.60 \cdot 10^{-19} \text{C}$) é a carga eletrônica.

2.4 - FILMES MISTOS

O interesse em eletrônica molecular e bio-engenharia tem levado cientistas a estudarem sistemas de monocamadas mistas. A produção de filmes mistos de Langmuir é atraente por quatro razões principais. A primeira está relacionada a estudos fenomenológicos de filmes de Langmuir [20,21], como é o caso do trabalho de Vogel e Möbius [20] em que produziam filmes com terminais das caudas hidrofóbicas diferentes (um com terminal CH_3 e outro com terminal CF_3) para investigar a interação entre os filmes componentes. Uma segunda razão é a tentativa de melhorar as propriedades de um dos componentes do filme misto [22,23]. Como exemplo, adiciona-se ácido esteárico a polímeros condutores para melhorar a estabilidade do polímero sobre uma subfase líquida, possibilitando uma melhor transferência deste para um substrato sólido [23].

A incorporação de sondas na monocamada é usual no estudo de filmes de Langmuir [24-27]. Os filmes mistos assim formados podem ser estudados por técnicas como a

espectroscopia de fluorescência, o que não seria possível sem a adição da sonda. Esta é a terceira razão para se estudar filmes mistos. No último tipo de estudo de filme misto, uma matriz é criada para possibilitar a investigação de outras substâncias [28-31], as quais não formariam filmes de Langmuir sozinhas, por não terem as propriedades anfipáticas requeridas. Por exemplo, pode-se criar uma matriz de fosfolipídios para adicionar substâncias de ação farmacológica e/ou enzimas que são solúveis em água.

O arranjo preciso da monocamada pode ser identificado pelo estudo das propriedades desta variando-se a concentração dos componentes. Se os componentes individuais são imiscíveis, o filme pode ser considerado como duas monocamadas separadas. A área ocupada pelo filme será a soma das áreas das monocamadas separadas, por exemplo: sendo a_1 e a_2 as áreas por molécula dos componentes 1 e 2 para uma mesma pressão e x_1 e x_2 suas respectivas frações molares, a área por molécula do filme contendo os componentes 1 e 2 é:

$$a_{12} = x_1 a_1 + x_2 a_2 \quad (19)$$

para uma mesma pressão de superfície. Qualquer desvio desta relação evidencia a miscibilidade dos componentes. Regras, usando o mesmo procedimento, podem ser usadas para outras propriedades, tais como pressão e potencial de superfície. A soma da pressão superficial e do potencial de superfície para filmes de componentes imiscíveis deve ser igual à soma dos valores do potencial e pressão dos filmes formados a partir de cada componente.

2.5 - REFERÊNCIAS

- [1] J. T. Davies e E. K. Rideal; Interfacial Phenomena, Academic Press Inc. San Diego, EUA, 1962
- [2] O. N. Oliveira Jr. e D. M. Taylor; Ciência Hoje 12 (1990) 18

- [3] A. Cavalli; Dissertação de mestrado, São Carlos, Brasil 1993
- [4] A. W. Adamson; Physical Chemistry of Surfaces, Wiley Interscience, EUA, 1982
- [5] M. C. Petty; Langmuir-Blodgett Films, Cambridge University Press, Cambridge 1996
- [6] O. N. Oliveira Jr.; PhD Thesis, Bangor, Reino Unido, 1990
- [7] G. G. Roberts; Langmuir-Blodgett Films, Plenum Press, N. Y. 1990
- [8] A. Noblet, H. Ridelaire e G. Sylin; J. Phys. E. Sci. Instrum. 17 (1984) 234
- [9] J. T. Davies e E. K. Rideal; J. Phys. 33 (1955) 947
- [10] R. J. Demchak and T. J. Fort; J. Coll and Interf. Sci. 46 (1974) 191
- [11] O. N. Oliveira Jr., D. M. Taylor, T. J. Lewis, S. Salvagno e C. J. M. Stirling; J. Chem. Soc. Faraday Trans. I 85 (1989) 1009
- [12] C. P. Smyth; Dielectrical behaviour and structure, Mac Graw Hill, NY, 1955
- [13] P. Dynarowicz e M. Paluch; J. Coll. and Interf. Sci. 107 (1985) 75
- [14] P. Dynarowicz e M. Paluch; J. Coll. and Interf. Sci. 115 (1987) 307
- [15] D. M. Taylor, O. N. Oliveira Jr. e H. Morgan; Thin Solid Films 173 (1989) L141
- [16] O. N. Oliveira Jr, D. M. Taylor e H Morgan; Thin Solid Films 210 (1992) 76
- [17] G. Gouy; J. Phys. 9 (1910) 457
- [18] D. L. Chapman; Philos. Mag. 25 (1913) 475
- [19] S. L. Carnie, D. Y. C. Chan, D. J. Michell e B. W. Ninham, J. Chem. Phys. 74 (1981) 1472
- [20] V. Vogel e D. Möbius; J. Colloid Interface Sci. 126 (1988) 408
- [21] C. A. Helm, L. Laxhuber, M. Lösche e H. Möhwald; Colloid & Polymer Sci. 264 (1986) 46
- [22] R. C. Ahuja, M Matsumoto e D. Möbius, J. Phys, Chem. 96 (1992) 1855

- [23] A. Dhanabalan, A. Riul Jr. e O. N. Oliveira Jr.; submetido à *Supramolecular Science*
- [24] B. Gabriel e J. Tessié; *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8818
- [25] B. Gabriel, M. Prats e J. Tessié; *Biochim. Biophys. Acta* 1186 (1994) 172
- [26] J. Tessié, M. Prats, P. Soucaille e J. F. Tocanne; *Proc Natl. Acad. Sci.* 82 (1985) 3217
- [27] M. Prats, J. F. Tocanne e J. Tessié; *J. Memb. Biol.* 99 (1987) 225
- [28] G. P. Borissevitch, M. Tabak, e O. N. Oliveira; *Biochim. Biophys. Acta* 1278 (1996) 12
- [29] G. P. Borissevitch, M. Tabak, I. E. Borissevitch e O. N. Oliveira Jr.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7 (1996) 69
- [30] A. Seelig; *Biochim. Biophys. Acta* 899 (1987) 196
- [31] A. Seelig, P.R. Allegrini e J. Seelig; *Biochim. Biophys. Acta* 939 (1988) 267

Capítulo III

Procedimentos experimentais

3.1- INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresentaremos as técnicas experimentais utilizadas na formação de filmes de Langmuir e sua caracterização. Nos procedimentos experimentais descreveremos os cuidados com a limpeza e remoção de impurezas a serem tomados para a produção de filmes de Langmuir de boa qualidade. Por se tratar de sistemas moleculares, é essencial que todos tipos de contaminação sejam evitados, tanto no ambiente em que se realizam as experiências como nos materiais utilizados para a fabricação dos filmes. As cubas de Langmuir estão instaladas dentro de uma sala limpa, os equipamentos de caracterização e parte do sistema de purificação da água também se encontram dentro da sala limpa.

3.2- SALA LIMPA

Nosso laboratório está localizado em uma área limpa, fechada e acondicionada para minimizar a quantidade de impurezas no ar e manter a temperatura no intervalo de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. A troca de ar é feita por um sistema de purificação absoluto e acondicionamento adquirido da ClimaTop que produz uma pressão positiva dentro da sala. Duas ante- salas semi-limpas são utilizadas pelos pesquisadores para a troca das vestes. No laboratório o pesquisador estará trajando roupas confeccionadas de micro-fibras de poliéster e luvas cirúrgicas, evitando a contaminação da sala limpa por partículas aderidas na vestimenta de uso diário. Segundo uma contagem de partículas recente feita pela Trox, nossa sala limpa é classificada entre 1000 e 10000, ou seja, são contadas entre 1000 e 10000 partículas por pé cúbico por minuto.

3.3 - SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DA ÁGUA

Como descrito no capítulo anterior, só se tornou possível a reprodução de resultados experimentais para grandes áreas por molécula [1] com a utilização de água ultrapura (isenta de partículas contaminantes). Traços de impurezas na água causam distúrbios nas fases líquido-expandida e gasosa. Apenas a destilação da água não é suficiente para purificar a água aos níveis desejados, um sistema de filtragem mais eficiente é requerido. Filtros de água fabricados pela Millipore, consistindo de um pré-filtro (Milli-RO 10) acoplado a um sistema Milli-Q, foram adquiridos para a purificação da água. O sistema de purificação possui filtros de carvão ativado, deionização, osmose reversa, filtro de $0.22\ \mu\text{m}$ e ultravioleta. O sistema de purificação de água fornece água ultrapura com uma resistividade de $18\ \text{M}\Omega\text{cm}$. Este valor de resistividade é o primeiro indicativo da ausência de impurezas na água. A resistividade da água diminui para valores inferiores a $2\ \text{M}\Omega\text{cm}$ quando colocada no reservatório da cuba e exposta ao gás carbônico da atmosfera. O pH da água é então de aproximadamente 5.9. Para comprovação da pureza da água aferimos sua tensão superficial, que deve estar próxima de 72mN/m (dados obtidos com a balança de pressão) para a temperatura ambiente. O valor de pressão da água deve ser constante, independente da posição das barreiras da cuba. A medida da pressão de superfície nem sempre é suficiente para detectar pequenas quantidades de impurezas. Métodos como as medidas de potencial de superfície e condutância lateral são muito mais eficientes para a aferição da pureza da água, realizada pela variação da posição das barreiras da cuba. A água deve manter suas propriedades inalteradas, ou seja, deve-se obter um valor constante para o potencial de superfície e para a condutância lateral quando se diminui a área superficial.

A contaminação da água por agentes da atmosfera ou mesmo que estejam aderidos à cuba é inevitável, como pode ocorrer o crescimento de bactérias em regiões onde a água está estagnada [2]. A água deve ser utilizada em períodos menores que 6h, pois há risco de se

obter resultados incorretos após este período.

3.4 - MATERIAIS

Os materiais utilizados para a fabricação de filmes de Langmuir devem ser os mais puros possíveis. Todos materiais utilizados neste trabalho possuem pureza maior que 99%, nenhuma purificação posterior foi realizada. Adquiriu-se da Sigma os seguintes materiais utilizados nesta tese: dihexadecil fosfato (DHP), dipalmitoil fosfatidilcolina (DMPC), diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), álcool araquídico (ALAR), o vaso dilatador dipiridamol (DIP), e os anestésicos locais: tetracaína (TTC) e dibucaína (DIB). O clorofórmio foi adquirido da Merck. Todos os compostos têm sua estrutura desenhadas na fig. 3.1 e 3.2. As soluções destes materiais foram feitas com clorofórmio adquirido da SIGMA. Todos os materiais dissolveram até os níveis desejados, não necessitando de auxílio de ultra-sonificação ou aquecimento.

3.5 PROCEDIMENTOS

Os materiais a serem analisados foram inicialmente diluídos em um solvente volátil, clorofórmio, em concentrações de 0.5mg/mL para o fosfato, os fosfolipídios, o fosforoglicídio e o álcool. Os anestésicos locais, dibucaína, DIB, e tetracaína, TTC; e o vaso dilatador dipiridamol, DIP, foram diluídos em clorofórmio de modo a se obter soluções equimolares ao fosfolipídio. O polímero condutor já dopado como descrito na tese

FIGURA 3.1 - Representação das estruturas dos compostos tradicionais no estudo de filmes de Langmuir usados nesta tese.

FIGURA 3.2 - Representação da estrutura molecular dos dois anestésicos locais (dibucaina e tetracaina), do vaso dilatador (dipiridamol) e do polímero condutor (PANI)

de mestrado de Riul Jr. [3] foi diluído na razão de nove partes de clorofórmio para uma parte de PANI. As subfases utilizadas foram a água ou soluções aquosas. As variações do pH foram feitas adicionando ácido clorídrico (baixos pHs). Soluções aquosas com força iônica diferentes foram obtidas pela adição de cloreto de sódio e/ou fosfato.

Os surfactantes, já diluídos em clorofórmio, foram micropipetados sobre a superfície, suficientemente extensa, da água ou das soluções aquosas. Esperou-se o tempo necessário, entre 10 a 30 minutos, para o clorofórmio evaporar e o pH da água se estabilizar. A estabilização do pH da subfase foi sempre acompanhada, nas medidas de condutância, pela resistência da água.

3.5.1- TÉCNICA DO COESPALHAMENTO

Soluções diluídas em clorofórmio de DPPC foram preparadas e misturadas a soluções de anestésicos ou vaso dilatador, que foram diluídos no mesmo solvente. As soluções dos anestésicos e vaso dilatador foram preparadas de forma a serem equimolares a soluções do fosfolipídio. As soluções mistas do fosfolipídio com as drogas foram espalhadas sobre a superfície da água, num procedimento experimental conhecido como “cospredding”, traduzido aqui para coespalhamento.

O coespalhamento [4] é uma técnica na qual a quantidade do composto coespalhado é menor que a quantidade do composto dissolvido na subfase da técnica de adsorção de Langmuir. A técnica de adsorção de Langmuir [5] consiste em dissolver um componente, o qual possua atividade superficial, na subfase e registrar sua influência em um filme de Langmuir, ou matriz. Outra vantagem do coespalhamento é que o segundo componente não necessita ter atividade superficial, possibilitando uma gama maior de substâncias que podem ser estudadas. Finalmente, o coespalhamento fornece a quantidade exata da substância que está interagindo com o filme de Langmuir, ao passo que para a adsorção de Langmuir é

necessário conhecer a área desta substância para saber quanto dela interage com o filme.

3.6 - APARELHOS DE MEDIDAS

3.6.1 - A CUBA DE LANGMUIR

As duas cubas de Langmuir existentes em nosso laboratório são do modelo KSV 5000 e foram adquiridas da KSV-Finlândia. O reservatório da cuba é de Teflon^R, um material hidrofóbico e inerte. As barreiras que vinculam apenas o filme foram confeccionadas em Delrin, um material polimérico hidrofílico e de fácil limpeza. A figura 3.3 mostra um

FIGURA 3.3 - Diagrama esquemático da cuba de Langmuir: 1- Reservatório de água. 2- Barreiras móveis, 3- Eletrobalança com sensor de Wilhelmy. 4- Prova de potencial do capacitor vibrante.

diagrama esquemático da cuba de Langmuir e dois equipamentos de caracterização: a

eletrobalança com sensor de Wilhelmy para as medidas de pressão de superfície e a prova de Kelvin para as medidas de potencial de superfície. Todo este aparato, a cuba e os equipamentos de caracterização, são interfaceados com um microcomputador.

Um software adquirido da KSV, denominado LB5000, gerencia todas as funções do equipamento, armazenando os dados obtidos nos experimentos e possibilitando a opção de vários tipos de caracterização, seja em função da área por molécula ou do tempo. O software calcula a área por molécula se fornecermos a concentração da solução C , a massa molar do surfactante PM , e o volume depositado v (equação 3.1). A cada intervalo de tempo (décimos de segundo) o software mede o avanço das barreiras calculando a área total disponível para o filme. Sendo A_T a área total entre as barreiras da cuba e n o número de moléculas, temos:

$$A = \frac{A_T}{n} = \frac{A_T PM}{N_0 C v} \quad (1)$$

onde A é a área por molécula e N_0 é o número de Avogadro.

3.6.2 - ELETROBALANÇA COM SENSOR DE WILHELMY

Há vários métodos para se obter a pressão de superfície de filmes depositados sobre um líquido, tais como a balança de Langmuir e o sensor de Wilhelmy [6]. Nossas medidas de pressão de superfície foram realizadas utilizando-se uma eletrobalança com sensor de Wilhelmy controladas integralmente pelo computador. Tais balanças medem a força necessária para manter o sensor em equilíbrio estático, e foram calibradas para um sensor de aproximadamente 2 cm de largura. Utilizamos papel de filtro como sensor de Wilhelmy, que apresenta a vantagem de poder ser substituído com grande frequência. Na prática, trocamos o sensor a cada dia de trabalho, ou sempre que um trabalho é reiniciado. A pressão de superfície do filme de Langmuir é calculada como sendo a diferença entre a tensão

superficial da água pura (ou subfase aquosa), σ_0 , e da água com o filme adsorvido, σ [7].

$$\Pi = \sigma_0 - \sigma \quad (2)$$

3.6.3 - PROVA DO CAPACITOR VIBRANTE

Dentre os métodos para se medir o potencial de superfície, encontramos o que utiliza uma fonte radioativa ionizante [8] e o de capacitor vibrante [9]. Ambos funcionam com um sensor metálico colocado alguns milímetros acima da superfície aquosa, e um eletrodo de referência imerso na subfase. O primeiro método é baseado na medida da corrente que atravessa o gap de ar entre o filme e o sensor, gerada pelo movimento de íons sob a ação da diferença de potencial entre o sensor e a superfície aquosa com o filme. Esta diferença de potencial ocorre devido ao próprio potencial de superfície do filme de Langmuir. Os íons aparecem da ionização do ar provocada pela fonte radioativa, geralmente confeccionada de cézio ou irídio.

O método empregado pelo sensor que acompanha as cubas de Langmuir da KSV é o do capacitor vibrante ou de Kelvin. Implementado em 1933 por Yamins e Zisman [10], o método funciona da seguinte maneira: uma das placas do capacitor vibra gerando uma corrente de deslocamento. Entretanto, esta corrente será nula se a diferença de potencial (ddp) entre as placas for nula. O diagrama esquemático do método da corrente nula é ilustrado na Fig. 3.4. A voltagem V a ser medida é compensada por uma voltagem conhecida, V_0 , fornecida por um gerador de tensão contínua de saída variável. O erro resultante é modulado pelo capacitor vibrante C e este sinal periódico serve de realimentação para o gerador V_0 . Quando a corrente é completamente anulada, então o valor fornecido por V_0 (conhecido) é igual ao potencial V que se desejava medir. Para que as medidas de potencial sejam otimizadas devemos posicionar a placa vibrante do capacitor próximo da superfície [9]. Tomando a distância entre o eletrodo vibrante e a superfície da água como l_0 e a

amplitude de vibração como d , temos que:

$$C = \frac{D\epsilon_0 S}{l_0 + d\cos(wt)} \tag{3}$$

Onde D é a constante dielétrica do meio, ϵ_0 a permissividade do vácuo, w a frequência de vibração do eletrodo, e S a área do eletrodo vibrante. Deve-se posicionar o capacitor vibrante em uma posição tal que l_0 seja comparável à amplitude de vibração d . No nosso procedimento usamos distâncias entre 1-2 mm, uma vez que a amplitude de vibração é 2 mm

FIGURA 3.4 - Diagrama esquemático do método nulo. Com este circuito as contribuições do volume de água e do "gap" de ar são subtraídos do potencial de superfície.

e a área do eletrodo é aproximadamente 20 cm². O capacitor tem o intervalo de resolução entre 5 V e -5 V, com uma sensibilidade de 0.5 mV e vibra numa frequência de 50-60 Hz, conforme dados da prova de potencial de superfície da K.S.V.

