

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Dissertação de Mestrado

"Estudo de monocamadas fosfolipídicas nanoestruturadas obtidas por LB para
aplicações em biossensores"

Autor: Juliano Elvis de Oliveira
Orientador: Prof. Doutor Herman Sander Mansur

Fevereiro/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Juliano Elvis de Oliveira

ESTUDO DE MONOCAMADAS FOSFOLIPÍDICAS NANOESTRUTURADAS OBTIDAS POR
LB PARA APLICAÇÕES EM BIOCENSORES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Engenharia de Materiais
Orientador: Professor Doutor Herman Sander Mansur

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
2007

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	<i>Química de Superfícies</i>	5
3.1.1	<i>Tensão Superficial e Interfacial</i>	5
3.1.2	<i>Efeitos da Temperatura na Tensão Superficial</i>	6
3.1.3	<i>Formas de se Quantificar a Tensão Superficial e Interfacial</i>	7
3.1.4	<i>Atividade Superficial</i>	8
3.1.5	<i>Espalhamento</i>	10
3.1.6	<i>Pressão Superficial</i>	11
3.1.7	<i>Isotermas Área-Pressão Superficial</i>	12
3.1.8	<i>Estabilidade Termodinâmica</i>	13
3.2	<i>Deposição LB</i>	13
3.2.1	<i>Breve Histórico</i>	14
3.2.2	<i>A cuba</i>	16
3.2.3	<i>O ambiente</i>	18
3.2.4	<i>A subfase</i>	18
3.2.5	<i>O substrato</i>	19
3.2.6	<i>Material do filme e solvente</i>	19
3.2.7	<i>Preparação e configuração dos equipamentos</i>	20
3.2.8	<i>Mono e Multicamadas de biomoléculas</i>	20
3.3	<i>Membranas Celulares</i>	21
3.3.1	<i>Fosfolípido</i>	23
3.3.2	<i>Colesterol</i>	26
3.3.3	<i>Proteínas</i>	27
3.3.4	<i>Transporte de pequenas Moléculas</i>	28
3.3.5	<i>Canais Iônicos</i>	29
3.3.6	<i>Membranas Celulares Artificiais</i>	31

3.4	Biosensores	32
3.4.1	<i>Propriedades de Interesse</i>	33
3.4.2	<i>O Primeiro Biosensor</i>	34
3.4.3	<i>As Partes de um Biosensor</i>	35
3.4.3.1	<i>O Analito</i>	35
3.4.3.2	<i>O Componente Biológico</i>	35
3.4.3.3	<i>Transdução</i>	39
4	METODOLOGIA	41
4.1	Preparo de Soluções	42
4.1.1	<i>Água deionizada</i>	42
4.1.2	<i>Solução de fosfolipídio</i>	43
4.1.3	<i>Solução de Colesterol</i>	43
4.1.4	<i>Solução de PBS</i>	43
4.1.5	<i>Solução de BSA 1mg/mL</i>	44
4.2	Obtenção de Isotermas	44
4.2.1	<i>Isotermas de sistemas simples de fosfolipídios</i>	44
4.2.2	<i>Isotermas de sistemas híbridos binários fosfolipídio/colesterol</i>	45
4.2.3	<i>Isotermas de sistemas binários DPPC/proteína e ternários DPPC/colesterol/proteína</i>	46
4.3	Modelamento	46
4.3.1	<i>Modelamento de Isotermas</i>	46
4.3.2	<i>Estabilidade termodinâmica</i>	47
4.3.3	<i>Avaliação da energia gasta para se obter a fase LC à 40 mN.m⁻¹ para sistemas puros</i>	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1	<i>Isotermas de sistemas simples de fosfolipídios e colesterol</i>	49
5.2	<i>Efeito da adição de colesterol em fosfatidilcolinas</i>	58
5.3	<i>Estabilidade Termodinâmica</i>	65
5.4	<i>Avaliação da energia gasta para se obter a fase LC à 40 mN.m⁻¹ para sistemas puros</i>	69