A técnica de condutância lateral não é descrita aqui, por ser detalhada no Capítulo IV.

3.7 REFERÊNCIAS

- [1] O. N. Oliveira Jr.; PhD Thesis, Bangor, Reino Unido, 1990
- [2] J. Mingins e N. F. Owens; Thin Solid Films 152 (1987) 9
- [3] A. Riul Jr.; Dissertação de Mestrado, IFSC, São Carlos, Brasil, 1995
- [4] G. P. Borissevitch, M. Tabak, I. E. Borissevitch e O. N. Oliveira Jr.; Colloids and Interface B: Biointerfaces 7 (1996) 69
- [5] A. Seelig; Biochim. Biophys. Acta 899 (1987) 9
- [6] J. T. Davies e E. K. Rideal; Interfacial Phenomena, Acad. Press, San Diego, EUA, 1962
- [7] G. G. Roberts; Langmuir-Blodgett Films, Plenum Press, N. Y., 1990
- [8] A. Cavalli, Dissertação de Mestrado, IFQSC, São Carlos, Brasil, 1993
- [9] A. Noblet, H. Ridelaire e G. Sylin; J. Phys. E. Sci. Instrum. 17 (1984) 234
- [10] H. G. Yamins, W. A. Zisman; J. Chem. Phys. 1 (1933) 656

Capítulo IV

Condututância lateral em filmes de Langmuir

4.1 - INTRODUÇÃO

A maioria dos sistemas transdutores de energia nas membranas depende diretamente de movimentos protônicos. A membrana, por sua vez, tem importante participação nas funções das células biológicas, pois trocas de nutrientes e íons [1], assim como impulsos nervosos, ocorrem nesta região. Como o estudo da membrana celular *in vitro* é complicado pelo número de substâncias e componentes da membrana, geralmente utilizam-se modelos de membranas para facilitar a análise dos resultados obtidos [1,2]. Estes modelos, em geral, levam em conta que o arcabouço da membrana é uma bicamada de fosfolipídios. As interfaces fosfolipídio-água são descontínuas sob o ponto de vista termodinâmico. Ainda que a descrição das interfaces não seja muito precisa, é certo que não são rígidas como uma parede [2]. A possível condução protônica ao longo da membrana, por exemplo, pode ser verificada usando-se uma monocamada de fosfolipídio para modelar a membrana. Contudo, há uma controvérsia na literatura sobre a possibilidade de medir o aumento da condução protônica em filmes de Langmuir, a qual perdura há quase uma década e que foi motivação para a presente tese.

Um novo sistema foi elaborado para resolver os principais problemas nas medidas de condutância e dirimir as dúvidas sobre a possibilidade de observá-la. Medidas foram realizadas com o novo sistema, para filmes formados a partir de moléculas de vários compostos: fosfolipídios, álcoois, fosfatos, fosfoglicídios, filmes mistos de fosfolipídios-anestésicos locais e vaso dilatador e polímero condutor. O objetivo é confirmar a possibilidade de medir a condução protônica em filmes de Langmuir; estudar a condução ao longo da membrana sob a ação de drogas e observar a condução de filmes de polímeros condutores em subfases com diferentes pHs.

Neste capítulo descreveremos as técnicas usadas para observar o movimento de

prótons ao longo da membrana, faremos uma breve revisão dos principais artigos sobre a condução em filmes de Langmuir e mostraremos um novo sistema de medidas que resolve os principais problemas para medir o aumento da condução protônica descritos na literatura. Finalmente mostraremos nossos resultados e conclusões.

4.2 - PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA MEDIR A CONDUÇÃO PROTÔNICA

A condução de prótons na interface de membranas é estudada por várias técnicas. Faremos uma divisão destas em: a) medidas diretas, aquelas que seguem o movimento do próton. b) medidas indiretas, em que os resultados obtidos são interpretados como devidos à condução de prótons.

4.2.1 - MEDIDAS DIRETAS

Medidas diretas são aquelas em que o movimento do próton é acompanhado por um sensor. Há dois métodos para isso, sendo que em ambos cria-se um excesso localizado de prótons cujo movimento é acompanhado. No primeiro método [2-4] uma fonte luminosa cria abruptamente pequenas quantidades de prótons de curto tempo de vida. A dissipação é monitorada por uma sonda de pH. O método mede a troca de prótons entre doadores e aceptadores no volume da solução. Devido ao curto tempo de vida destes prótons (menores que 1 ns) as medidas da condução protônica, neste primeiro método, são muito delicadas. Nawroth et al. [5] demonstraram que o método pode ser aperfeiçoado se forem utilizados ácidos nos quais o tempo de vida dos prótons é várias ordens de grandeza maior que dos outros, possibilitando um acompanhamento mais eficaz do movimento protônico.

O segundo método de medida cria um excesso de prótons localizado que é mantido por um longo tempo (até horas) e a dependência temporal do espalhamento geométrico (na ordem de centímetros) dos prótons é monitorada por uma sonda situada em uma monocamada adsorvida sobre uma solução aquosa. Em medidas diretas de longa duração [6-9], a condução protônica na parte polar das monocamadas de fosfolípidios foi monitorada através da utilização de cromóforos fluorescentes (fluoresceína) sensíveis a variações de pH, ligados covalentemente às cabeças polares dos fosfolípidios. Já o movimento de prótons no volume da subfase (água pura) foi monitorado através da sonda isoticianato de fluoresceína, que é solúvel em água. A prova não é afetada pelas propriedades elétricas da água e do filme. A condutância da interface é estudada em dois arranjos experimentais [9], os quais foram denominados pelos autores de 1) *proton wave jump* e 2) *proton window jump*, cujos arranjos

Figura 4.1 Diagrama das cubas do grupo francês 1- monocamada; 2- subfase aquosa; 3- barreiras móveis; 4- agitador; 5- área de observação da fluorescência 6- barreiras de vidro que limitam a área de condução [9]

são mostrados na Fig. 4.1. Pode-se observar que a diferença entre os dois arranjos é uma parede (no *proton window jump*) que divide a fonte de prótons da área observada. Para ambos os experimentos prótons são injetados a poucos centímetros de distância da área observada, através da adição de HCl. O tempo necessário para o próton difundir do local onde foi injetado até a sonda é monitorado pela mudança de sinal de fluorescência. Um agitador é colocado no compartimento de injeção para equilibrar a subfase sendo que para o *proton wave jump* a subfase é agitada “gentilmente” o que não acontece para o *proton window jump*.

Medindo diretamente o movimento dos prótons, Teissié et al. [9] concluem que há um caminho preferencial para a transferência protônica, e que a alta velocidade de transferência se deve a pontes de hidrogênio entre as cabeças polares das moléculas, capazes de suportarem um rápido processo de saltos (como explicado depois) de H^+ . Os resultados apresentados mostram que a transferência de prótons na interface foi aproximadamente 20 vezes mais rápida do que no volume de água após o surfactante adsorvido ter ultrapassado uma concentração crítica.

4.2.2 - MEDIDAS INDIRETAS

As técnicas experimentais em que medidas de condutância são interpretadas como sendo oriundas do movimento protônico serão relacionadas, aqui, como medidas indiretas. A primeira parte tratará de medidas volumétricas e a segunda de medidas de superfície e/ou interface.

4.2.2a - Medidas de volume

Um aumento da condução protônica nos fosfolipídios é observado quando estes são hidratados. Através de medidas elétricas com a imersão de eletrodos no volume de uma

solução contendo um fosfolipídio, é possível observar que a condução incrementa com o aumento da concentração de água até atingir um valor máximo para grandes quantidades de água. Este aumento foi relacionado à hidratação das cabeças de fosfolipídios [10,11].

Medidas indiretas do aumento da condução protônica podem ser realizadas usando-se a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN protônica pode monitorar a troca de prótons entre um grupo aceitador e um doador. A ressonância protônica do grupo amina da fosfatidilcolina foi investigada em microvesículas sonificadas (SUV) preparadas a partir de uma mistura equimolar de fosfatidiletanolamina, PE, e fosfatidilcolina, PC, (ambas da gema do ovo) [2]. O pico aparece separadamente do forte sinal protônico da água (solvente) e pode ser observado para $\text{pH} < 5$ e baixas concentrações iônicas. A troca de prótons afeta o tempo de relaxação transversal (água e amina) do próton e resulta no alargamento da banda. A cinética de transferência de prótons foi investigada pela análise da razão da transferência de prótons entre os grupos doadores e aceptadores. Dois tipos de transferência protônica podem ocorrer: 1) entre moléculas de fosfatidil etanolamina e 2) entre a molécula de fosfatidil etanolamina e a água. A partir da cinética da relaxação transversal dos prótons da água foi postulado que o mecanismo molecular associado era uma aparente transferência de prótons entre dois grupos amina. Entretanto, as distâncias entre os nitrogênios, maiores que 1 nm, devido à diluição dos PE nos PC impossibilitam a troca direta de pontes de hidrogênio entre os grupos amina. Moléculas de água devem atuar como mediadoras para a transferência intermolecular. A comparação entre as razões aparentes dos processos laterais (transferência de prótons) e as medidas (etapas) de reprotonação dos grupos amina sugere que há um numero médio de pulos de prótons que podem ocorrer, antes de ser anulado pelo próton ficar preso numa molécula de água da solução (deve-se lembrar que nas condições experimentais usadas apenas 10^3 moléculas de PE estavam do lado de fora da SUV possuindo um diâmetro menor que 30nm). A conclusão foi que o desbalanceamento

protônico induzido por uma espécie de “ralo” deve ser restabelecido por um efeito cooperativo de 10^{-4} fosfolipídios cercando o “ralo” e funcionando como antena para a captação do próton que está no volume da solução. Como nos experimentos de condutância, a condução lateral de prótons foi facilitada pela atuação de moléculas de água na camada das cabeças polares (interface).

4.2.2b - Medidas de superfície

Medidas de condução em monocamadas de fosfolipídios foram realizadas pela primeira vez por Sakurai e Kawamura [12] em 1987. Seus resultados apontaram um aumento da condução após atingida uma concentração crítica de fosfolipídios adsorvidos na água. Seu esquema experimental é mostrado na fig 4.2. Um copo cilíndrico com 2.7cm de diâmetro e

Figura 4.2 Diagrama da cuba utilizada por Sakurai [12] 1- Apenas a subfase 2- Com monocamada. 3- A curva da condução lateral mostra um aumento de ΔV quando o filme atinge uma concentração crítica.

2.8cm de comprimento foi usado como célula, na qual foram imersos parcialmente dois eletrodos planos de platina (2.0cm x 1.1cm) separados por 1.5cm. A célula foi conectada em série com um resistor usado para monitorar a corrente da célula, e uma voltagem conhecida foi aplicada no circuito. As medidas foram realizadas à temperatura de 23°C. O aumento da condução protônica foi de $4 \cdot 10^{-2} \Omega/\text{cm}$ para filmes formados a partir do dipalmitoil fosfatidilcolina, DPPC. Para o cálculo dessa condutividade, pressupôs-se uma espessura de 100 Å para a monocamada, a qual considero exagerada, apesar de que não se sabe, com clareza, a espessura da camada que conduz os prótons. Para não arbitrar valores para esta espessura preferimos nos restringir ao cálculo da condutância do filme como será detalhado na seção 4.4

Figura 4.3 1- diagrama do sistema de medidas do grupo de Bangor. 2- detalhe do efeito menisco. 3- curvas do ácido esteárico [19]

O método experimental de Sakurai et al [12,13] foi melhorado por Morgan et al. [14], grupo de Bangor, que observaram o aumento da condução protônica versus a área disponível por molécula em uma cuba de Langmuir. Enquanto Sakurai acrescentava surfactante na

superfície da água, Morgan et al. adsorviam uma pequena quantidade destes para uma grande área disponível na superfície da água. Esta melhoria foi importante por mostrar que o aumento da condução é devido à monocamada e não à presença de moléculas no volume da subfase. Morgan et al [14] utilizaram uma Cuba de Langmuir, imergiram parcialmente dois eletrodos planos de platina, de dimensões 2.0-2.5 cm e separados por 2.0 cm, sendo que apenas 0.4 cm estava imerso na subfase. Uma tensão d.c. de 2V foi aplicada entre os eletrodos para não afetar o empacotamento do filme. Com um eletrômetro monitoraram a corrente do circuito (fig 4.3). Seus resultados mostraram um aumento da condutância lateral da ordem de 10^{-8} S para todos os filmes produzidos. Contudo, foi observado um decaimento para pressões maiores que uma dada pressão, o qual foi atribuído a um artefato experimental: a diminuição da área imersa dos eletrodos. Este artefato ficou conhecido como efeito menisco, por estar diretamente relacionado à dependência da posição do menisco, formado

Figura 4.4 Resultados obtidos por Menger [16] da pressão de superfície e condutância lateral versus a área por molécula para um fosfolípido

entre os eletrodos e a água, com a tensão superficial. Quando a pressão aumenta, ou seja, a tensão superficial diminui, o menisco se move para baixo (se em contato com uma superfície hidrofílica como o caso da platina). A condutância medida é, obviamente, proporcional à área imersa dos eletrodos e pode diminuir em até 28% [15] para uma área imersa entre 0.2 e 0.4 cm. Isso equivale a um decréscimo da ordem de 10^{-7} S da condutância lateral, uma ordem de grandeza maior que o aumento da condutância observado por Morgan et al. (da ordem de 10^{-8} S).

No artigo "Ion conductance along lipid monolayers", Menger et al. [16] comparam seus resultados de condução da interface fosfolípido-água com os obtidos pelo grupo de Morgan. O experimento foi baseado nos equipamentos utilizados por Morgan et al. [14].

Figura 4.5 Diagrama do sistema de medidas de Shapovalov [17] 1- eletrodos planos geradores de corrente; 2 eletrodos para o registro do potencial; 3- barreiras flutuantes para eliminar o efeito menisco. σ/σ_0 é a condutância ($\times 10^4$) da subfase com o filme (linha cheia) e sem o filme (linha tracejada).

Mesmo assim, o grupo de Menger observou um decaimento da ordem de $10^{-7}S$ para a condução (fig 4.4). Aparentemente os autores foram iludidos pelo efeito menisco, por ser este uma ordem de grandeza maior que o aumento da condução protônica devido à formação do filme. Observando cuidadosamente a figura 4.4 nota-se que há um pequeno aumento na condução, da ordem de $10^{-8}S$, para pressão de superfície próxima de zero e segue-se um decaimento da ordem de $10^{-7}S$ quando a pressão começa a aumentar. Ou seja, esse aumento - praticamente ignorado por Menger - é consistente com os resultados do grupo de Morgan.

Em 1992, Shapovalov e Il'ichev [17], em seu artigo "Ultrapure water conductance enhanced in presence of Langmuir monolayers. Critical study" contestaram os resultados de Morgan et al [14,18,19]. Com um equipamento similar ao usado por Morgan, Shapovalov e Il'ichev não conseguiram obter uma condução constante para água pura, a qual

Figura 4.6 Diagrama do sistema de anéis concêntricos de Shapovalov [17]. Note que os eletrodos de registro do potencial não estão na área onde adsorve-se a monocamada σ/σ_0 é a condutância ($\times 10^4$) da subfase sem (linha cheia) e com (linha tracejada) o filme.

incrementava com a diminuição da área superficial. Eles atribuíram esse fenômeno à ação do CO_2 nas camadas de água mais superficiais, pois em água com quantidades de CO_2 maiores que a do ar, observaram um decaimento na condução. Então, realizaram medidas em atmosfera de N_2 e água sem CO_2 , que foi retirado com o borbulhamento de N_2 puro na água e adicionaram H_3PO_4 à água. Com todos estes cuidados, ainda foi observado um incremento na condução da água pura. Este novo incremento foi atribuído à evaporação da água enriquecida com H_3PO_4 para a atmosfera de N_2 . Somente quando a atmosfera de nitrogênio foi saturada com vapor de água a curva de condutância versus área por molécula, para a subfase sem o filme, tornou-se constante.

Shapovalov e Il'ichev [17] projetaram dois novos sistemas de eletrodos: o primeiro com eletrodos planos (fig 4.5) e o segundo com eletrodos circulares concêntricos (fig 4.6). Com estes dois novos experimentos, os autores afirmam que foram incapazes de medir a condutância relatada por Morgan, e que seus resultados apontavam condutâncias menores que 3% (gráficos σ/σ_0 das figuras 4.4 e 4.5) das medidas realizadas em Bangor. Shapovalov e Il'ichev [17] afirmaram que os aumentos de condução observados em Bangor eram inexplicavelmente grandes, tendo como base a mobilidade do próton no gelo e na água líquida. Eles postularam que a máxima condutividade protônica das camadas de água próxima à interface seria igual à condutividade do gelo, ou seja, as camadas de água poderiam aumentar sua condutividade em 30 vezes. Para os resultados obtidos por Morgan et al. [14,18,19] a espessura da camada de água onde a condutividade incrementa deveria ser da ordem de 10^5Å . Como certamente a espessura dos filmes de Langmuir é da ordem de 10-100Å, os resultados apresentados pelo grupo de Morgan estariam incorretos. Discutiremos mais tarde que a hipótese de que a mobilidade máxima do próton é a do gelo não se justifica, residindo aí o engano de Shapovalov e Il'ichev [17]. A não observação de aumento de condutância no trabalho de Shapovalov e Il'ichev [17] pode estar relacionado aos

íons adicionados à subfase. Apesar de tomarem cuidados extremos com a atmosfera, para manterem o pH num valor fixo, eles adicionaram H_3PO_4 à subfase. Isso obviamente fez com que a condutância da subfase aumentasse enormemente, e portanto, ficou muito mais difícil detectar o pequeno aumento de condutância devido ao filme de Langmuir. Pode-se observar nas curvas de pressão de superfície do DPPC, mostradas nas figuras 4.4 e 4.5, a atuação dos íons no filme, que suprimem o patamar característico da transição de fase da monocamada de DPPC adsorvida em água ultrapura. Nesta tese mostraremos que só é possível utilizar subfases diferentes de água ultrapura, se for empregado um sistema diferencial que subtraia a contribuição da subfase. Além disso, com o novo arranjo experimental apresentado nesta tese, não resta dúvida de que a condução lateral pode ser observada em filmes de Langmuir.

Figura 4.7 Diagrama das cubetas de Goryunov e curvas de potencial [20]. O potencial aqui representa condutância, pois foi medido num resistor colocado em paralelo com os eletrodos e submetidos a uma diferença de potencial. 1- A cubeta de vidro possui ΔV_1 positivo; 2- Na cubeta de Teflon ΔV_2 é negativo, pois o material é hidrofóbico

Em 1992 Goryunov e Yupatov [20] repetiram a experiência de Sakurai [12] e Morgan [14,18,19] com o objetivo de estudar o efeito menisco. Utilizaram cubetas de Teflon e vidro com dimensões próximas às usadas por Sakurai e outras maiores para simular a experiência de Morgan. Quando os autores utilizaram cubetas com as dimensões utilizadas pelo grupo japonês, observaram para a água sem o filme (colocando os eletrodos na mesma posição em relação à cubeta e a mesma quantidade de água) uma variação no valor da condutância, que era maior para a cubeta de Teflon do que para a cubeta de vidro. O fato de o vidro ser hidrofílico faz com que a água forme um menisco (acima da superfície, como se subisse pela parede da cubeta) na parede da cubeta abaixando o nível da superfície (fig 4.7). O inverso foi observado na cubeta de Teflon, ou seja, o nível da água aumenta, pois o Teflon é um material hidrofóbico. Os resultados obtidos mostraram que a condutância decaía com a injeção de fosfolipídios (DPPC) na cubeta de Teflon, mas aumentava na cubeta de vidro. Note-se que os eletrodos eram de platina, um material hidrofílico, onde o menisco sempre desce com o aumento da pressão superficial (diminuindo a condutância observada). Devido à área superficial das cubetas, com dimensões próximas às utilizadas por Sakurai e Kawamura [12,13], ser pequena, a variação do volume do menisco das paredes influi na altura do nível de água. No caso do vidro a quantidade de água que forma o menisco nas paredes da cubeta aumenta o nível da água quando a tensão superficial diminui, não só anulando o decaimento do menisco da platina como também aumentando a área imersa dos eletrodos. Com o Teflon o decaimento do menisco dos eletrodos de platina soma-se à diminuição do nível da água, pois o menisco em materiais hidrofóbicos curva-se para baixo da superfície da água.

Para as cubas grandes (simulando o experimento de Morgan et al [14,18]) os autores não observaram variações da condutância na água pura (sem o filme) devido ao material de confecção desta. Obtiveram um mesmo valor de condutância para a cuba de Teflon e para

a cuba de vidro com mesmas quantidades de água e com os eletrodos posicionados nas mesmas condições. Os autores atribuíram esta observação ao fato de as cubas possuírem extensa área superficial. Variações no menisco formado no perímetro da cuba, quando da formação de um filme de Langmuir, não afetam substancialmente a altura do nível da água. Os autores apenas relatam que a condutância decai com o aumento da pressão de superfície (para as cubas grandes) e que é necessária uma melhor divisão do efeito do aumento da condutividade da interface com a diminuição da área imersa dos eletrodos. Neste artigo [20] não fica claro se eles obtiveram algum sinal de condutância, que pudesse ser atribuído ao filme de Langmuir.

4.3 - MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE PRÓTONS

Figura 4.8 Modelo de densidade de cargas de Bjerrum para a molécula de água. p indentifica a posição dos prótons, "e" a posição dos elétrons e O a posição do oxigênio [21].

Na Seção 4.7 discutiremos detalhadamente a natureza da condução medida em filmes de Langmuir, e justificaremos porque concluímos que ela é protônica. Por ora, esta hipótese será tomada como válida e uma discussão será feita sobre transferência de prótons. Para entendermos o mecanismo de transporte na interface filme-subfase líquida, é interessante uma breve recapitulação de alguns pontos sobre a estrutura da água.

Cálculos da distribuição superficial da densidade de carga elétrica suportam um modelo empírico para a molécula da água. É o modelo de cargas de quatro pontos de Bjerrum [21], no qual o átomo de oxigênio está localizado no centro de um tetraedro regular e as frações de cargas são colocadas nos vértices do tetraedro (fig 4.8) a uma distância de

Figura 4.9 Diagrama esquemático da propagação do defeito ativo em uma rede. Os círculos pequenos representam prótons. A mudança da posição do próton na rede pode se propagar induzindo a mudança para moléculas vizinhas [21]

1.0Å do centro [22]. O diâmetro de Van der Waals atribuído a essa molécula é de 2.9Å [21],

sendo que este diâmetro diminui para $2.76\text{\AA}$ [23] para o gelo de estrutura do tipo I a -10°C .

A mobilidade protônica no gelo é aproximadamente 30 vezes maior [17] que a mobilidade protônica na água líquida (a mobilidade iônica de H^+ é de $36.23/10^{-8}\text{m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$ [24]). No gelo, onde toda a corrente é transportada por prótons e as moléculas formam pontes de hidrogênio, cada molécula é rodeada por outras quatro moléculas e seus átomos de hidrogênio estão posicionados próximos à linha central entre dois oxigênios, sendo que distam $1\text{\AA}$ de um e $1.76\text{\AA}$ de outro [21].

Para a formação de pontes de hidrogênio entre duas moléculas é necessário que duas regras de neutralidade sejam satisfeitas [21]: 1) cada oxigênio deve ligar-se a apenas dois átomos de hidrogênio e 2) apenas um hidrogênio pode interagir com dois oxigênios vizinhos. A quebra de uma destas regras produz um defeito ativo (fig 4.9), ou seja, um defeito da rede que pode se mover ao longo desta. Considerando uma molécula de água em contato com um íon hidroxila tem-se que, se um próton pula da molécula de água para o íon,

o resultado é o mesmo que se a molécula e o íon mudassem de posição. A figura 4.10 mostra esta situação. O íon de hidroxila manterá seu hidrogênio numa posição de forma a alcançar a maior entropia. Se um próton pula, como indicado pela seta da figura 4.10, de uma molécula de água para o íon OH^- tem-se uma troca de posição da molécula e do íon. Este novo íon posicionará seu hidrogênio para obter a menor energia e poderá receber um próton da molécula que doou o próton, ou de outra molécula vizinha. Ou seja, com pulos de prótons e reorientações dos íons e das moléculas, o defeito ativo propaga-se pela rede.

Na ausência de um campo aplicado, deve-se supor que as transferências de próton que acontecem muitas vezes por segundo - sendo mais significativas que o movimento Browniano do íon - ocorrem em todas as direções com a mesma probabilidade. Quando um campo externo é aplicado, estes pulos ainda acontecem em todas as direções, mas com maior

probabilidade na direção paralela ao campo. A mobilidade do próton é sempre maior que a mobilidade da hidroxila. Esta alta mobilidade é atribuída a pulos de prótons sucessivos num conjunto de agregados (“clusters”) vizinhos:

O mecanismo descrito acima de propagação do defeito ativo é conhecido como “hop and turn”. A condutividade devida a esse mecanismo está presente em outros solventes tais como os ácidos. Consideremos um sistema de alta viscosidade, como o ácido sulfúrico cuja viscosidade é 27.6 vezes maior que a da água a 25°C. A alta viscosidade do sistema deveria causar uma lenta migração dos íons (HSO_4^-); contudo é observada uma alta mobilidade do íon para uma série de soluções contendo diferentes bissulfatos dissolvidos em ácido sulfúrico. Este fato está relacionado com o mecanismo de *hop and turn* e não com a migração

Figura 4.10 O próton pula da molécula de água para o íon hidroxila promovendo uma alteração de posição entre eles. A linha tracejada representa a ponte de hidrogênio entre a molécula e o íon.

do íon. A alta mobilidade surge de sucessivas transferências de prótons entre o ácido e o íon [21]. O próton pula de uma molécula para um íon, resultando em uma mudança de posição entre a molécula e o íon, e assim sucessivamente.

Do mesmo modo que a hidroxila pode ser vista como um átomo de oxigênio com um próton e a água como um átomo de oxigênio com dois prótons, a molécula de álcool pode ser vista como um átomo O contendo um próton. A carga positiva que possui um próton, junto com uma carga elétrica negativa, dá ao grupo OH um momento do dipolo. No álcool líquido estes dipolos formam cadeias intermoleculares [25], como mostrado na fig 4.11.

Quando um ácido forte é dissolvido em metanol, o próton é transferido para a molécula de CH_3OH , para formar o íon $(\text{CH}_3\text{OH}_2)^+$, como no caso da água onde se forma o íon $(\text{H}_3\text{O})^+$. A mobilidade do íon hidrogênio no metanol é muito maior do que a mobilidade de outros íons, indicando que há realmente transferência de prótons neste solvente, embora este efeito de mobilidade não seja muito maior do que na água. Quando um ácido forte é diluído no etanol o íon $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_2)^+$ é formado igualmente, e novamente a alta mobilidade do hidrogênio perante outros íons indica a contribuição de pulos de prótons no solvente, mas com efeito menor que no metanol.

Em vista do fato que as moléculas de metanol e etanol possuem uma vacância para a ocupação por um átomo de hidrogênio, é interessante considerar a adição de uma pequena quantidade de álcool metílico ou etílico numa solução aquosa diluída de ácidos fracos. A pergunta a ser respondida é se há algum efeito que pode ser atribuído à captura do próton do íon $(\text{H}_3\text{O})^+$, ou alternativamente, se a adição de uma pequena quantidade de água em uma solução diluída de ácido de ambos os álcoois tem algum efeito que possa ser atribuído à captura de prótons por moléculas de água para formar íons $(\text{H}_3\text{O})^+$. Vários fenômenos mostram que o segundo efeito está presente, mas o primeiro não. Um traço de água adicionado a uma solução diluída de HCl em ambos os álcoois causa uma queda significativa

na condutividade elétrica, atribuída a uma supressão parcial dos pulos de prótons que foram capturados pelas moléculas de água, ou seja:

Uma vez que um pequeno traço de água é suficiente para produzir um grande efeito, o equilíbrio da reação tende para a direita, indicando que a molécula de água dissolvida no álcool etílico promove um nível vacante para um próton adicional, que é menor (poço mais profundo) que o nível do próton para o grupo OH do álcool. Um próton capturado neste nível mais baixo permanecerá no íon de água até obter a energia necessária para retornar à molécula de álcool. Neste ínterim, o íon H_3O^+ poderá contribuir para a condução apenas migrando vagarosamente (comparada aos pulos de prótons) na direção do campo; apenas quando o próton retornar para uma molécula de álcool os pulos de prótons reaparecerão.

Figura 4.11 O oxigênio (O) liga-se a um próton (P), o qual forma uma ponte de hidrogênio com o oxigênio da molécula vizinha, formando uma rede de pontes de hidrogênio que facilita a condução de prótons [25]

A situação desenhada na figura 4.11 permite um par sucessivo de pulos de prótons tendo uma grande componente na direção da direita para a esquerda. Olhando num espelho podemos visualizar a situação inversa, na qual se permite um pulo de prótons da esquerda para direita. Aplicando-se um campo externo a probabilidade de um próton pular no sentido do campo é maior que a probabilidade de o próton pular em qualquer outra direção. Considere, por exemplo, o íon hidroxila na fig 4.10, o próton encaixado no íon OH^- dá para o íon um momento de dipolo, disto presume-se que o valor do seu momento de dipolo é maior do que aquele da água. Um campo uniforme externo faz com que o dipolo permaneça por mais tempo com o próton mais próximo do anodo, isto implica que o íon tem por mais tempo maior facilidade de receber um próton de uma direção do que nas outras. É exatamente isto que aumenta a probabilidade de um próton pular na direção do campo.

O mesmo pode ser dito do íon $(\text{H}_3\text{O})^+$ e $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_2)^+$. Agora, deve-se considerar a possibilidade de que, em alguns casos, os pulos de prótons aconteçam aleatoriamente permitindo a ausência de momento de dipolo. Retornando à fig 4.11 suponha que o próton seja removido do grupo OH da última molécula de metanol. O íon negativo, formado pela dissociação do próton, terá a possibilidade de receber um novo próton de uma molécula vizinha, a qual se tornará um ânion e estará apta a receber um próton de outra molécula, e assim por diante. A questão a ser respondida é se estes pulos acontecem em uma direção preferencial na presença de um campo externo. O próton do grupo OH da molécula CH_2OH confere à molécula um momento de dipolo, mas o íon $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})^-$ não possui momento de dipolo. Assim a presença de um campo externo não influi na orientação do íon. Os pulos de prótons desta solução acontecem aleatoriamente mesmo na presença do campo externo. Este mesmo mecanismo acontece para a solução de etanol-etóxidos e outras soluções álcoois-alcóxidos, onde os íons não possuam momentos de dipolos.

4.4 - UM NOVO SISTEMA DE MEDIDAS

O principal objetivo do trabalho experimental relatado neste capítulo foi a confirmação de que existe um aumento na condutância lateral numa subfase aquosa devido a um filme de Langmuir, para refutar as afirmações de Menger et al [16] e Shapovalov e Il'ichev [17]. Deve-se mencionar, todavia, que não é surpreendente que tais grupos não tenham sido bem-sucedidos na obtenção de um aumento na condutância, pois há várias dificuldades experimentais a serem vencidas. As três principais dificuldades para as medidas de condutância em filmes de Langmuir são: a) obtenção de valores constantes para a condutância da água, mesmo quando a posição das barreiras é alterada (compressão na ausência de um filme); b) observação do aumento da condução protônica devida ao filme, por este ser muito menor que o valor da condutância da subfase e c) diminuição da área imersa dos eletrodos para pressões maiores que dada pressão (efeito menisco).

Um sistema diferencial foi montado para subtrair o sinal referente à condutância de volume da água da condutância total, possibilitando registrar apenas a variação da condutância da interface filme-água. O sistema diferencial utiliza uma ponte similar à ponte de Weathstone (fig 4.12). Um dos braços é constituído por seis potenciômetros com valores de 10, 100, 1K, 10K, 100K e 1M Ω , possibilitando medidas em vários tipos de subfases com forças iônicas diferentes e vários pHs. Este conjunto de potenciômetros também permite imergir mais profundamente os eletrodos na subfase. Morgan et al [14] imergiam seus eletrodos de 2 a 4mm. Com esta imersão o aumento da condução era de 3 a 5% do valor inicial. As flutuações causadas por ondulações na superfície da água dificultavam as medidas da condutância, mas para uma maior imersão os autores não observavam o aumento da condução devido à formação do filme [26], por ser o valor da subfase muito alto. O sistema diferencial minimizou os distúrbios causados pelas ondulações na superfície da subfase.

Oliveira Jr., em sua tese de doutorado [15], notifica uma queda de aproximadamente 28% da área imersa dos eletrodos (2 a 4 mm) para pressões de superfície maiores que uma dada pressão (entre 5-10 mN/m). Com um simples cálculo, deduz-se que o menisco possuía

Figura 4.16 Diagrama esquemático do sistema diferencial de medidas de condutância lateral. Nos terminais A e B registramos a tensão através de um amplificador síncrono

uma altura qualquer entre 0.56-1.12 mm. A diminuição da área imersa causava um decaimento da ordem de 10^{-7} a 10^{-6} S no sinal da condutância. Isso não é surpreendente, se for suposto que a espessura do filme é constante (10^{-9} - 10^{-8} m de espessura) e a ordem de grandeza do decaimento da condutância é uma fração da condutância do volume de água, ou seja, uma fração de 10^{-6} S. Assim, o efeito menisco mascara o sinal da condutância devido à formação do filme. Eletrodos especialmente construídos para eliminar o efeito menisco foram produzidos por Sewell [15]. Lâminas de vidro foram totalmente recobertas por uma

camada de aproximadamente 25 nm de ouro. Esta camada de ouro foi recoberta parcialmente por poliestireno (isolante), deixando à mostra uma área de 25mm de largura por 4mm de altura. Imergindo estes eletrodos até a profundidade de 4mm, o menisco foi forçado a permanecer na mesma altura para toda a compressão, pois estava em contato com uma interface entre um material hidrofóbico (poliestireno) e um hidrofílico (ouro). Com isso, o efeito menisco foi parcialmente eliminado, mas a introdução do poliestireno causava problemas de reprodutibilidade nas medidas, principalmente devido a impurezas. Além disso, o processo de fabricação dos eletrodos era bastante trabalhoso.

Nosso sistema diferencial possibilitou imergir os eletrodos mais profundamente na subfase, diminuindo a interferência do efeito menisco nos resultados. Como mostraremos na próxima subseção, conseguimos posicionar os eletrodos de tal forma que o efeito do menisco não mascara os resultados para pequenas áreas por molécula. Isso é feito imergindo totalmente os eletrodos, de maneira que a sua extremidade superior coincida com a superfície da água. Obviamente, esse posicionamento a olho nú é limitado. Todavia, estimamos que os eletrodos estão posicionados até 10^{-4} m acima da superfície da água, pois um decréscimo de 10^{-4} m causaria uma queda de 10^{-8} S no sinal da condutância para pequenas áreas. Se a extremidade superior dos eletrodos estiver abaixo da superfície da água, não se deve medir o sinal de condutância. Não repetimos as experiências com os eletrodos similares aos de Sewell porque este método apresenta as mesmas dificuldades dos eletrodos de Morgan, ou seja, as ondulações na água causam flutuações nas medidas de condutância. Muitas vezes estas flutuações são maiores que o próprio aumento causado pelo filme de Langmuir.