5.5	<i>Incorporação de BSA em DPPC puro e DPPC/COL 20%</i>	70
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Esquema: moléculas em interface ar/água	5
FIGURA 3.2	Esquema de substância surfactante quando em água	9
FIGURA 3.3	Esquema da formação de lentes em superfície aquosa	10
FIGURA 3.4	Isoterma esquemática	12
FIGURA 3.5	Esquema de um tanque para deposição LB.....	16
FIGURA 3.6	Esquema dos tipos de deposição através da técnica de LB.....	17
FIGURA 3.7	Esquema de uma estrutura geral de uma fosfatidiletalonamina	23
FIGURA 3.8	Esquema de uma estrutura geral de uma fosfatidilcolina.....	24
FIGURA 3.9	Fórmula estrutural de grupamentos presentes em fosfolipídios.....	24
FIGURA 3.10	Estrutura de uma molécula de colesterol.....	26
FIGURA 3.11	Esquema comparativo entre biosensor(A) e detecção em organismos vivos (B)	32
FIGURA 3.12	Esquema ilustrativo de um biosensor de glicose onde M1 é uma membrana permeável a O ₂ e glicose e a membrana M2 é permeável somente a O ₂	35
FIGURA.3.13	Bases purínicas e purimídicas de interesse biológico	36
FIGURA.3.14	Formas de imobilização de biomoléculas I	38
FIGURA.3.15	Formas de imobilização de biomoléculas II.....	39
FIGURA.3.16	Formas de imobilização de biomoléculas III	39
FIGURA 4.1	Fluxograma de etapas para estudo de isotermas de fosfolipídios, e deposição através da técnica	41
FIGURA 5.1	Isotermas de colesterol.....	49
FIGURA 5.2	Ciclos de Compressão/Expansão para o DMPC	50
FIGURA 5.3	Ciclos de Compressão/Expansão para o DPPC.....	51
FIGURA 5.4	Ciclos de Compressão/Expansão para o DAPC.....	52
FIGURA 5.5	Ciclos de Compressão/Expansão para o DPPE.....	53

FIGURA 5.6	Ciclos de Compressão/Expansão para o DMPE	54
FIGURA 5.7	Ilustração relacionando o tamanho da cadeia hidrofóbica com a área/molécula	56
FIGURA 5.8	Efeito do tamanho da cadeia na área/molécula obtida experimentalmente	57
FIGURA 5.9	Ilustração relacionando o grupo cabeça com a área/molécula	57
FIGURA 5.10	Esquema ilustrando deslocamento para a esquerda das isotermas de fosfolipídios causado pela adição de colesterol.....	58
FIGURA 5.11	Isotermas experimentais e aditivas para o sistema DPPC/COL: (a) colesterol; (b) DPPC; (c) DPPC+COL 10% aditiva; (d) DPPC + COL 10% experimental; (e) DPPC + COL 20% aditiva; (f) DPPC + COL 20% experimental	60
FIGURA 5.12	Isotermas experimentais e aditivas para o sistema DAPC/COL: (a) DAPC + COL 10% experimental; (b) colesterol; (c) DAPC puro; (d) DAPC + COL 10% aditiva; (e) DAPC + COL 20% aditiva; (f) DAPC + COL 20% experimental.....	60
FIGURA 5.13	Diagrama composição-área/molécula para monocamada de DAPC: COL ideal e real.....	61
FIGURA 5.14	Diagrama composição-área/molécula para monocamada de DPPC: COL ideal e real	61
FIGURA 5.15	Ilustração da ligação convencional de hidrogênio entre DPPC e colesterol	63
FIGURA 5.16	Ilustração da ligação $\text{CH}\cdots\text{O}$ de hidrogênio entre DPPC e colesterol	64
FIGURA 5.17	Posição das moléculas na monocamada fosfolipídica sem (A) e com (B) a presença de colesterol.....	65
FIGURA 5.18	Área em excesso para os sistemas (a)DPPC+COL 10% e (b) DPPC+COL20%	66
FIGURA 5.19	Área em excesso para os sistemas (a)DAPC+COL 10% e (b) DAPC+COL20%.....	66