O diagrama esquemático do sistema de medidas da condutância lateral é mostrado na fig. 4.13. Eletrodos de platina com dimensões de 2.0x0.7cm separados por 1.0cm de distância imersos na subfase formam uma das resistências da ponte. As duas últimas resistências são dimensionadas para não influírem nas medidas. A ponte é inicialmente

equilibrada por potenciômetros colocados em série. O sinal V_{AB} é registrado usando-se um amplificador síncrono da P.A.R. modelo 124A, o qual também gera o sinal de entrada. Devido à condução do filme a corrente entre os eletrodos varia, descalibrando a ponte e variando o sinal V_{AB} .

Resolveremos agora a ponte de Wheatstone (figura 4.13) e mostraremos nossas

Figura 4.13 Diagrama do sistema de medidas da condutância. Utilizamos a fonte geradora do sinal do lock in, com o mesmo registramos o sinal de saída. Os eletrodos são posicionados com seu topo coincidindo com a superfície da água

aproximações.

O valor eficaz de um sinal senoidal é, simplesmente, o valor de pico dividido por $2^{1/2}$. Usamos a fonte do amplificador síncrono com amplitude igual a $1 V_{rms}$ e frequência de 1KHz para gerar a corrente na ponte. A impedância capacitiva foi desprezada por ser muito menor que as demais impedâncias do sistema empregadas. Assim, resolvemos nosso sistema

diferencial como a ponte de Wheatstone. A corrente registrada pelo amplificador síncrono é escrita abaixo:

$$I_{AB} = \frac{(R_1 R_4 - R_2 R_3) V}{\Delta} \quad (1)$$

onde Δ é:

$$\Delta = \begin{vmatrix} -(R_1 + R_3) & R_1 & R_3 \\ R_1 & -(R_1 + R_2 + R_5) & R_5 \\ -R_3 & -R_5 & (R_3 + R_4 + R_5) \end{vmatrix} \quad (2)$$

R_5 é a resistência interna do amplificador síncrono. Sendo a voltagem medida $V_{AB} = R_5 I_{AB}$ temos que R_2 , ou seja, a resistência nos eletrodos é igual a:

$$R_2 = \frac{R_1 R_4 R_5 V - V_{AB} (R_1 R_3 R_4 + R_1 R_4 R_5 + R_3 R_4 R_5)}{[R_1 (R_3 + R_4 + R_5) + (R_3 R_4 + R_3 R_5)] V_{AB} + R_3 R_5 V} \quad (3)$$

Como o filme e a água estão sob um mesmo potencial, ou seja, o potencial dos eletrodos, podemos considerar as resistências de ambos como formando um circuito paralelo. Sendo R_f a resistência do filme e R_a a resistência do volume de água temos:

$$\frac{1}{R_2} = \frac{1}{R_f} + \frac{1}{R_1} \quad (4)$$

pois a resistência da água, R_a , é a mesma que a do ajuste dos potenciômetros, R_1 , quando calibramos a ponte sem a presença do filme. Assim a resistência do filme ou sua condutância pode ser escrita como:

$$\Delta G = \frac{1}{R_f} = \frac{R_1 - R_2}{R_1 R_2} \tag{5}$$

Esta foi a mesma aproximação usada por Sakurai et al. [12].

4.5 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Posicionamos os eletrodos com o seu topo no nível da água e balanceamos a ponte. Realizamos medidas da condução da subfase sem o filme. Caso o valor da condutância varie, eliminamos impurezas da superfície absorvendo-as com uma trompa d'água. Quando a condutância não varia durante a compressão das barreiras, anotamos o valor da resistência da água. Adsorvemos as moléculas do filme sobre a subfase e esperamos o tempo necessário para o solvente evaporar e o sinal V_{AB} voltar a ser zero (ponte balanceada). Comprimos o filme registrando simultaneamente a pressão de superfície e a condutância lateral versus a área por molécula. Após cada compressão os eletrodos são limpos em clorofórmio para garantir que não haja uma camada de surfactante depositada sobre a platina. Recolocamos os eletrodos na subfase e realizamos nova compressão. Este procedimento é prolongado até não se conseguir um valor inicial próximo à condutância da primeira medida ou até alteração das propriedades do filme.

4.6 - RESULTADOS

Apresentaremos neste tópico os resultados de pressão e potencial de superfície e condutância lateral de filmes de Langmuir para vários compostos. Os primeiros resultados

apresentados serão de filmes tradicionais: o álcool araquídico (ALAR), os fosfolípidos dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e diestearoil fosfatidil colina (DSPC), o fosfoglicídio dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e o dihexadecil fosfato (DHP). Depois mostraremos os resultados obtidos com sistemas mistos com DPPC e os fármacos dipiridamol (DPPC-DIP), dibucaína (DPPC-DIB) e tetracaína (DPPC-TTC). Por último mostraremos os resultados de um polímero condutor, a PANI.

4.6.1 - COMPOSTOS TRADICIONAIS

Nos estudos com compostos tradicionais, além da obtenção de resultados de condutância, houve a preocupação em verificar se as medidas não continham artefatos experimentais. Assim, para o álcool araquídico (ALAR) fizemos um estudo da influência da frequência da tensão alternada aplicada aos eletrodos. No trabalho com o dihexadecil fosfato (DHP), realizado antes dos demais compostos e com um sistema de medidas similar ao usado pelo grupo de Morgan [14], verificou-se a possível diferença entre condutância a.c. e d.c. Para esse filme de Langmuir, o DHP, o aperfeiçoamento do sistema de medidas ainda não contemplava a eliminação do efeito menisco, que portanto será mostrado. Nas medidas com DPPC, verificamos a possibilidade de a condutância depender da concentração da solução, ou do volume de material espalhado sobre a subfase. Para os vários experimentos com este composto (DPPC) não observamos mudanças nas medidas de condutância. A amplitude do sinal assim como a área onde a condutância começa a subir sempre foram as mesmas, dentro dos erros experimentais.

Álcool Araquídico (ALAR)

A figura 4.14 mostra as curvas de pressão e potencial de superfície do álcool araquídico, ALAR. Podemos observar na curva de pressão de superfície as três fases do

filme: a fase gasosa para áreas maiores que $25 \text{ \AA}^2$ e pressão nula, a fase líquida entre 22 e $25 \text{ \AA}^2$ com pressões entre 0 e 12 mN/m , e a fase sólida para áreas menores que $22 \text{ \AA}^2$ e pressões maiores que 13 mN/m . A pressão máxima do ALAR esteve sempre no intervalo de 50 a 60 mN/m . Estes resultados concordam com aqueles descritos na literatura para compostos com uma cadeia hidrocarbônica [14, 27-29]. A curva do potencial de superfície é praticamente constante para áreas maiores que uma área crítica que está na faixa de $50 \pm 5 \text{ \AA}^2$. O potencial aumenta abruptamente devido à queda da constante dielétrica da interface filme-água. O potencial máximo do potencial para o ALAR é 0.45 V , sendo consistente com resultados de outros autores [28].

FIGURA 4.14 - Gráfico de $\Pi \times A$, $\Delta V \times A$ e $\Delta G \times A$ do álcool araquídico.

Bonardi [28], em sua dissertação de mestrado, relata que a área crítica do potencial de superfície do álcool esteárico é dependente da diluição deste em clorofórmio, ou seja, da

concentração da solução a ser espalhada. Para concentrações de 1mg/mL a área crítica é maior que a área crítica da diluição 0.25mg/mL. Isto ocorre devido à formação de agregados, os quais diminuem a constante dielétrica da interface filme-água. Nossa diluição foi de 1mg/mL com área crítica de $50 \pm 5 \text{ \AA}^2$, a mesma obtida por Bonardi. Podemos observar que a condutância também começa a aumentar a partir de $50 \pm 5 \text{ \AA}^2$ e continua crescendo até $20 \text{ \AA}^2$ onde atinge o valor de $62 \pm 23 \text{ nS}$. Só foi possível observar o incremento da condutância lateral para a fase sólida com os avanços da técnica de medida realizados em nosso laboratório, pois o efeito de menisco é eliminado. Observando a figura 4.14 vemos que a condutância lateral começa a aumentar na mesma área que o potencial aumenta

FIGURA 4.15 - Gráfico de $\Pi \times A$, $\Delta V \times A$ e $\Delta G \times A$ para correntes direta e alternada do DHP. Note-se que a amplitude da condutância é aproximadamente a mesma para ambas as correntes. O efeito menisco não está totalmente mostrado na figura.

abruptamente, o que será uma constante nos resultados apresentados aqui. Isso indica que o incremento abrupto do potencial de superfície e o começo do aumento da condutância lateral são causados por uma única mudança de propriedade do filme de Langmuir.

Por ser um composto bastante simples, empregamos o ALAR para um estudo sistemático sobre possíveis efeitos da frequência da tensão alternada para a medida da condutância. Foi empregado o intervalo de 11.7 Hz a 11.7 KHz, observando-se que a amplitude do aumento da condutância não varia significativamente para as várias frequências neste intervalo.

Dihexadecil fosfato (DHP)

O figura 4.15 mostra as isotermas da pressão, potencial e condutâncias lateral (ac e dc) para o fosfato DHP. As curvas são a média de no mínimo 10 medidas realizadas sob as mesmas condições. A dispersão dos resultados para a condutância, não mostrada aqui, é de 20% para a monocamada condensada. A área para o começo do incremento da condutância foi $85 \pm 5 \text{ \AA}^2$, coincidindo com a área crítica do potencial de superfície, $78 \pm 5 \text{ \AA}^2$. O fato de o aumento da condutância ser o mesmo para as medidas ac e dc descarta a possibilidade de estes resultados serem devidos a reações nos eletrodos [17]. Como os eletrodos ($2.0 \times 2.5 \text{ cm}$ separados por 2.0 cm entre si) estão parcialmente imersos na subfase, há um decaimento da condutância (não totalmente mostrado no gráfico) devido ao efeito menisco. A área imersa dos eletrodos era de $2.5 \times 0.4 \text{ cm}$. Medidas simultâneas de potencial e pressão de superfície apresentaram um potencial máximo de 360 mV com dispersão de 20 mV e uma pressão de superfície de $57 \pm 4 \text{ mN/m}$. O filme colapsou em $40 \text{ \AA}^2$ por molécula, o que é esperado para filmes de Langmuir que possuem duas cadeias alifáticas [30]. A secção transversal de uma cadeia alifática é de $20 \text{ \AA}^2$ em média [30].

Dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG)

FIGURA 4.16 - O gráfico do dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG) mostra as isoterma de pressão e potencial de superfície e condutância lateral versus a área disponível para uma molécula do lipídio.

A figura 4.16 mostra as isoterma com o fosfoglicídio DPPG. A área em que a condutância começa a aumentar, $120 \pm 20 \text{\AA}^2$, coincide com a área do incremento abrupto da curva do potencial de superfície, $100 \pm 5 \text{\AA}^2$. O valor máximo da condutância foi de $47 \pm 7 \text{nS}$ para a fase condensada. O filme colapsou para áreas menores que $38 \text{\AA}^2$ por molécula, onde o potencial alcançou $300 \pm 20 \text{mV}$ e a pressão $50 \pm 3 \text{mN/m}$. A área extrapolada, obtida por uma reta de ajuste das fases sólida e líquida, foi de $44 \text{\AA}^2$ por molécula. Foram realizados pelo menos 10 experimentos sob as mesmas condições para comprovar a reprodutibilidade dos

resultados.

Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC)

FIGURA 4.17 - Isotermas de Π , ΔV , $\Delta G \times A$ do DSPC, um fosfolípido com duas caudas hidrofóbicas e uma cabeça polar "zwiteriônica".

Os resultados obtidos com filmes formados a partir do DSPC podem ser vistos na figura 4.17. A curva de pressão tem uma área extrapolada de $46 \pm 2 \text{ \AA}^2$ por molécula; quando a pressão alcançou o valor de 62mN/m a área disponível à molécula era igual a $38 \text{ \AA}^2$. Pode-se observar na curva de potencial de superfície uma área crítica de $100 \pm 7 \text{ \AA}^2$ e um potencial máximo de $590 \pm 30 \text{ mV}$. A curva de condutância começou a incrementar para áreas no intervalo de 90 a $110 \text{ \AA}^2$ e atingiu o valor de $70 \pm 20 \text{ nS}$ para $40 \text{ \AA}^2$. Os resultados de pressão

e potencial de superfície foram obtidos simultaneamente para a velocidade das barreiras em 50mm/min; já a curva de pressão superficial e condutância lateral foi realizada com a velocidade de 100mm/min. Ambas as velocidades mostraram curvas de pressão de superfície iguais. As curvas apresentadas na figura 4.17 correspondem a pelo menos 70 medidas realizadas. Nos experimentos variamos a velocidade de compressão do filme e a quantidade de surfactante adsorvido na superfície da água. A variação de tais parâmetros não trouxe mudanças significativas para os resultados.

FIGURA 4.18 - Gráfico do DPPC para pressão e potencial de superfície e condutância lateral versus a área por molécula. Os resultados obtidos são a média de pelo menos 70 experimentos onde mudamos a diluição em clorofórmio, a quantidade de material adsorvido na água e a velocidade de compressão das barreiras.

Dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC)

As curvas obtidas com os filmes de DPPC estão na figura 4.18. Com uma pressão máxima de $63 \pm 4 \text{ mN/m}$ para $40 \text{ \AA}^2$ por molécula, a curva da pressão de superfície do DPPC apresenta um patamar para áreas entre 80 e $55 \text{ \AA}^2$ que corresponde à coexistência da fase líquido-expandida e líquido-condensada. A pressão nesta região é sempre inferior a 15 mN/m . A extrapolação da curva de pressão para a fase sólida apresentou uma área de $46 \pm 3 \text{ \AA}^2$. A curva do potencial de superfície, obtida simultaneamente à curva da pressão, mostra um potencial máximo de $500 \pm 30 \text{ mV}$ e uma área crítica na região de 105 a $120 \text{ \AA}^2$. O valor da condutância lateral começou a incrementar para a mesma área crítica do potencial, com um valor máximo de $51 \pm 3 \text{ nS}$. Como podemos observar, a menor área medida para a condutância lateral foi de $45 \pm 5 \text{ \AA}^2$ por molécula, isto se deve ao fato de que o suporte de eletrodos ocupa uma área de aproximadamente 10% da área total disponível para o filme condensado. Nenhuma histerese foi observada para todas as medidas feitas com o filme de DPPC. Devido ao fato de o DPPC ser utilizado como matriz para a incorporação de drogas, os resultados apresentados aqui (figura 4.18) refere-se a pelo menos 70 medidas realizadas. Nos experimentos com o DPPC variamos a velocidade de compressão do filme (30-100 mm/min), o volume depositado na superfície da água e a concentração do DPPC diluído em clorofórmio. Os resultados para todas as condições investigadas foram similares.

4.6.2 - FILMES MISTOS

DIB-DPPC

Uma discussão mais detalhada da pressão e potencial de superfície para várias concentrações de dibucaína (DIB) será dada no capítulo seguinte. Mostramos aqui os resultados de pressão e potencial de superfície e condutância lateral do filme misto DIB-DPPC com concentração de 25% do anestésico e do DPPC puro. Esta alta concentração foi

escolhida com o intuito de observar mais claramente o efeito do anestésico na condutância lateral. Usando a técnica de coespalhamento, ou seja, espalhando sobre a superfície da água uma solução mista contendo 75%M de DPPC e 25%M de anestésico diluído em clorofórmio, realizamos medidas simultâneas de pressão e potencial de superfície, e depois medidas simultâneas de condutância lateral e pressão de superfície. A figura 4.19 mostra a média dos resultados de pressão, potencial e condutância versus a área por molécula de fosfolípido obtidos de pelo menos 20 medidas. Pode-se observar que o coespalhamento do anestésico altera muito pouco a curva de pressão do DPPC, diminui o potencial máximo do fosfolípido

FIGURA 4.19 - Isotermas de Π , ΔV e $\Delta G \times A$ do DPPC puro (linha cheia) e do filme misto DIB-DPPC (linha pontilhada) com 25% de anestésico local na mistura.

e aumenta a área crítica. A condutância lateral do DPPC puro e do filme misto aparece para a mesma área crítica dos respectivos potenciais de superfície. A ordem de grandeza da condutância lateral de ambos os filmes foi de 10^{-8} S, sendo que a condutância do filme misto foi maior para pressões menores que 10mN/m e menor para pressões acima desta.

TTC-DPPC

A figura 4.20 mostra as curvas de potencial e pressão superficial e condutância lateral para o filme misto de DPPC coespalhado com tetracaína (TTC) na razão de 80% de

FIGURA 4.20 - Gráficos de $\Pi \times A$ (linha cheia), $\Delta V \times A$ (linha tracejada) e $\Delta G \times A$ (linha pontilhada) do filme misto coespalhado de TTC-DPPC com 20% de anestésico na mistura.

fosfolipídio e 20% de anestésico. Podemos observar que o filme possui uma pressão máxima de 47 ± 3 mN/m. A área crítica do potencial é 110 ± 10 Å² e seu potencial máximo de 410 ± 20 mV. A condutância apresentada no gráfico é a média de 12 medidas. Há um incremento da condutância de 3×10^{-9} S (1.60×10^{-7} - 1.57×10^{-7}) para áreas entre 190 e 150 Å² seguido de uma queda de 6×10^{-9} S entre 150 e 110 Å². Um patamar foi observado para áreas entre 90 e 100 Å². Para áreas menores que 90 Å² a condutância passou a subir atingindo o valor de 1.83×10^{-7} S. Cabe ressaltar que a variação da condutância do filme misto é da ordem de 10^{-8} S sendo que o incremento absoluto de 10^{-7} S deve-se ao valor inicial da condutância para área de 190 Å². Não foi possível verificar se os aumentos iniciais durante a compressão eram genuínos. Houve também a dificuldade de que a condutância não retornava a zero. Uma possível explicação para essa observação é que parte da TTC era dissolvida. Entretanto, medidas de fluorescência da subfase com o filme empacotado foram realizadas e mostraram que se havia TTC na subfase sua concentração não era suficiente para alterar o sinal da fluorescência.