FIGURA 5.20	Excesso de energia livre de mistura como uma função da pressão superficial para (a) DPPC+COL 10% e (b) DPPC+COL 20%.....	67
FIGURA 5.21	Excesso de energia livre de mistura como uma função da pressão superficial para (a) DAPC+COL 10% e (b) DAPC+COL 20%.....	68
FIGURA 5.22	Ciclo esquemático de expansão/compressão.....	69
FIGURA 5.23	Efeito da adição de BSA ao sistema de DPPC.....	70
FIGURA 5.24	Efeito da adição de 20% de colesterol em DPPC na incorporação de BSA	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Valores de Tensão Superficial (Adaptado de: Adamson, 1990)	7
TABELA 4.1	Frações molares de colesterol adicionadas aos fosfolípidios	46
TABELA 5.1	Áreas/molécula médias e desvios padrão e compressibilidade	56
TABELA 5.2	Áreas/molécula médias e desvios padrão	60
TABELA 5.3	Energia gasta para se obter a fase LC à 40 mN.m ⁻¹	73

LISTA DE NOTAÇÕES

A_{ex}	Área em excesso
AFM	Microscopia de Força Atômica
BSA	Albumina bovina
COL	Cholesterol
C_s	Compressibilidade
DAPC	1,2-diaricidoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMPE	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GOD	glicose oxidase
IF	Espectroscopia de Infravermelho
LB	Languimir Blodgett
LC	Fase líquido condensado
LE	Fase líquido expandido
LE/LC	Fase intermediária líquido expandido e líquido condensado
QCM	Microbalança de cristal de Quartzo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Fase sólida
UV-VIS	Espectroscopia de Ultravioleta- Visível

RESUMO

Existe um grande interesse nas propriedades químicas e físicas de misturas entre colesterol e fosfolípidios nas membranas celulares e em monocamadas. Estes estudos também fornecem informações de determinadas propriedades das membranas celulares animais. Os fosfolípidios se constituem da matriz das membranas celulares, porém os esteróis são componentes essenciais destas membranas. Ao contrário da grande diversidade de fosfolípidios presentes nas membranas existe um esteroide principal, o colesterol, que participa de forma crucial na proliferação e viabilidade celular. Os estudos realizados em monocamadas de fosfolípidios que contêm o colesterol têm o potencial de descobrir os mecanismos de interações moleculares para se compreender as membranas. Desta forma viabilizando-se a construção de biossensores com estas membranas nanoestruturadas. O objetivo deste trabalho foi investigar as monocamadas híbridas dos fosfolípidios com adições de colesterol e albumina bovina obtidas através do método de deposição Languimuir-Blodgett (LB). As monocamadas de fosfatidilcolinas com diferentes tamanhos de cadeia hidrocarbônica (DMPC, DPPC e DAPC) e os seus híbridos com colesterol (DPPC/CHOL e DAPC/CHOL), as monocamadas de fosfatidiletanolaminas (DMPE, DPPE), as monocamadas de DPPC/BSA e de DPPC/COL/BSA foram obtidas. As misturas do colesterol com DPPC, DAPC em uma fração molar de 10% e de 20%, as soluções de fosfolípidios puros bem como as misturas DPPC/BSA e DPPC/CHOL/BSA foram espalhadas na interface ar/água de uma cuba de Languimuir. Monocamadas moleculares homogêneas de fosfolípidios de DMPC, de DPPC, de DAPC, de DMPE e de DPPE e híbridos nanoestruturados de DPPC/CHOL e DAPC/CHOL foram obtidas e caracterizadas por isotermas π -A. As isotermas indicaram a existência de transições de fases G, LE, LE/LC e LC. Realizou-se o modelamento de isotermas (π -A) para monocamadas de fosfolípidios/colesterol usando a régua aditiva. A interação entre os componentes em uma monocamada e a estabilidade termodinâmica comparada com os componentes puros foi investigada através da avaliação da energia livre da mistura. A adsorção superficial de BSA nas monocamadas de DPPC e de DPPC/COL foi avaliada por isotermas π -A.