DIP-DPPC

Para o estudo da interação de várias drogas solúveis em água - que portanto não formam filmes de Langmuir estáveis - com monocamadas de lipídios, pesquisadores [31-33] usualmente introduzem a droga na subfase e observam a adsorção da droga na monocamada ou matriz de lipídios. Com este procedimento, podem ser obtidas curvas equivalentes às isothermas de Langmuir, variando-se a concentração de droga na solução da subfase e detectando a quantidade efetivamente ligada à monocamada. É justamente na dificuldade em detectar o quanto de droga foi adsorvido que reside a maior desvantagem dessa técnica. Além disso, sabe-se que as propriedades de um filme de Langmuir podem variar bastante quando se altera a subfase, ainda que não haja adsorção de ingredientes da subfase na monocamada. Assim, fica difícil identificar se as propriedades do filme são devidas à incorporação da

droga na monocamada ou simplesmente a mudanças na composição da subfase [34].

Borissevitch et al [34,35] usaram uma técnica alternativa para eliminar as dificuldades mencionadas acima. É a técnica conhecida como coespalhamento (*cospreading*), que foi aplicada a filmes mistos DIP-DPPC, DIP-DPPG, derivados de DIP-DPPC e derivados de DIP-DPPG. Na técnica do coespalhamento a incorporação das drogas é realizada antes de o filme ser depositado sobre a subfase, preparando-se uma solução de clorofórmio que contenha tanto o fosfolipídio quanto a droga em questão. Esta técnica apresenta a vantagem de que toda mudança nas propriedades da matriz de fosfolipídio é ocasionada pela incorporação da droga na monocamada. A pequena quantidade de droga utilizada para a

FIGURA 4.21 - Gráfico de condutância lateral versus a área por molécula do filme misto coespalhado DIP-DPPC para as seguintes concentrações do vaso dilatador: 0% (linha cheia), 0.4% (linha tracejada), 10% (linha pontilhada) e 25% (linha tracejada e pontilhada).

formação dos filmes mistos não é suficiente para causar grandes variações na composição da subfase, mesmo que haja um pouco de dissolução. A propósito, medidas de fluorescência de amostras da subfase mostram que a perda de dipiridamol para a subfase é desprezível, atingindo um máximo de 15% para a maior concentração de DIP empregada, e após vários ciclos de compressão-descompressão de uma monocamada de DPPC ou DPPG. Borissevitch et al [34] concluíram que seus resultados em filmes de Langmuir indicam que a droga interage com a parte polar e apolar das moléculas de lipídio, com sua localização dependendo do estado de protonação do DIP e da carga da monocamada. Os autores sugerem que a parte aromática do DIP está situada entre as cabeças polares e as caudas dos lipídios, sendo que a parte hidrofóbica da droga penetra mais para a parte apolar.

Realizamos medidas de condutância para as concentrações de 0.4%, 10% e 25% de DIP coespalhados com o DPPC. A figura 4.21 mostra nossos resultados de condutância versus a área por molécula. Pode-se notar que a condutância do DPPC puro é muito pouco afetada com a introdução de diversas concentrações de DIP.

4.6.3 - POLÍMERO CONDUTOR

Na figura 4.22, podemos observar os resultados obtidos com um polímero condutor. O gráfico mostra a ordem de grandeza da variação da condutância para o polímero condutor PANI para três pHs da subfase. As subfases de pH 2 e 4 foram preparadas com a adição de HCl. O pH 6 refere-se ao pH da água após a absorção de CO₂. Observa-se no gráfico (fig. 4.22) que as amplitudes da condutância para os pHs 4 e 6 foram da ordem de 10⁻⁷ S e da ordem de 10⁻⁵ S para o pH 2. A polianilina (PANI) foi sintetizada quimicamente conforme os procedimentos descritos por Mattoso [44]. A PANI foi dissolvida em m-cresol, protonada com ácido canfor sulfônico (CSA) até alcançar 50% de dopagem. Finalmente a solução foi diluída em clorofórmio e espalhada sobre a superfície da água (pH 6) ou de soluções aquosas

com pH 4 e 2.

Figura 4.22 - O gráfico mostra a variação da condutância do filme de Langmuir de PANI para vários pHs da subfase obtidos com pela adição de HCl

A condutância para todos os experimentos aumentou logo no começo da compressão do filme, e manteve-se constante (dentro dos erros experimentais) até o colapso deste. Todos os experimentos com a PANI foram realizados conjuntamente com o doutorando Antonio Riul Jr.

Para sanar dúvidas sobre a possibilidade do aumento da condutância ser devido à absorção do m-cresol ou CSA na subfase, o mestrando Luis Eduardo Amancio realizou medidas do polímero condutor poli(*o*-etoxianilina) (POEA), (que é dissolvido em diclorometano sem a utilização de m-cresol) adsorvido sobre a água. Os resultados de condutância obtidos foram da mesma ordem de grandeza da PANI (10⁻⁷S) para a água

ultrapura. Estes resultados (da POEA) indicam que o aumento de condutância observado para a PANI não é ocasionado somente pelo m-cresol nem pelo CSA.

4.7 - DISCUSSÃO

4.7.1 NATUREZA DA CONDUÇÃO

Nos filmes de Langmuir, as moléculas dos filmes são depositadas sobre a superfície da água. O valor inicial da condutância (10^{-6}S) deve-se à água ultrapura, pois as moléculas do filme não interagem entre si para grandes áreas por molécula. Quando se comprime o filme, observa-se um aumento (10^{-8}S) na condutância que aparece para a mesma área crítica do potencial. A hipótese de essa condução ser originária somente de condução eletrônica e/ou iônica pode ser descartada com base nos seguintes resultados experimentais: a) a condução foi observada em compostos nos quais não há elétrons livres e nem deslocalizados, como os ácidos graxos e fosfolipídios; b) também aparece condução lateral em filmes de Langmuir neutros (não ionizados), como o DPPC, o que portanto significa que a condução não pode ser devida a íons da dupla-camada de Gouy-Chapman; c) a amplitude do sinal para as medidas de condutância a.c. e d.c. realizadas com o fosfato DHP foi praticamente a mesma. Se a condução fosse de natureza puramente iônica a migração dos íons deveria diminuir com o aumento da frequência da corrente.

Resta, por exclusão, a possibilidade de condução protônica, que de fato é corroborada por outros resultados da literatura. Tentaremos neste capítulo argumentar a favor dessa última hipótese.

Os resultados de condutância lateral apresentados aqui são consistentes com aqueles do Grupo de Bangor [14,18,19], com valores da mesma ordem de grandeza (10^{-8}S) para filmes formados por vários tipos de moléculas (álcool, fosfato e fosfolipídios). A única

exceção é a do filme de polianilina, um polímero condutor, para o qual deve haver uma componente eletrônica, como discutido mais tarde. A condutância do filme de Langmuir só aparece quando comprimido para áreas menores que a área crítica, situação na qual as moléculas de água próximas à superfície são reorientadas. Pode-se supor que a mesma ordem de grandeza para a condutância de diferentes compostos esteja ligada a formações de pontes de hidrogênio entre as moléculas do filme e as moléculas de água bem como entre si.

Parece existir um duto preferencial para a condução de prótons, sendo que as moléculas de água seriam as que determinam a amplitude do aumento da condutância. Isto parece estar ligado com o fato de a água contribuir apenas com a migração e de ser necessária uma certa energia para retirar o próton da molécula de água. Esta energia pode ser dada pelas moléculas do filme [2]. Tão logo o próton esteja na molécula do filme, este começa a pular de uma molécula para outra até ser novamente capturado por uma molécula de água. De fato, em medidas de RMN de prótons em vesículas ultrassonificadas (item 4.2.2a), observa-se que as moléculas de água funcionam como armadilhas que aprisionam o próton. Neste estado, ou seja, aprisionado, o próton só poderá contribuir para a condutância através da migração. Isto também fica entendido pelo fato de que um traço de água adicionado a uma solução diluída de HCl em álcoois (metílico ou etílico) causa uma queda significativa na condutividade elétrica, a qual é atribuída a uma supressão parcial dos pulos dos prótons que foram capturados pela molécula de água (item 4.3).

É possível, também, refutar inequivocamente as críticas de Menger et al [16] e Shapovalov e Il'ichev [17] à interpretação de condução protônica. A montagem experimental aperfeiçoada permitiu uma extensão significativa dos resultados de condutância. Com o uso de um método diferencial, foi possível medir condutância em filmes de Langmuir sob diversas condições, inclusive com variação da subfase. A coincidência entre as condutâncias a.c. e d.c. do DHP e o estudo para o álcool araquídico em que a amplitude da condutância

se mostrou independente da frequência entre 0 e 10 kHz também descartam a possibilidade de a condutância medida ser devida a um efeito de polarização dos eletrodos.

A eliminação do efeito menisco permitiu que se mostrasse que a condução protônica permanece mesmo para os filmes altamente condensados. Acontece que Teissié et al [6] sugeriram que sob determinadas condições, a transferência protônica deveria ser suprimida, porque o empacotamento das moléculas impediria a formação de uma rede eficaz de pontes de hidrogênio. Ainda sobre efeitos de menisco, uma análise cuidadosa agora dos resultados de Sakurai e Kawamura [12,13] mostra que o aumento de condutância por eles observado se devia provavelmente ao efeito menisco. Ou seja, embora eles tivessem acertado na previsão de que um aumento na condutância poderia ser observado, seus resultados eram oriundos de um artefato experimental. Por outro lado, se Menger et al [16] tivessem eliminado o efeito do menisco, poderiam ter notado a presença do aumento da condução devido ao filme de Langmuir, como já foi comentado.

Ainda que um aumento na medida da condutância tenha sido confirmado, resta responder à crítica de Shapovalov e Il'ichev [17] sobre os valores inexplicavelmente altos para a condutância de um filme tão fino como o de Langmuir. Com base nos valores da mobilidade do próton no gelo (30 vezes maior que a da água), Shapovalov e Il'ichev mostraram que o filme e a camada de água reorientada deveriam possuir uma espessura de $10^5 \text{ \AA}$, ou seja, várias ordens de grandeza maior que o conhecido (10-100 $\text{\AA}$). Implícita na afirmação de Shapovalov e Il'ichev [17] está a hipótese de que a mobilidade máxima para um próton em um filme de Langmuir é aquela encontrada no gelo. Eles não apresentam justificativa para tal. Entretanto, sabe-se que a distância entre doador e aceitador é crucial para a eficiência da transferência protônica. Isso ficou demonstrado no modelo unidimensional simples proposto por Kiefer et al [36] para o estudo da transferência de prótons. Voltaremos a este ponto mais tarde.

O mecanismo mais provável para a condução protônica é o "*hop and turn*", como já havia sido sugerido por Teissié et al [6-9] para as medidas diretas de transporte de próton em filmes de fosfolípido, e por Morgan et al [14,18,19] para as medidas de condutância em filmes de Langmuir. Nas próximas subseções apresentaremos mais evidências favorecendo o mecanismo de *hop and turn*, começando por uma discussão sobre o aparecimento da área crítica e depois com a aplicação de um modelo de transferência de prótons que explica não só o valor da área crítica para um composto simples, como a justificativa para um grande aumento na mobilidade do próton na interface filme/água.

4.7.2 ÁREA CRÍTICA EM FILMES DE LANGMUIR

A área para a qual a condutância começa a subir é a mesma área onde o potencial de superfície sobe abruptamente. Como discutido no Capítulo II, o aumento abrupto do potencial é ocasionado pelo decaimento - também abrupto - da constante dielétrica da interface cabeça polar-água. Oliveira e coautores [37] ajustaram a curva de potencial de superfície do ácido esteárico, e sugeriram que a mudança no valor de D_2 (constante dielétrica da interface filme-água) é consequência da formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas do filme e possivelmente moléculas de água.

Ressalte-se que medidas de potencial de superfície em filmes de Langmuir não eram reprodutíveis para grandes áreas por molécula até a década de 80, quando Taylor et al [38] mostraram que a irreprodutibilidade do ácido esteárico para grandes áreas era causada por traços de impureza na subfase. Usando água adequadamente purificada, Taylor et al observaram que o potencial de superfície do ácido graxo era nulo (e reprodutível) para grandes áreas, e só começava a aumentar em uma área crítica. O valor máximo de potencial era atingido quando o filme alcançava seu estado de maior ordenamento na fase sólida.

Com a reprodução dos resultados de potencial para grandes áreas por molécula, foi

possível analisar curvas de potencial versus área. Oliveira Jr. et al [37] ajustaram o modelo DF para o potencial de superfície do ácido esteárico. Até então este modelo só havia sido empregado para prever o valor do potencial para o estado condensado dos filmes de Langmuir. Oliveira Jr., no seu ajuste, sugere que o aumento abrupto do valor do potencial observado na área crítica é ocasionado por um decaimento da constante dielétrica das cabeças polares do ácido. Na área crítica o filme já está parcialmente orientado, e portanto, mudanças no valor das componentes normais dos dipolos nesta área não seriam suficientes para causar o aumento abrupto do potencial. A constante dielétrica da interface ar-filme, que é inicialmente igual à constante dielétrica do ar, aumenta até atingir o valor da constante dielétrica da parte apolar da molécula (~ 2.8). A contribuição advinda da reorientação de moléculas de água da subfase nas vizinhanças do filme é relativamente pequena e não deveria ser responsável por um aumento abrupto. De toda forma, qualquer mudança brusca nesta região pode se confundir com mudanças na interface filme/água, de maneira que para a modelagem a contribuição dipolar da reorientação da água foi considerada como independente da área por molécula. Por exclusão, portanto, Oliveira Jr. et al [37] atribuíram o aumento abrupto de potencial ao decréscimo de D_2 na área crítica, quando da aplicação do modelo DF para ácido esteárico.

Além do potencial de superfície e de condutância lateral, discutidas aqui, outras técnicas mostram evidências de uma área crítica para os filmes de Langmuir. Elas incluem microscopia sob ângulo de Brewster [39], medida da corrente de deslocamento de Maxwell [40], medida de reflectância de luz ultravioleta [41], elipsometria [42]. Nos casos em que medidas de potencial foram feitas simultaneamente com as medidas das técnicas mencionadas, observou-se que a área crítica era a mesma, considerada a dispersão dos resultados experimentais.

Nossos resultados, para os filmes formados a partir dos fosfolipídios DPPC e DSPC,

fosfoglicídio DPPG, fosfato DHP, álcool ALAR, e filmes mistos, DIB-DPPC e DIP-DPPC mostram que a subida abrupta do potencial de superfície e o começo do aumento da condutância estão, dentro dos erros experimentais, localizados na mesma área, ou seja a área crítica. Apenas o filme misto TTC-DPPC não mostrou esta concordância de áreas. Um trabalho mais detalhado será realizado para se entender a discordância dos resultados para o sistema TTC-DPPC. Por enquanto algumas hipóteses estão sendo estudadas: a primeira é que a TTC, por penetrar mais profundamente na matriz de fosfolípido, ocasiona uma segunda rede de pontes de hidrogênio. Uma segunda hipótese é que há absorção da TTC na subfase. Contudo, medidas de fluorescência da subfase não indicam a presença da droga. Cabe ressaltar que o material da subfase analisado foi retirado da cuba com o filme no estado condensado.

4.7.3 MODELO DE TRANSFERÊNCIA DE PRÓTONS APLICADO A FILMES DE LANGMUIR

A sugestão de que a condução protônica em filmes de Langmuir ocorre através do mecanismo de *hop and turn* foi feita por Teissié [6-9] e avalizada por Morgan et al [14,18,19]. Nenhum desses trabalhos, entretanto, apresentava uma explicação - ainda que qualitativa - para o valor da área crítica. Também não explicavam porque a mobilidade protônica é tão maior do que na água ou mesmo no gelo. Encontramos um modelo de transferência de prótons, apresentado por um grupo de San Diego com a participação de um pesquisador brasileiro, Dr. Vitor B.P. Leite, que oferece essas explicações.

Trata-se do modelo unidimensional de Kiefer et al [36] para a transferência de prótons em pontes de hidrogênio, que leva três fatores em consideração: a) a geometria do sistema; b) as interações não ligantes; e c) o acoplamento eletrônico. Com este modelo os autores testam a validade da aproximação de dois poços para a transferência de prótons entre um

núcleo doador e um núcleo aceitador. A conclusão é que esta aproximação é válida para distâncias maiores que $2.7 \text{ \AA}$ (fig 4.23). Para distâncias menores entre os núcleos há uma transição da aproximação de dois poços para a aproximação de poço simples. Embora esse modelo tenha sido apresentado visando à transferência de prótons em outros contextos, seus resultados se aplicam integralmente à condutância de filmes de Langmuir.