ABSTRACT

There has been long-standing interest in the physical chemical properties of defined mixtures of cholesterol and phospholipids in monolayer and bilayer membranes. They also provide insight into certain properties of the membranes of animal cells. Even if phospholipids and sphingolipids build up the matrix of cellular membranes, sterols are essential components of these membranes. In contrast to the amazing diversity of phospholipid species, mammalian cells contain one major sterol, cholesterol, which is absolutely required for viability and cell proliferation. The studies of phospholipid monolayers containing cholesterol have the potential to uncover interactions important for understanding bilayer membranes. The aim of the present work was to investigate hybrid phospholipids monolayers mixed with cholesterol and bovine serum albumin deposited through Langmuir-Blodgett (LB) films. Phosphatidylcholines with different chain size, DMPC, DPPC and DAPC, monolayers and their hybrids with cholesterol (DPPC/CHOL and DAPC/CHOL), phosphatidylethanolamine (DMPE, DPPE), DPPC/BSA and DPPC/CHOL/BSA monolayers were obtained at water/air interface. Mixtures of cholesterol with DPPC, DAPC in molar fraction of 10% and 20% the solutions of pure phospholipids as well as mixtures DPPC/BSA and DPPC/CHOL/BSA were spread at the air/water interface of a Teflon-made LB. Homogeneous molecular monolayers of DMPC, DPPC, DAPC, DMPE and DPPE phospholipids and DPPC/CHOL, DAPC/CHOL hybrid nanoscale were successfully produced and characterized surface pressure isotherms (π -area). The isotherms have indicated also the presence of the transitions of phases G, LE, LE/LC and LC. Modeling surface pressure (π -A) isotherms for mixed monolayers with cholesterol were calculated using the additive rule. The interaction between the components in a mixed monolayer and the thermodynamic stability of a mixed monolayer compared with pure components were investigated from the evaluation of excess free energy of mixing. The surface adsorption of BSA in monolayers of DPPC and DPPC/CHOL was evaluated by isotherms π -A.

1 INTRODUÇÃO

Anaxágoras (500-428 a.c.), um filósofo grego, já se perguntava a milênios atrás sobre a natureza dos “tijolos” fundamentais da matéria. Com essas questões a humanidade chegou no conceito do átomo. Atualmente nosso conceito de átomo mudou bastante e com a ajuda de instrumentos, como o microscópio de tunelamento, podemos estender nosso campo de visão para o universo do bilionésimo de metro, ou seja, nanômetro que em grego quer dizer “anão”. Com essa revolução ocorrida a partir do século XX alguns pioneiros como Richard Feynman começaram a se questionar sobre a possibilidade de se projetar novos materiais átomo a átomo (Silva,C.G. 2002). Da mesma forma como a humanidade aprendeu a trabalhar o ferro Feynman teve a idéia de que não precisamos aceitar a forma como os materiais nos são ofertados. Podemos manipular os átomos e com eles produzir materiais totalmente novos que apresentem suas propriedades extremamente controladas. As aplicações possíveis incluem o aumento da capacidade de armazenamento e processamento de dados dos computadores, produção de biossensores e sensores para monitoramento de diversos parâmetros, criação de novos mecanismos para liberação de fármacos, mais seguros e menos prejudiciais ao paciente do que os disponíveis hoje e a criação de materiais mais leves e mais resistentes do que metais e plásticos, para prédios, automóveis e aviões (Bykov,1996; Monkaman,2000; Ulman,1991).

Em paralelo a esta revolução o metalurgista Irving Langmuir estudava o comportamento de filmes moleculares sobre subfase aquosa no início da década de 20. Os estudos de Langmuir e sua esposa Katharine Blodgett culminaram no desenvolvimento da técnica de deposição de monocamadas moleculares conhecida hoje como técnica LB. Como o resultado do desenvolvimento da ciência na direção de sistemas nanométricos, os filmes LB têm despertado grande atenção da comunidade científica.

Este interesse se deve a possibilidade de produzir filmes nanoestruturados através da deposição consecutiva de monocamadas de substâncias tensoativas. As grandes vantagens de utilizar técnicas de deposição como a LB são sua elevada versatilidade, a possibilidade de obtenção de uma ou mais estruturas com propriedades físico-químicas praticamente sem

restrições termodinâmicas de composição e o controle e alteração da concentração, distribuição e densidade de defeitos cristalinos (Bykov,1996; Monkman,2000; Paterno,2001; Ulman,1991).

Somente a partir da década de 60 as moléculas orgânicas receberam grande atenção da comunidade científica devido ao grande potencial tecnológico reconhecido principalmente em dispositivos eletrônicos e óticos. Esse potencial se dá em vista da variedade de propriedades elétricas, óticas e magnéticas das moléculas orgânicas. Além disso, acredita-se que num futuro próximo estes materiais venham a competir com a matéria inorgânica no setor eletrônico em virtude de seu baixo custo de produção, disponibilidade, variação de propriedades e dos métodos de processamento e produção de filmes ultrafinos que vêm sendo desenvolvidos atualmente para posterior uso em escala industrial (Paterno,2001; Ulman, 1991).

As possíveis aplicações com materiais nanoestruturados são camadas refletoras para aplicação ótica, proteção de superfícies para reatores nucleares, alta resistência ao desgaste para solicitações mecânicas, elevada superfície de contato para reações químicas (para catálise), obtenção de dispositivos optoeletrônicos em escala nanométrica com propriedades diferenciadas dos materiais cristalinos (Marques,2003; Paterno,2001).

Com esta poderosa ferramenta pode-se imaginar a construção de filmes com sua nanoestrutura controlada e, com isso, obtermos os materiais idealizados por Feynman. Dentre as diversas aplicações possíveis encontra-se a produção de biossensores, dispositivos estes capazes de, através do mimetismo de sistemas biológicos, detectar entidades em tempo real. As possibilidades dentro da área médica incluem detectores de glicose, colesterol, vírus, álcool e drogas. Dispositivos sensíveis e específicos a amônia, cianeto e CO dentre outros também se incluem dentro das possibilidades de desenvolvimento de biossensores (Davis,2005; Eggins,1997; Ulman,1991; Wolfbeis,2002). O mercado mundial para biossensores alcançou US\$7,3 bilhões de dólares em 2003 e

estudos estimam um crescimento de mercado de 10,4% elevando o valor para US\$ 10,8 bilhões até 2007 (Fuzi-Kezai, 2005).

Neste trabalho foram estudadas monocamadas fosfolipídicas obtidas através da técnica LB. Estas monocamadas têm como objetivo serem empregadas como suporte para proteínas e assim serem utilizadas em biossensores. Com este trabalho se investigou a forma de organização desses fosfolipídios no espaço. Esta organização é de grande interesse pois se relaciona com a funcionalidade das proteínas que futuramente serão incorporadas à superfície. O efeito da incorporação de colesterol e de BSA à monocamada fosfolipídica foi analisado.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho obtiveram-se monocamadas de fosfolipídios através da técnica LB. Estas monocamadas visam à obtenção de uma membrana biológica artificial. O trabalho consistiu das seguintes etapas:

- Obtenção de isothermas para sistemas simples de DMPC, DPPC, DAPC, DMPE e DPPE;
- Avaliação do efeito do tamanho de cadeia e do grupo terminal na área/molécula;
- Avaliação da adição de colesterol e de BSA à monocamada fosfolipídica;
- Estudo de estabilidade termodinâmica das monocamadas;
- Avaliação da regra aditiva como um modelo de isothermas de fosfolipídios.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Química de Superfície

3.1.1 Tensão Superficial e Interfacial

As moléculas em um líquido possuem certa atração umas com as outras. Esta atração, conhecida como coesão, depende das propriedades de cada substância. Existe interação das moléculas no volume do líquido em todas as direções. Contudo na interface ar/água a interação é menor (Dana,1999; Shaw,1975;Rabockai,1979).

A existência de forças fracas de Van der Waals entre moléculas ocasionando o estado físico de líquido já é um fato bem difundido desde que Van der Waals as postulou. Os fenômenos de tensão superficial e interfacial podem ser explicados através destas forças (FIG 3.1, adaptada de: Shaw,1975).

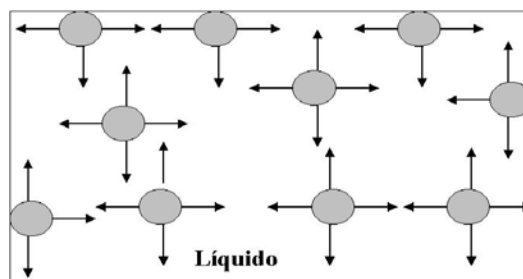


FIGURA 3.1 Esquema: moléculas em interface ar/água

As moléculas que se encontrarem na superfície de um líquido não estarão sofrendo forças atrativas em todas as direções diferentemente daquelas localizadas no volume. Esta falta de equilíbrio de forças atrativas nas moléculas de superfície resulta numa força orientada para o interior do líquido. E isso gera um momento molecular fazendo com que a superfície tenda a se contrair espontaneamente (Shaw,1975).