No modelo de Kiefer et al [36], a barreira de potencial, que impede o próton de saltar

FIGURA 4.23 - Modelo de Kiefer. Conforme a distância entre dois núcleos diminui, a energia necessária para o próton transferir-se de um núcleo para o outro também diminui. A aproximação de dois poços (R_2 , R_3) é válida até $2.7 \text{ \AA}$, após o que a melhor aproximação é a do poço simples (R_1).

para um núcleo vizinho, diminui quando a distância entre os núcleos diminui. A barreira de potencial é a diferença entre a energia necessária para o próton cruzar de um núcleo para outro menos a energia de acoplamento. A validade da aproximação de dois poços para a

transferência de prótons depende da distância entre os núcleos. A transição se dá para a distância de 2.7 Å. É interessante notar que o diâmetro de Van der Waals atribuído à molécula de água é 2.9 Å [21]; este diâmetro diminui para 2.76 Å [23] para água no estado sólido (gelo). Já a solução de ácido malêico e água [25] possui um diâmetro médio de 2.4 Å. Considerando nossa interface como uma região volumétrica onde a espessura é extremamente pequena, podemos ver que enquanto a transferência de prótons na água e no gelo é mais bem descrita por um sistema de dois poços, a situação dos filmes de Langmuir no estado condensado é descrita por um poço simples acoplado como na figura 4.23

FIGURA 4.24 - Aplicação do modelo unidimensional de Kiefer para a previsão da área crítica de filmes de Langmuir de ácidos graxos sobre a água.

Com base no modelo de Kiefer [36] e no parâmetro de rede do ácido malêico-água proposto por Haines [25], notamos a inconsistência da hipótese de Shapovalov e Il'ichev de que a mobilidade dos prótons no filme de Langmuir deveria ser, no máximo, a do gelo. Além

disso, a aplicação do modelo de Kiefer permite prever o valor da área crítica, desde que se conheça a estrutura assumida pelas cabeças hidrofílicas num filme de Langmuir. Resultados preliminares obtidos por Leite [43] para o ácido esteárico mostram que a área crítica, cerca de $38 \text{ \AA}^2$, é a maior área em que uma molécula de água pode interagir com duas moléculas do ácido. Apenas uma molécula de água perfaz uma ponte de hidrogênio com a cabeça polar do ácido para a área crítica (figura 4.24).

Sabemos agora que uma molécula de água serve de mediadora neste processo. Com a formação de pontes de hidrogênio, o mecanismo de condução, que para áreas maiores do que a área crítica era apenas por migração, pode agora transferir os prótons de uma molécula para outra. A propagação destes prótons causa uma mudança de momento de dipolo, tanto na molécula doadora como na molécula aceitadora. A propagação se dá através de saltos de prótons seguidos da rotação da molécula, no mecanismo conhecido como *"hop and turn"*.

Um outro comentário interessante diz respeito à afirmação de Teissié [6] de que a condutância do estado condensado é nula. Essa expectativa é incorreta para os filmes de Langmuir, pois segundo o modelo de Kiefer, não há razão para que a transferência de próton seja interrompida com a compressão até a fase sólida. Pelo contrário, quanto menor a área disponível por molécula maior o número de pontes de hidrogênio no filme, o que acarreta numa condutância cada vez maior como observado experimentalmente.

4.7.4 CONDUÇÃO LATERAL EM FILMES DE POLÍMEROS CONDUTORES

Os resultados de potencial de superfície, apresentados por Mello [45] para vários tipos de ácidos na subfase, mostram que os filmes de Langmuir de PANI não apresentam área crítica bem definida quando depositados sobre uma subfase ácida de HCl, e não possuem potencial nulo para grandes áreas por molécula. As diferenças em potencial para os vários ácidos são atribuídas à dupla camada.

O potencial não nulo para grandes áreas indica a interação entre domínios de polímero, formando grandes agregados. A condutância incrementa já para grandes áreas, o que pode ser também explicado pela presença de tais domínios. A condutância (10^{-7}) para o pH 6 (água pura) é uma ordem de grandeza maior que para filmes de Langmuir constituídos por isolantes, mostrando que já neste pH deve existir transporte de elétrons no polímero.

Para os experimentos realizados na água pura, o pH da interface deve ser próximo do da subfase. A dupla camada de GC aumenta o pH da interface conforme a equação 2.18. Assim, os pHs 2 e 4 da subfase não correspondem ao pH da interface que possui valores menos ácidos.

Os resultados da condutância lateral para subfases com pH 4 e 6 mostram mesma ordem de grandeza para a condutância. É interessante notar que para subfase aquosa ácida a PANI apresenta uma tonalidade esverdeada, natural do polímero dopado, enquanto que sobre a água a tonalidade é azul mostrando que o polímero está desdopado, ou só parcialmente dopado. Ou a dupla camada aumenta o pH da interface (da solução contendo HCl) para valores próximos ao da água pura, ou a PANI é fracamente dopada para o pH 4, ou, ainda, ilhas de PANI dopadas são circundadas por PANI não dopada. Com a primeira hipótese não é possível explicar a mudança de tonalidade da PANI, com a segunda não podemos explicar a mesma condutância. Assim, das três hipóteses acima, a terceira, ou seja, a existência de uma dopagem heterogênea parece ser a mais correta. A tonalidade esverdeada seria ocasionada pela ilhas de PANI dopada e a mesma ordem de grandeza com a PANI sobre a água seria decorrente da PANI desdopada que circunda as ilhas dopadas. Contudo, para o pH 2 a condutância é da ordem de 10^{-5} S, não deixando dúvidas que, para este pH, a PANI está dopada suficientemente para se tornar condutora. Só para comparação, lembramos que a condutância protônica em filmes formados a partir de isolantes é da ordem de 10^{-8} S.

4.8 - CONCLUSÕES

Com o novo sistema de medidas fomos capazes de medir o aumento da condutância para filmes tradicionais e filmes mistos que possuem apenas condução de prótons. Fomos capazes também de medir a condutância de um filme de polímero condutor em que aparece também uma componente eletrônica. Esse resultado é inédito, sendo que a medida de condutância para um polímero condutor só foi possível a partir do aperfeiçoamento da técnica experimental com a introdução do sistema diferencial.

Todos os filmes que conduzem prótons tiveram valores na ordem de 10^{-8} S, o que parece indicar que a água faz parte do mecanismo de *hop e turn*, que também deve atuar como um limitador para a amplitude da condução. Nossos resultados de condução para os filmes tradicionais são semelhantes aos apresentados pelo grupo de Bangor. Para pequenas áreas por molécula o grupo de Bangor não foi capaz de medir a condutância devido ao efeito menisco. Uma vez eliminado esse efeito, pudemos mostrar que a condutância continua a crescer mesmo quando o filme está bastante condensado. O valor da área crítica observado experimentalmente pode ser explicado por um modelo de transferência de prótons, pelo menos para o ácido esteárico. Essa é a evidência mais forte já apresentada para a formação de uma rede de pontes de hidrogênio na interface filme-água.

4.9 - REFERÊNCIAS

- [1] R. H. Tredgold; Advances in Physics 20 (1977) 70

- [2] J. F. Tocanne e J. Tessié; *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (1990) 111
- [3] M. Gutman; *Method Enzymol.* 127 (1986) 522
- [4] M. J. Politi e J. H. Fendler; *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 265
- [5] T. Nawroth, K. Zwicker, M. Gutweiller e K. Dose; *EBEC Rep.* 5 (1988) 108 (apud ref. [1])
- [6] J. Tessié, M. Prats e B. Gabriel; *Thin Solid Films* 210/211 (1992) 715
- [7] B. Gabriel e J. Tessié; *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1991) 8818
- [8] B. Gabriel M. Prats e J. Tessié; *Biochim. Biophys. Acta* 1186 (1994) 172
- [9] J. Tessié, M. Prats, P. Soucaille e J. F. Tocanne; *Proc. Natl Acad Sci USA* 82 (1985) 3217
- [10] G. L. Jendrasiak e J. C. Mendible; *Biochim. Biophys. Acta* 424 (1976) 133
- [11] I. Szundi; *Chem. Phys. Lipids* 34 (1984) 323
- [12] I. Sakurai e Y. Kawamura; *Biochim. Biophys. Acta* 904 (1987) 405
- [13] I. Sakurai e Y. Kawamura; *Biochim. Biophys. Acta* 985 (1989) 347
- [14] H. Morgan, D. M. Taylor e O. N. Oliveira Jr.; *Chem. Phys. Letters* 150 (1988) 311
- [15] O. N. Oliveira Jr.; PhD Thesis, Bangor, Reino Unido, 1990
- [16] F. M. Menger, S. D. Richardson e G. R. Bromley; *J. Am. Chem. Soc.* 11 (1989) 6893
- [17] V. L. Shapovalov e Yu. V. Il'ichev; *Chem. Phys. Letters* 197 (1992) 303
- [18] H. Morgan, D. M. Taylor e O. N. Oliveira Jr.; *Thin Solid Films* 178 (1989) 73
- [19] H. Morgan, D. M. Taylor e O. N. Oliveira Jr.; *Biochim. Biophys. Acta* 1062 (1991) 149
- [20] A. V. Goryunov e E. E. Yumatov; *Biol. Memb.* 9 (1992) 440 (em Russo)
- [21] R. W. Gurney, *Ionic Process in Solution*, Dover Publication Inc. N.Y. 1953
- [22] F. Franks, *Water*, the Royal Soc. of Chemistry, London 1984
- [23] L. Onsager; *Science* 166 (1969) 1359

- [24] P. W. Atkins; Physical Chemistry, Oxford University Press, Oxford 1990
- [25] T. H. Haines; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 160
- [26] Conversa informal com O. N. Oliveira Jr.
- [27] A. Cavalli; Dissertação de Mestrado, São Carlos, Brasil, 1993
- [28] C. Bonardi; Dissertação de Mestrado, São Carlos, Brasil, 1995
- [29] R. J. Demchak e T. J. Fort; J. Coll. and Interface Sci. 46 (1974) 191
- [30] M. C. Petty; Langmuir-Blodgett Films - An Introduction, Cambridge University Press 1996
- [31] A. Seelig; Biochim. Biophys. Acta 899 (1987) 196
- [32] J. Zsakó, M. Tomoaya-Cotisel, E. Chifu, A. Mocanu e P. T. Frangopol; Chim. Ital. 124 (1994) 5
- [33] H. Mozaffary; Thin Solid Films 244 (1994) 878
- [34] G. P. Borissevitch, M. Tabak, I. E. Borissevitch e O. N. Oliveira Jr.; Colloids and Interface B: Biointerfaces 7 (1996) 69
- [35] G. P. Borissevitch, M. Tabak e O. N. Oliveira Jr.; Biochim. Biophys. Acta 1278 (1996) 12
- [36] P. M. Kiefer, V. B. P. Leite e R. M. Whitnell; Chem. Phys. 194 (1995) 33
- [37] O. N. Oliveira Jr., D. M. Taylor, T. J. Lewis, S. Salvagno e C. J. M. Stirling; J. Chem. Soc., Faraday Trans. I 85 (1989) 1009
- [38] D. M. Taylor, O. N. Oliveira Jr. e H. Morgan; Thin Solid Films 173 (1989) L141
- [39] F. Peñacorada, J. Reiche, S. Katholy, L. Brehmer e M. L. Rodriguez-Méndez; Langmuir 11 (1995) 4025.
- [40] K. Ohara e M. Nakajima; Thin Solid Films 226 (1993) 164.
- [41] R. C. Ahuja, P. Caruso, D. Möbius, G. Wildburg, H. Ringsdorf, D. Philp, J. A. Preece e J. F. Stoddart; Langmuir 9 (1993) 1534.

- [42] O. Fichet, D. Ducharme, V. Gionis, P. Delhaès e R. M. Leblanc; *Langmuir* 9 (1993) 491.
- [43] V. B. P. Leite, A. Cavalli e O. N. Oliveira Jr. "A proton transfer model applied to lateral conductance in Langmuir Films", a ser apresentado na VIII International Organized Molecular Films
- [44] L. H. C. Mattoso, A. G. MacDiarmid, A. J. Epstein; *Synth. Metals* 68 (1994) 1
- [45] S. V. Mello, A. Riul Jr., L. H. C. Mattoso, R. M. Faria e O. N. Oliveira Jr.; *Synthetic Metals* 84 (1997) 773

Capítulo V

Filmes mistos de fosfolipídios e fármacos

5.1 - INTRODUÇÃO

A célula biológica é isolada do meio externo por uma membrana semipermeável, cuja principal função é possibilitar a troca de substâncias entre a célula e o meio. A análise de resultados de membranas celulares “in vitro” é complexa dada a grande variedade de biopolímeros. Os principais grupos de componentes são: fosfolipídios, proteínas e glicoproteínas com colesterol [1]. O estudo das funções da membrana é geralmente realizado com a reconstituição da membrana ou com uma membrana sintética.

Filmes de Langmuir de fosfolipídios podem ser utilizados como modelos simples de membranas celulares, pois o arcabouço de tais membranas é formado por uma bicamada de fosfolipídio, na qual são incorporados os outros constituintes das membranas. Estudamos aqui o efeito de fármacos sobre filmes de Langmuir de fosfolipídio. Neste capítulo mostraremos resultados de pressão e potencial de superfície e condutância lateral para dois sistemas mistos: DPPC-TTC e DPPC-DIB, ou seja, filmes mistos de fosfolipídios com dois anestésicos locais. Uma breve história dos anestésicos locais será relatada na seção 5.3

5.2 - FILMES DE LANGMUIR DE FOSFOLIPÍDIOS: UM MODELO DE MEMBRANA.

Os fosfolipídios, um dos principais grupos de biopolímero da membrana celular, são constituídos de um núcleo glicerol combinado com uma ou duas cadeias de ácidos graxos e uma cabeça polar ou carregada. Se uma quantidade de fosfolipídios for colocada na água, formará uma suspensão, que independentemente do arranjo macroscópico, tem a seguinte estrutura microscópica: as moléculas do fosfolipídio se auto-arranjam, sendo que sua parte

apolar ou hidrofóbica se localiza na parte interna da vesícula, interagindo com as cadeias de hidrocarbonos das moléculas vizinhas [2]. A parte polar fica na região externa da vesícula, em contato com a água. Esta vesícula de fosfolipídio serve como modelo para o estudo da membrana celular. O arranjo macroscópico dependerá da maneira com que se coloca o fosfolipídio na água. Pelo menos quatro métodos experimentais são utilizados para a formação e estudos dos modelos de membranas de fosfolipídios, como apresentado a seguir.

5.2.1 -MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA A FABRICAÇÃO DE MEMBRANAS SINTÉTICAS

No primeiro método adicionam-se pequenas quantidades de água aos fosfolipídios, formando vesículas com a parte polar do fosfolipídio voltada para o exterior, ou seja, a água. A interação entre as vesículas reduz com o aumento da concentração de água na mistura. Este método permite estudar as propriedades óticas e térmicas da membrana. O segundo método envolve o espalhamento de lipídios em um solvente de hidrocarbono através de um pequeno orifício situado em uma parede que separa dois reservatórios. Sob condições adequadas pode-se diminuir progressivamente a espessura da vesícula de lipídios até esta atingir uma única bicamada, a qual é denominada “black lipid membrane”. Posicionando-se dois eletrodos, um em cada reservatório, e adicionando-se substâncias químicas no sistema, é possível estudar a membrana em uma grande variedade de condições químicas e elétricas. Esse é o método geralmente empregado para verificar a possibilidade de transferência de carga elétrica de um lado para outro da membrana.

O terceiro método é a técnica de Langmuir, que possibilita o estudo das propriedades mecânicas, estruturais e de transporte em uma monocamada de fosfolipídio adsorvida na água. Uma variante desta técnica é o estudo da monocamada entre dois líquidos imiscíveis, tais como água e óleo. A quarta técnica é a de Langmuir-Blodgett (LB), na qual os filmes de

Langmuir são transferidos da superfície da água para um substrato sólido. Pode-se depositar uma única monocamada ou multicamadas. Esta técnica viabiliza o estudo por varias técnicas da membrana sem a presença da água.

Um dos principais motivos para a fabricação de biopolímeros e membranas sintéticas é o interesse na possibilidade de estudar a função de grupos da membrana celular quando incorporados por agentes químicos, tais como enzimas e drogas.

5.3 - BREVE HISTÓRIA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

O primeiro anestésico local descoberto foi a cocaína. Esse alcalóide foi isolado em 1860, mas foi apenas em 1879 que Von Anrep [3] estudou a ação farmacológica da droga. Von Anrep observou que simultaneamente à injeção da droga ocorria um adormecimento da pele, tornando-a insensível à picada da agulha. O uso da cocaína foi recomendado por Von Anrep como anestésico local. Mas, o mérito da descoberta da ação da cocaína como anestésico local é dado a Sigmund Freud e Karl Köller [3]. A história popular relata que os dois cientistas (Köller era oftalmologista) estavam procurando um substituto para a morfina e no curso de seus estudos Köller derrubou, sem querer, algumas gotas de cocaína nos seus olhos, notando seu efeito anestésico.

5.3.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS DEPRESSORES DO SISTEMA NERVOSO

As drogas que atuam no sistema nervoso central podem ser divididas em dois grandes grupos: os estimulantes e os depressores. Os depressores são os mais importantes, e representam uma grande parcela de todos os agentes terapêuticos. Por conveniência os depressores podem ser divididos em várias categorias. Uma classificação é dada abaixo:

- 1- **Anestésico**, tais como éter, etilenos, cocaína e derivados
- 2- **Sedativo ou hipnótico**, drogas como os barbitúricos, bromidos e hidratos clorados
- 3- **Narcóticos**, tais como morfina e outros alcalóides.
- 4- **Analgésico e antipiréticos** como a dipirona e salicilato.

Evidentemente, esta é uma classificação para fins didáticos. Por exemplo, sedativos podem ser administrados em grandes quantidades para causar o efeito do anestésico. A classificação acima pode ser mais bem entendida em uma definição delimitada.

- 1- **Anestésicos:** A palavra anestesia literalmente expressa "sem sensação". Anestésicos gerais incluem a perda da sensação de todas as modalidades de sensibilidade e a perda da consciência. Para os anestésicos locais, a perda da sensação é restrita à área exposta.
- 2- **Narcóticos:** A aplicação de narcóticos leva à analgesia acompanhada de sono profundo ou letargia.
- 3- **Sedativos:** um pouco mais fracos que os hipnóticos, os sedativos colocam os pacientes em estado mais calmo. Os hipnóticos causam letargia.
- 4- **Analgésicos:** A analgesia refere-se ao termo de "cegamento" da dor. Um analgésico difere do narcótico por não causar estupor.