A definição encontrada para tensão superficial, γ_0 , de um líquido é a força atuante ortogonalmente a qualquer segmento unitário imaginado na superfície do líquido, embora

não exista uma membrana elástica ou uma força tangencial na superfície do líquido (Shaw,1975). Contudo deve-se lembrar sempre que a tensão superficial e a energia superficial estão relacionadas com o trabalho exercido para aumentar a superfície em uma unidade de área em um processo isotérmico e reversível.

O conceito que acaba de ser apresentado também se aplica a interface líquido-líquido, onde também se notam forças intermoleculares fora do equilíbrio (Adamson,1990).

De uma maneira geral a tensão interfacial entre dois líquidos estará situada entre as tensões superficiais dos líquidos individualmente.

Uma ressalva importante é que o modelo proposto se refere a uma situação estática. Entretanto, um fato a ser considerado é a turbulência a nível molecular como resultado do movimento de partículas entre o volume, a superfície e a fase de vapor (Rabockai,1979; Adamson,1990).

3.1.2 Efeitos da Temperatura na Tensão Superficial

Na grande maioria dos líquidos a tensão superficial diminui linearmente com o aumento da temperatura, sendo que alguns metais são a exceção. Quando a temperatura alcança um valor crítico as forças intermoleculares tendem a zero e a tensão superficial se torna muito pequena. Rampay e Shields (Shaw,1975) desenvolveram o modelo matemático (equação 3.1) de forma empírica mais satisfatório para representar os efeitos da temperatura na tensão superficial.

$$\gamma \left(\frac{Mx}{\rho} \right)^{2/3} = K(T_c - T - 6) \quad (3.1)$$

sendo:

M é a massa molar do líquido;

x é o grau de associação do líquido;

K é uma constante para cada líquido;

T_c é a temperatura crítica;
 ρ é a densidade do líquido.

Alguns valores para a tensão superficial foram listados na TAB.3.1 para algumas temperaturas:

TABELA 3.1 Valores de Tensão Superficial (Adaptado de: Adamson, 1990)

Líquido	Temp. (°C)	γ (mN/m)	Líquido	Temp. (°C)	γ (mN/m)
Água	20	72,94	Benzeno	20	28,88
	25	72,13		30	27,56
Iodeto de metileno	20	67,00	Clorofórmio	25	26,67
Glicerina	24	62,6	Ar	-183	11,86
Etileno glicol	25	47,3	Tolueno	20	28,52
	40	46,3	Etanol	20	22,39
Metanol	20	22,50	Éter	25	20,14

3.1.3 Formas de se quantificar a tensão superficial e interfacial

Existem diversos métodos para se avaliar a tensão superficial e a interfacial. Neste trabalho serão apresentados o método capilar e o método das placas de Wilhemy.

O método capilar é considerado o mais exato para avaliação de tensões superficiais. Como este método não altera a superfície fluida, pode ser usado para avaliar efeitos temporais lentos. Sendo que na maioria dos casos, o método capilar só é utilizado quando o ângulo de contato for nulo. Isso devido a dificuldade em se determinar de forma correta os ângulos de contato (Shaw, 1975; Rabockai, 1979; Adamson, 1990).

No método das placas de Wilhelmy uma pequena placa de mica, ou uma lamínula de microscópio padronizada é mergulhada no líquido e monitorada por uma balança. Desta forma consegue-se avaliar a tensão superficial por dois métodos. Num deles o recipiente contendo o líquido é abaixado e avalia-se o efeito sobre a balança no momento de separação líquido-placa. No outro é avaliado a variação da força necessária para manter a placa num nível de imersão constante enquanto a tensão superficial varia. Este último

método pode ser usado para se quantificar dinamicamente a tensão superficial em um líquido (Shaw,1975; Rabockai,1979).

3.1.4 Atividade Superficial

Algumas substâncias como os ácidos graxos, fosfolipídios e álcoois de cadeia longa são insolúveis em água. Isto se deve ao fato da cadeia de carbonos da molécula ser extremamente apolar, não apresentando afinidade com a água. No entanto, grupos como o $-\text{COOH}$ ou $-\text{OH}$ possuem característica polar (Shaw,1975; Rabockai,1979; Bykov,1996). Com isso estas moléculas tendem a posicionar seu grupo polar na superfície da água enquanto projetam suas cadeias para o ar. É fácil perceber que esta situação é mais estável energeticamente do que a incorporação total da cadeia ao volume de líquido.