5.4 - ANESTÉSICOS LOCAIS

5.4.1 - A FARMACOLOGIA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Os anestésicos locais (AL) são capazes de bloquear o impulso nervoso quando aplicados localmente no tecido nervoso em concentrações adequadas. Eles exercem este

efeito em qualquer porção do sistema nervoso e sobre todo tipo de fibra nervosa. Por exemplo, a aplicação da droga no córtex bloqueia o impulso nervoso da área, e no outro extremo a aplicação da droga no final do nervo aferente evita a recepção do estímulo e transmissão dos impulsos sensoriais. O grande valor prático dos anestésicos locais é que sua ação é totalmente reversível, pois o fenômeno da anestesia é seguido por uma completa recuperação das funções do nervo sem nenhuma evidência de danos para as fibras nervosas ou para as células. Um dos principais passos para a compreensão do fenômeno da anestesia é entender a interação (atuação) de anestésicos locais em membranas de lipídios [4,5].

Técnicas tais como a ressonância magnética de prótons, H-NMR [6], diálise [7,8], fluorescência [9], espectroscopia [10] e monocamadas de Langmuir [11,12] têm sido usadas, nas duas últimas décadas, buscando-se conhecer a ação em nível molecular dos AL.

Os principais AL possuem um grupo amina terciário; estuda-se a espécie (neutra ou catiônica) presente (no caso de uma só espécie), ou significativa (quando as duas estiverem presentes) para os pHs biológicos. Algumas hipóteses sobre a interação dos anestésicos locais vêm sendo defendidas. É vital, para a confirmação destas, saber onde se localizam as moléculas de AL; se as drogas estão próximas à parte polar das moléculas de lipídios; se ocupam uma posição intersticial; se estão dentro ou fora da bicamada; se afetam a estruturação e/ou organização da membrana.

5.4.2 BREVE REVISÃO

As perturbações dinâmicas de lipídios causadas por anestésicos (dibucaína, tetracaína e procaína) e a localização destes foram estudadas por medidas de ^1H - ^1H NOEs (nuclear Overhauser effects). Observou-se que a dibucaína e a tetracaína se ligam mais fortemente a lipídios neutros que a procaína, e que suas mobilidades diminuem de tal maneira que permitem a difusão de spins. Os NOEs intermoleculares foram mais efetivos entre os

fosfolipídios e a dibucaína do que a tetracaína, indicando que a DIB se liga mais fortemente ao lipídio que a TTC, o que está de acordo com a maior potencialidade da DIB [6].

As ligações da dibucaína com o DMPC foram estudadas por Eftink et al. [7] para vários pHs, sendo que através de cálculos das concentrações da dibucaína livre e ligada, identificou-se um número de moléculas que satura a ligação com as moléculas do DMPC. Tal número foi de 1 molécula de dibucaína para 5 moléculas de DMPC. Usando a mesma técnica que Eftink [7], Barghouthi et al [8] obtiveram dados para as ligações da dibucaína catiônica (DIBC) em fosfolipídios neutros (DMPC) e aniônicos (DMPG) para diferentes temperaturas e força iônica. O grau de ligação da DIBC foi maior para temperaturas menores que a temperatura de transição de fase do DMPC, do que para temperaturas acima desta. Também há um aumento do grau de ligação conforme aumenta a concentração de DMPG na solução [8].

5.4.3- SOBRE O pK DA DIBUCAÍNA

Apesar do grande número de trabalhos realizados com anestésicos locais, o mecanismo de atuação destas drogas continua incerto. Para entender os dados obtidos da interação da droga com as membranas é importante conhecer as concentrações das formas carregada e neutra dos anestésicos locais amina terciário. Ritchie e Greengard [13] obtiveram em 1961 um pK 8.5 para a amina terciária, mas quando esta está presente na dibucaína seu pK passa para 8.95 [14], provavelmente devido à densidade eletrônica dos anéis aromáticos.

Na subfase aquosa o grupo amina terciária da dibucaína sofre uma variação no pK, possivelmente pela aparição da dupla camada de Gouy-Chapman.

$$pH_s = pH_b + \left(\frac{e\psi}{2.3KT} \right) \quad (1)$$

onde os subíndices s e b se referem respectivamente à superfície e ao volume, " e " a carga do elétron e ψ_0 o potencial de Gouy-Chapman. Lee et al [15] mostraram que o pK da amina terciária de anestésicos locais diminui de uma unidade. Tal resultado foi confirmado por Mayer et al [16] que obtiveram um pK 7.5.

Coutinho e colaboradores [17] observaram que para um pH 7.4, 96% das moléculas de dibucaína estavam sob a forma monocationica (monoprotonada), em concordância com o pK 7.5 para o grupo amina terciária presente na dibucaína. O pK da amina terciária do grupo colina existente nos fosfolipídios é aproximadamente 13, sendo que tal diferença de pK é devida ao grupo PO_4^- , ou seja, a uma maior densidade eletrônica na molécula. Como a dibucaína é um anestésico local, é interessante saber seu comportamento em micelas de PC. Louro et al [9] usando DIB fluorescente observaram um decréscimo no pK de 8.95 para um pK de 8.6 quando a dibucaína interage com micelas de PC. Concluem ainda que aparentemente as constantes de ligação da forma neutra da DIB são independentes da carga das micelas e pouco sensível ao tamanho das cadeias de hidrocarbonos.

5.4.4 - LOCALIZAÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

A localização dos AL em membranas sintéticas de fosfolipídios é consequência de vários tipos de interações possíveis entre o anestésico e o fosfolipídio. A parte alifática do AL pode interagir hidrofobicamente com as cadeias de hidrocarbonos dos lipídios. Já os grupos polares e os anéis aromáticos polarizáveis são capazes de interações dipolo-dipolo ou formar pontes de hidrogênio com o grupo glicerol e finalmente sofrem interações íon-dipolo com as cargas das cabeças polares. Estas considerações mostram que os AL estão localizados, no caso de uma bicamada, de preferência na parte próxima da interface do que no núcleo hidrofóbico. Para uma monocamada de Langmuir a localização dos AL depende das interações com as caudas, cabeças e da afinidade com a subfase aquosa. As interações

eletrostáticas das formas carregadas dos AL devem fazer com que eles fiquem mais próximos à interface do que as suas formas neutras. Medidas realizadas com a TTC por Boulanger, Schreier e Smith [18] confirmam esta suposição. O ponto de vista descrito acima é demonstrado em artigos, nos quais várias técnicas foram utilizadas: difração de Raios-X, fluorescência, RMN, diálise e outras. A mobilidade dos AL decai quando se ligam a bicamadas de lipídios como demonstrado por medidas de H-RMN [6] e por EPR [19].

A localização da DIB em retículos sarcoplasmáticos foi estudada por Louro et al [20] por meio de supressão de sua fluorescência intrínseca por iodeto e por ácidos graxos com rotulação de spin em diferentes posições. Os autores chegaram à conclusão de que a profundidade média da DIB corresponde ao carbono 4 da cadeia acil. Kuroda e co-autores [6] também sugerem que o anel da DIB se localiza próxima ao mesmo carbono 4. Para a TTC, resultados mostram que esta se aprofunda até o carbono 9 para o DMPC [18] ou carbono 7 para a fosfatidilcolina de ovo [6]. Barghouti et al [8] usaram fluorescência resolvida no tempo para investigar as ligações da DIB com vesículas constituídas de DMPC ou DMPG. As ligações da DIB tiveram seu acesso reduzido para os supressores em fase aquosa. Medidas de decaimento anisotrópico mostraram que o movimento rotacional da DIB era desacelerado quando esta interagia com a membrana.

Os estudos descritos acima mostram claramente que a TTC penetra mais profundamente na membrana do que a DIB. Em filmes de Langmuir, onde a matriz é uma monocamada de fosfolipídio, a TTC deve causar mudanças no empacotamento da matriz. Penetrando mais profundamente a TTC deve alterar as interações hidrofóbicas entre as moléculas de fosfolipídio. A dibucaína, por sua vez, deve alterar muito pouco o empacotamento da matriz. A interação da molécula de DIB será maior com as cabeças polares, interagindo fracamente com as caudas hidrofóbicas.

5.5 - RESULTADOS

Neste item mostraremos os resultados de pressão e potencial de superfície para os sistemas compostos de anestésicos locais e fosfolipídios, DPPC-DIB e DPPC-TTC. Todas as curvas apresentadas são a média de pelo menos 10 medidas.

A figura 5.1 mostra as curvas de pressão de superfície versus a área por fosfolipídio para o sistema DPPC-TTC. Os resultados de pressão obtidos com o sistema DPPC-DIB são apresentados na figura 5.2. Pode-se observar que a área por fosfolipídio para o sistema

Figura 5.1 - Resultados de pressão de superfície versus área por molécula de fosfolipídio de filmes de TTC-DPPC coespalhados para as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40% de TTC na mistura

DPPC-TTC, para uma mesma pressão, é aumentada acentuadamente com o aumento da concentração do anestésico. Para o sistema DPPC-DIB, a variação da área por molécula de fosfolipídio para uma pressão aumenta de maneira discreta com o incremento do AL. Para ambos os sistemas, as pressões de colapso foram sempre superiores a 40mN/m; apenas para o filme misto contendo 33% de DIB (dado não mostrado) a pressão de colapso foi menor que o resultado acima. Isso demonstra que para esta concentração o filme de Langmuir era menos

estável.

Figura 5.2 -Resultados de pressão superficial versus área por molécula de DPPC para filmes mistos de DIB-DPPC coespalhados para as seguintes concentrações: 0, 9.1, 16.6 25% na mistura

A partir dos gráficos das curvas de $\Pi \times A$ calculamos a área efetiva ocupada pelos anestésicos (TTC e DIB) nos filmes através da equação 19 do capítulo 2. Esse dados foram representados em relação à concentração nos figuras 5.3 e 5.4 respectivamente.

Os resultados obtidos do potencial de superfície para os anestésicos locais coespalhados com o DPPC versus área por fosfolípido são apresentados nas figuras 5.5 e 5.6. O potencial máximo do sistema DIB-DPPC é menor que o máximo potencial do DPPC puro, mas este não varia com a mudança de concentração do anestésico. A área crítica aumenta na presença da dibucaína, mas não se altera com o aumento da concentração do anestésico na mistura DIB-DPPC. Pode-se observar na figura 5.5 que o potencial máximo do sistema se mantém muito próximo do potencial do DPPC puro. Contudo, a área para um mesmo valor de potencial depende da concentração do anestésico na mistura. A área crítica para a mistura também depende da concentração de anestésico.

FIGURA 5.3 - Gráfico da área calculada da TTC para a pressão de superfície de 31mN/m versus a concentração de anestésico na mistura coespalhada sobre a água.

FIGURA 5.4 - Gráfico da área calculada para a molécula de DIB para a pressão superficial de 31 mN/m versus concentração do anestésico na mistura coespalhada sobre a água.

Figura 5.5 - Gráfico de potencial versus área por molécula de fosfolípido da mistura TTC-DPPC.

Figura 5.6 - Gráfico de potencial de superfície versus área por molécula de fosfolípido para a mistura coespalhada de DIB-DPPC

Nas figuras 5.1 e 5.5 podemos observar que as curvas de pressão e potencial de superfície mantêm a mesma forma para as várias concentrações de anestésico. A tabela 5.1 mostra os principais resultados obtidos com os filmes mistos de anestésico local-fosfolipídio

TABELA 5.1	A_{min}	A_e	A_c	ΔV_{max}	Π
DPPC	40±2	45±2	110±5	530±10	62±3
Resultados obtidos de gráficos de Π e ΔV versus área por molécula					
DIB 9%	38±3	49±6	112±5	420±10	50±4
DIB 16.6%	34±2	46±2	104±5	420±12	46±4
DIB 25%	31±3	41±5	97±5	420±10	44±5
Resultados obtidos de gráficos de Π e ΔV versus área por molécula de fosfolipídio					
DIB 9%	43±3	53±6	131±5	420±10	50±4
DIB 16.6%	42±2	52±2	131±5	420±12	46±4
DIB 25%	41±3	51±5	113±5	420±10	44±5
Resultados obtidos de gráficos de Π e ΔV versus área por molécula					
TTC 10%	48±4	61±7	141±14	532±20	50±7
TTC 20%	32±3	46±5	113±12	410±20	47±5
TTC 30%	32±2	43±4	91±11	500±20	50±4
TTC 40%	38±6	46±8	115±15	545±20	51±8
Resultados obtidos de gráficos de Π e ΔV versus área por molécula de fosfolipídio					
TTC 10%	54±4	69±7	159±14	532±20	50±7
TTC 20%	51±3	64±5	142±12	410±20	47±5
TTC 30%	51±4	67±4	131±11	500±20	50±4
TTC 40%	56±5	81±8	196±15	545±20	51±8

TABELA 5.1- Tabela dos principais resultados: área de colapso, A_{min} ; área expandida, A_e ; área crítica, A_c ; potencial máximo ΔV_{max} e pressão de colapso π ; para os filmes mistos de anestésicos locais.

5.6 - DISCUSSÃO

As concentrações das drogas utilizadas nesse trabalho são muito maiores do que as empregadas para uso terapêutico. Isso foi necessário para que efeitos mensuráveis pudessem ser observados. A razão para isso é que, provavelmente, a ação farmacológica dos

anestésicos locais deve depender de sua interação com as proteínas da membrana, e não apenas com a bicamada de fosfolipídios. Ou seja, para atingir as proteínas, as drogas precisam interagir com a membrana. Porém, a quantidade necessária para uma ação farmacológica eficaz deve ser menor do que aquela para causar mudanças na bicamada de fosfolipídio.

Os gráficos da pressão de superfície versus área por molécula de fosfolipídio mostram que a dibucaína não muda acentuadamente o empacotamento dos fosfolipídios, enquanto que a tetracaína compromete o empacotamento, embora de maneira não monotônica, ou seja, um aumento da concentração de tetracaína nem sempre acarreta numa maior área para o sistema TTC-DPPC.

A parte hidrofóbica da molécula de fosfolipídio é responsável pela mudança da tensão superficial da água (para pequenas áreas por moléculas). A área extrapolada para o filme condensado é geralmente dependente da área ocupada pelas caudas, de maneira que a inserção de quaisquer moléculas estranhas entre as caudas do fosfolipídio, no estado condensado, deve afetar a área extrapolada deste estado, devido à mudança no empacotamento. Este empacotamento do filme é diretamente afetado pelas interações hidrofóbicas entre as moléculas. A mudança mais acentuada ocasionada pela tetracaína pode ser explicada pelo fato de esta penetrar mais profundamente, até o carbono 9 do fosfolipídio [6, 18] do que a dibucaína, que se aprofunda até o carbono 4 [6, 20].

No caso da tetracaína, nossos resultados apontam que esta não deve se distribuir homogeneamente na matriz de fosfolipídio, pois isto implicaria em um aumento da expansão da matriz de fosfolipídio proporcional ao aumento da concentração de anestésico coespalhado, o que não acontece. Observando a figura 5.1, vemos que a menor expansão da matriz de fosfolipídio acontece para a concentração de 20% de anestésico; as concentrações de 10% e 30% possuem empacotamentos muito próximos e, finalmente, a maior expansão

ocorre para a concentração de 40%. As curvas de potencial de superfície do sistema TTC-DPPC, figura 5.6, mostram áreas críticas aumentando na seguinte ordem 30%, 20%, 10% e 40%, o que difere da ordem de empacotamento apresentado no figura 5.1.

Há 3 possibilidades para explicar os resultados obtidos. A primeira hipótese é que existe perda de anestésico local (DIB e TTC) da monocamda. Este material absorvido pela água não causaria mudanças nas medidas de pressão e potencial de superfície. Realizamos medidas de fluorescência com material da subfase e não encontramos nenhum sinal da presença de anestésico no volume de água. Cabe ressaltar que a amostra de água foi retirada da subfase quando a monocamda mista estava no estado condensado. A segunda possibilidade é que a monocamada mista apresente ilhas nas quais só existam anestésicos ou só fosfolipídios. Se estas ilhas fossem suficientemente grandes para serem detectadas pela eletrobalança ou pela prova de Kelvin, as medidas de pressão e potencial de superfície seriam irreprodutíveis, o que não foi observado. Contudo se as ilhas forem pequenas, de dimensões microscópicas, os equipamentos de medidas que registram mudanças nas propriedades macroscópicas dos filmes de Langmuir não seriam capazes de detectar sua presença. Uma terceira hipótese é a da ocupação dos interstícios e vacâncias da matriz de fosfolipídios por uma ou mais moléculas de anestésico dependendo da concentração da mistura. Com as técnicas de medidas utilizadas não somos capazes de diferenciar a segunda da terceira hipótese. Então podemos apenas concluir que: ou existem ilhas nos filmes mistos ou então a ocupação dos interstícios e vacâncias da matriz de fosfolipídios depende da concentração da mistura.

Figura 5.7 - Representação da posição ocupada pelos anestésicos locais: a) DIB e b) TTC na matriz de fosfolipídio DPPC [6].

A dibucaína não causa grande perturbação no empacotamento da matriz. Isto nos leva a crer que as moléculas deste anestésico possuem interações hidrofóbicas muito fracas com o fosfolipídio. Sua localização deve permitir uma maior interação com o grupo polar das moléculas de DPPC. Na figura 5.6, podemos observar que a área crítica aumenta na presença da dibucaína, não se alterando para diferentes concentrações do anestésico, provavelmente por a dibucaína tomar o lugar de uma ou mais moléculas de água, interagindo com as moléculas vizinhas de DPPC. Ainda nesta mesma figura, vemos que o potencial máximo diminui com a introdução do anestésico mostrando que a componente normal do dipolo efetivo da dibucaína orienta-se para o volume de água, diminuindo o potencial observado para o filme misto. Seelig [11] mostra que se pode comparar a monocamada do sistema DIB-DPPC com o sistema DIB-bicamada de DPPC para a pressão de 31.7mN/m. Para esta pressão os nossos resultados mostram o decaimento do potencial do DPPC, quando coespalhado com o anestésico. Isto é consistente com os resultados de Kuroda et al [6], que mostram que a molécula de dibucaína está localizada próxima às cabeças polares da molécula de fosfolipídio e com o dipolo do grupo C=O orientado para o exterior da

bicamada. Devido à orientação da dibucaína proposto por Kuroda [6] é de se esperar que o potencial do filme misto DIB-DPPC diminua, pois o momento de dipolo efetivo da molécula do anestésico está direcionado para a subfase, diminuindo o momento de dipolo efetivo do sistema DIB-DPPC que é predominantemente direcionado para o ar. Esta diminuição do momento de dipolo efetivo causa o decréscimo do potencial observado.

Usando a técnica de diálise de equilíbrio, Barghouthi et al [8] estudaram as associações da dibucaína protonada com os fosfolipídios dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) ou com o dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG). Os resultados foram ajustados por dois modelos: 1) O modelo de ligações saturadas, no qual se assume um número máximo de ligações possíveis entre a droga e a bicamada de lipídios. 2) O modelo de ligações insaturadas, no qual a ligação da droga é descrita como um equilíbrio de partição, com fatores incluindo os efeitos eletrostáticos e a expansão da superfície da bicamada causada pela intercalação da droga entre as moléculas de lipídios. A área calculada para a dibucaína esteve entre 46.7 e 48.6 Å² para o ajuste com o modelo de ligações saturadas e entre 25.6 e 30 para o modelo de ligações insaturadas..

Usando um modelo molecular para a dibucaína protonada, Seelig [11] calcula a mínima área de secção transversal da molécula como sendo 55Å², mas ressalta que a dependência da área da molécula da DIB com a pressão é desconhecida. Em um trabalho posterior Seelig et al [21] argumentam que enquanto o modelo de ligações saturadas pode ser apropriado para moléculas que se ligam à superfície, a ligação da DIB deve ser mais corretamente descrita pelo modelo de ligações insaturadas, pois medidas de pressão de superfície mostram que a droga expande a matriz de lipídio.

Utilizando a técnica de diálise de equilíbrio Eftink et al [7] concluíram que são necessárias no mínimo 5 moléculas de DMPC para se associar a uma molécula de dibucaína protonada. Infelizmente nesta técnica não é possível contar quantas moléculas de lipídio

estão em um lado da bicamada e quantas estão do outro lado, não se podendo prever o número de moléculas que interagem diretamente com a dibucaína protonada.

A área calculada aqui para a molécula de dibucaína, para as várias concentrações da droga coespalhada com a matriz de fosfolipídio, foi mostrada na figura 5.4. Pode-se ver que para as concentrações de 25 e 33,3%, ou seja, 1 molécula de DIB para 3 ou 4 moléculas de DPPC a área calculada é muito menor que para as concentrações entre 9 e 16,67%. Lembrando da conclusão de Eftink [7] (onde são necessárias no mínimo 5 moléculas de DPPC para 1 molécula de DIB) possivelmente a diminuição da área calculada se dá pela perda de moléculas da monocamada para a subfase. Contudo medidas de fluorescência mostraram que há no máximo 15% de moléculas da droga na subfase. Acreditamos que a droga, que saiu da monocamada, esteja muito próxima da interface. Seelig [11] observou que a DIB possui atividade superficial, e portanto suas moléculas podem permanecer próximas da interface, sem contribuir significativamente para a área por molécula do filme de Langmuir, mas sem se perder na subfase. Os resultados das áreas calculadas para concentrações menores que 16,67% (1 DIB para 5 DPPC) estão de acordo com os resultados obtidos por Barghouthi et al para o modelo de ligações insaturadas, o qual é o mais apropriado para a DIB, por esta causar a expansão da matriz de lipídio.

Ambos os sistemas mistos foram menos estáveis que o DPPC puro como se pode observar nos resultados de II apresentados na tabela 5.1. Pode-se observar que o sistema DIB-DPPC é menos estável que o filme misto TTC-DPPC. Enquanto uma maior concentração de DIB no filme misto acarreta numa menor estabilidade do filme, mudanças na concentração de TTC parecem não alterar significativamente a estabilidade do filme misto (menos estável que o fosfolipídio). O fato de os filmes mistos serem menos estáveis do que o DPPC puro é consequência da pequena hidrofobicidade dos anestésicos em comparação com o fosfolipídio.

As principais conclusões com os sistemas mistos são: a) a tetracaína possui interações hidrofóbicas com o DPPC mais fortes que a dibucaína. b) os dipolos efetivos da DIB são orientados para o volume de água e o da TTC orientados na direção oposta. c) a TTC aprofunda-se mais que a DIB no interior da matriz de DPPC. Com base nesta análise mostramos na figura 5.7 a localização e orientação dos anestésicos na matriz de fosfolipídio.

5.7 - Referências

- [1] R. H. Tredgold; Order in Thin Organic Films, Cambridge University Press, Cambridge 1994
- [2] R. H. Tredgold; Advances in Physics 26(2) (1977) 79
- [3] L. Goodman e A. Gilman; The Pharmacological Basis of Therapeutics, The Macmillam Company, N.Y. 1994
- [4] A. G. Lee; Nature 262 (1976) 545
- [5] J. R. Trundell; Anesthesiology 46 (1977) 5
- [6] Y. Kuroda e Y. Fujiwara; Biochim. Biophys. Acta 903 (1987) 395
- [7] M. R. Eftink, R. K. Puri e M. D. Ghahramani; Biochim. Biophys. Acta 813 (1985) 137
- [8] S. A. Barghouthi, R. K. Puri e M. R. Eftink; Biophys. Chem. 46 (1993) 1
- [9] S. R. W. Louro, O. R. Nascimento e M. Tabak; Biochim. Biophys. Acta 1190 (1994) 319
- [10] L. E. G. Eriksson; Biophys. Chem. 26 (1987) 9
- [11] A. Seelig; Biochim. Biophys. Acta 899 (1987) 196
- [12] A. Cavalli, G. Borissevitch, M. Tabak e O. N. Oliveira Jr. Thin Solid Films 284-285 (1996) 731

- [13] J. M. Ritchie e P. Greengard; J. Pharm. Exp. Therap. 133 (1961) 241
- [14] G. Vanderkooi; Photochem. and Photobiol. 39 (1984) 755
- [15] A. G. Lee; Biochim. Biophys. Acta 514 (1978) 95
- [16] L. D. Mayer, M. B. Bally, M. J. Hope e P. R. Cullis; J. Biological Chem. 260(2) (1985) 802
- [17] A. Coutinho, J. Costa, J. L. Faria, M. N. Berberan-Santos e M. J. E. Prieto; Eur. J. Biochem. 189 (1990) 387
- [18] Y. Boulanger, S. Schreier e I. C. P. Smith; Biochemistry 20 (1981) 6824
- [19] J. Miyazak, K. Hideg, D. Marsh, Biochim. Biophys. Acta 1103 (1992) 62
- [20] S. R. W. Louro, M. Tabak e O. R. Nascimento; Biochim. Biophys. Acta 1189 (1994) 243
- [21] A Seelig, P. R. Allegrini e J. Seelig; Biochim. Biophys. Acta 939 (1988) 267

Capítulo VI

Conclusões

6.1 - CONCLUSÕES

A condutância lateral de um filme de Langmuir é medida através do registro de uma corrente elétrica (d.c. ou a.c.) que flui entre dois eletrodos de platina imersos na subfase líquida. Obviamente, a corrente medida é fruto da condutância de volume da subfase e da contribuição da fina camada de Langmuir. Para os compostos tradicionais, como os álcoois, fosfolípidos e fosfoglicídios, a condutância do filme de Langmuir é nula para grandes áreas por molécula, mas começa a crescer durante a compressão do filme a partir de uma dada área crítica, que depende do composto em estudo.

Com o sistema diferencial fabricado neste trabalho [1], foi possível resolver os principais problemas nas medidas de condutância em filmes de Langmuir-[2-6]; a saber: a) pequeno incremento da condutância devido ao filme, b) efeito menisco e c) obter uma subfase livre de impurezas. Estas dificuldades perduravam há quase uma década. O sistema diferencial é similar à ponte de Wheatstone, com os eletrodos que medem a condução em filmes de Langmuir sendo um dos braços desta ponte. Para subtrair o sinal da água, potenciômetros em série foram colocados em um segundo braço. Os outros dois braços foram ocupados por resistores de carga. Com a subtração do sinal da subfase pudemos aprofundar nossos eletrodos até seu topo estar no mesmo nível da superfície da água, eliminando o efeito menisco. Esse efeito consiste num artefato experimental em que a área imersa dos eletrodos diminui conforme a tensão superficial do filme se torna menor que uma tensão crítica. Assim pudemos realizar medidas de condutância de filmes de Langmuir até a área de colapso. Experimentos anteriores ao nosso sistema só mediam o aumento da condutância até a pressão de superfície começar a incrementar [4,5]. Tal sistema também proporcionou medir a condutância de filmes de Langmuir em subfases com diferentes pHs. Até então, esta medida era impossível por causa do pequeno incremento da condutância devido ao filme [6].

As medidas de condutância em filmes tradicionais (isolantes) sempre foram da ordem de (10^{-8} S). A condutância só aumentava acima daquela da subfase na mesma área em que o potencial de superfície aumentava abruptamente. Pudemos comprovar, através de medidas de condutância com correntes ac e dc, que a condutância não é devida à migração de íons. Ainda pudemos provar que a condutância não era ocasionada pelo transporte de elétrons e nem devido à dupla camada. Assim concluímos que a condução em filmes de Langmuir é protônica, e o mecanismo de condução é o "hop and Turn" onde um salto de próton entre duas moléculas é seguido de uma reorientação de ambas as moléculas. Com um modelo teórico para a transferência de prótons [7] fomos capazes de identificar a área crítica como a maior área possível para uma molécula de água se ligar a duas moléculas do filme de Langmuir. Este modelo propiciou a teoria necessária para concluirmos que a condutância incrementa a partir da área crítica por causa da formação de pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio, além de criarem dutos preferenciais facilitando a condução de prótons, diminuem abruptamente a constante dielétrica da interface, ocasionando um aumento - também abrupto - no potencial de superfície. Realizamos, também, medidas de condutância em um filme de polímero condutor (PANI) cujo incremento para o pH 2 foi da ordem de 10^{-5} S mostrando que o sistema diferencial permite medir condução eletrônica. Medidas de condução em polímeros condutores sobre a superfície da água são inéditas na literatura.

Como o estudo da membrana celular *in vitro* é complicado pelo número de substâncias e componentes da membrana, geralmente utilizam-se modelos de membranas para facilitar a análise dos resultados obtidos. Um dos principais constituintes da membrana celular são os fosfolipídios. Dentre as técnicas que modelam a membrana está a técnica de Langmuir, que possibilita o estudo das propriedades mecânicas, estruturais e de transporte. A utilização de filmes de Langmuir de fosfolipídio como matriz para a incorporação de drogas e enzimas permite - ainda que indiretamente - o estudo da interação desses materiais

com a membrana. Um dos principais passos para a compreensão do fenômeno da anestesia é entender a interação (atuação) de anestésicos locais em membranas de lipídios [8]. Estudamos as interações de anestésicos locais com um modelo de membrana (matriz de fosfolipídio) utilizando uma técnica conhecida como "cospredding" (coespalhamento). Até então o único estudo realizado em filmes mistos de fosfolipídio e anestésicos locais havia sido realizado utilizando a técnica de adsorção de Langmuir[9]. A técnica do coespalhamento oferece a vantagem (sobre a adsorção de Langmuir) de se ter a certeza de que as mudanças nas propriedades da matriz são ocasionadas pelo anestésico local[10,11]. Uma análise cuidadosa das curvas de pressão e potencial de superfície foi realizada. Desta análise pudemos concluir que a TTC aprofunda-se mais na parte apolar, possuindo interações hidrofóbicas mais fortes que a DIB, a qual se localiza mais próxima da parte polar da molécula de DPPC. Além disso, o momento dipolar efetivo da DIB está orientado para o volume de água e o da TTC para a direção oposta. Nossos resultados da secção transversal da DIB são consistentes com resultados da literatura. A posição e orientação dos anestésicos locais em bicamada propostas por outros autores estão em concordância com nossos resultados.

Um estudo mais completo sobre a interação dos anestésicos com a monocamada de fosfolipídio e medidas da condutância em filme tradicionais com subfases com diferentes pHs são alguns dos trabalhos que sugeriremos na próxima seção. O trabalho apresentado nesta tese abriu perspectivas de novas pesquisas, a partir da utilização do novo sistema diferencial para medidas de condutância.

6.2 - TRABALHOS FUTUROS

6.2.1 - APERFEIÇOAMENTO DO SISTEMA DE MEDIDAS DE

CONDUTÂNCIA

Atualmente estamos automatizando o sistema diferencial para facilitar seu uso por outros pesquisadores. Nosso objetivo é de que seja possível ajustar o sistema e realizar medidas de condutância utilizando o mesmo programa de computador que gerencia a cuba de Langmuir. As placas de interface já foram adquiridas e o circuito diferencial que registrará a condutância está sendo desenvolvido. Nossa maior dificuldade atual é reprogramar o software LB5000 (que gerencia a cuba) para permitir a inserção de um novo tipo de medida. Outro aperfeiçoamento que pode ser realizado no sistema de medidas é a incorporação de um sistema ótico para posicionar mais adequadamente os eletrodos. Um protótipo deste sistema foi produzido; contudo os resultados não foram satisfatórios, sobretudo porque o protótipo não contou com precisão da ordem de micra, que requer uso de mecânica fina. Isso está sendo providenciado para o próximo sistema. Ressalte-se que para o desenvolvimento da instrumentação estamos contando com o apoio de um aluno de iniciação científica, cuja formação é em engenharia mecatrônica.

6.2.2 - MODELOS PARA A INTERPRETAÇÃO DA CONDUTÂNCIA LATERAL EM FILMES DE LANGMUIR

O modelo de Kiefer et al [7] para a transferência de prótons pode ser estendido para outras classes de compostos que formam filmes de Langmuir e comprovar se as conclusões obtidas até o momento podem ser generalizadas para a interpretação dos diversos resultados de área crítica de que dispomos. Saliente-se que o modelo de Kiefer et al [7] prevê que abaixo de uma certa distância entre os grupos doador e aceitador de prótons, passa-se de um sistema descrito por dois níveis de energia para um outro com um único nível de energia. Com isso, a probabilidade de transferência do próton aumenta exponencialmente com o

decréscimo da distância entre aceitador e doador. Deve ser esta a razão para a alta mobilidade protônica em filmes de Langmuir, quando comparada à mobilidade no gelo, que também ocorre através do mecanismo "*hop and turn*". Nossos cálculos iniciais [12] mostram que tal distância deve ser menor no filme de Langmuir do que na água ou no gelo. Esses estudos poderão ser continuados, principalmente na tentativa de quantificar os efeitos observados para comparação com os resultados experimentais.

Além da constatação de condução protônica para filmes de fosfolipídios e ácidos graxos, temos evidências de uma componente eletrônica em filmes de polímeros condutores, como a polianilina e derivados. A continuação desses estudos será importante pelo ineditismo dessa observação, já que ainda não existe registro na literatura da condutância lateral de polímeros condutores.

6.2.3 - INTERAÇÃO DE FÁRMACOS COM MONOCAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS

Nesta tese realizamos estudos com dois anestésicos locais, a tetracaína (TTC) e a dibucaína (DIB), incorporadas em uma matriz de um filme de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Para ambos os sistemas TTC-DPPC e DIB-DPPC medimos a pressão e potencial de superfície e condutância lateral. Com os resultados de potencial e pressão fomos capazes de mostrar que a TTC localiza-se mais profundamente na matriz de DPPC do que a DIB. Os resultados de condutância lateral da DIB estão de acordo com nossas expectativas; contudo a condutância do sistema TTC-DPPC apresentou resultados muito maiores que os esperados. Estes resultados mostram-se reprodutíveis, mas um estudo mais detalhado se faz necessário.

Nesta tese de Doutorado apresentei resultados de ambos os sistemas sobre a superfície da água ultrapura. Seria interessante estender esse trabalho para subfases com diferentes pHs, pois o estado de protonação de ambos os anestésicos (TTC e DIB) devem influenciar na

interação com o filme de Langmuir. Além disso, a finalização desse conjunto de resultados permitirá uma comparação direta entre os dados dos sistemas DIB-DPPC e TTC-DPPC.

6.3 REFERÊNCIAS

- [1] A. Cavalli e O. N. Oliveira Jr.; Rev. Sci. Instrum., 66, (1995) 5567.
- [2] I. Sakurai e Y. Kawamura; Biochim. Biophys. Acta 904 (1987) 405
- [3] I. Sakurai e Y. Kawamura; Biochim. Biophys. Acta 985 (1989) 347
- [4] H. Morgan, D. M. Taylor e O. N. Oliveira Jr.; Chem. Phys. Letters 150 (1988) 311
- [5] F. M. Menger, S. D. Richardson e G. R. Bromley; J. Am. Chem. Soc. 11 (1989) 6893
- [6] V. L. Shapovalov e Yu. V. Il'ichev; Chem. Phys. Letters 197 (1992) 303
- [7] P. M. Kiefer, V. B. P. Leite e R. M. Whitnell; Chem. Phys 194 (1995) 33
- [8] E. de-Paula e S. Schreier; Braz. J. Med. Res. 29 (1996) 1
- [9] A. Seelig; Biochim. Biophys. Acta 899 (1987) 196
- [10] G. P. Borissevitch, M. Tabak e O. N. Oliveira Jr.; Biochim. Biophys. Acta 1278 (1996) 12
- [11] G. P. Borissevitch, M. Tabak, I. E. Borissevitch e O. N. Oliveira Jr.; Colloids and Interface B: Biointerfaces 7 (1996) 69
- [12] V. B. P. Leite, A. Cavalli e O. N. Oliveira Jr. A proton transfer model applied to lateral conductance in Langmuir films a ser apresentada na 8ª International Conference on Organized Molecular Films