A atividade superficial é definida como a adsorção destes materiais em superfícies de líquidos formando monocamadas moleculares orientadas (Shaw,1975). Estes materiais que atuam na superfície (surfactantes) são uma grande classe de moléculas que tem um importante significado tecnológico e biológico e também são denominados tensoativos. Geralmente estas moléculas consistem de uma parte hidrofílica (solúvel em água) e uma parte hidrofóbica (insolúvel em água). Esta natureza anfílica dos surfactantes é responsável pela sua acumulação em interfaces (como por exemplo ar/água ou óleo/água). Normalmente a parte hidrofóbica consiste de cadeias de hidrocarbonetos ou fluorcarbonetos, enquanto que a parte hidrofílica consiste de um grupo polar ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_4^-$, $-\text{CH}_2^-$, etc.).

A FIG 3.2 (adaptada de: Shaw,1975) ilustra esquematicamente o comportamento de substâncias anfílicas quando em presença de água. A parte imersa na água representa a região hidrofílica do surfactante enquanto a parte fora da água representa a região hidrofóbica.

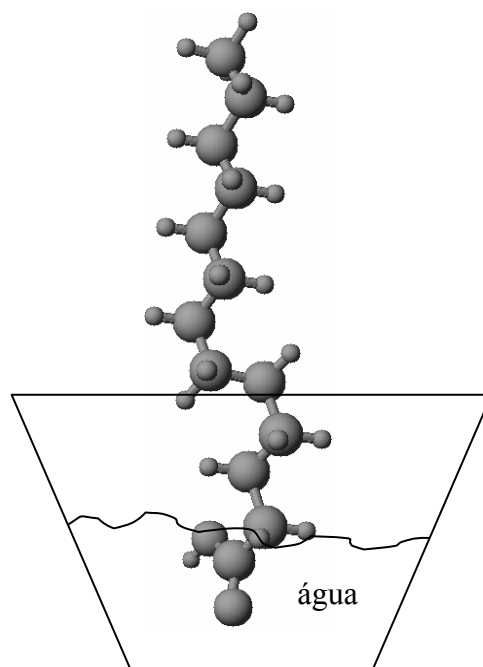


FIGURA 3.2 Esquema de substância surfactante quando em água

As propriedades dos surfactantes em solução são determinadas por características físicas e químicas dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Quando um tensoativo entra em contato com a água causa um decréscimo na tensão superficial (Shaw,1975; Rabockai,1979; Adamson,1990).

Deve-se notar que a atividade superficial é um fenômeno dinâmico pois seu equilíbrio superficial entre adsorção e mistura é resultante do movimento térmico das moléculas (Shaw,1975).

A acumulação de moléculas tensoativas na superfície ou interface de um fluido gera uma expansão da interface. E esta expansão irá se balancear com a contração da interface originada do desequilíbrio das forças trativas. Então definiu-se a pressão responsável pela expansão de uma superfície onde ocorreu a adsorção de uma substância tensoativa como sendo a pressão superficial, π (Rabockai,1979;Adamson,1990).

Traube propôs uma regra que de forma bem simples determina, para séries homólogas de substâncias tenso-ativas, que a concentração necessária para produzir a mesma queda na tensão superficial de uma solução diluída decai em um terço para cada grupo (CH_2) adicional na cadeia (Shaw,1975).

3.1.5 Espalhamento

Ao se adicionar gotas de uma substância insolúvel na superfície da água pode ocorrer a formação de uma lente, uma monocamada ou um estado intermediário. Quando as gotas não conseguem se espalhar ocorre a formação de lentes na superfície. Em outra situação as gotas podem formar um filme fino, onde as interfaces água/substância insolúvel e substância insolúvel/ar possuem tensões superficiais distintas. Um fenômeno intermediário ocorre quando há formação de monocamada e o excesso da substância forma lentes que se mantêm em equilíbrio com o sistema (FIG 3.3, adaptada de: Shaw,1975).

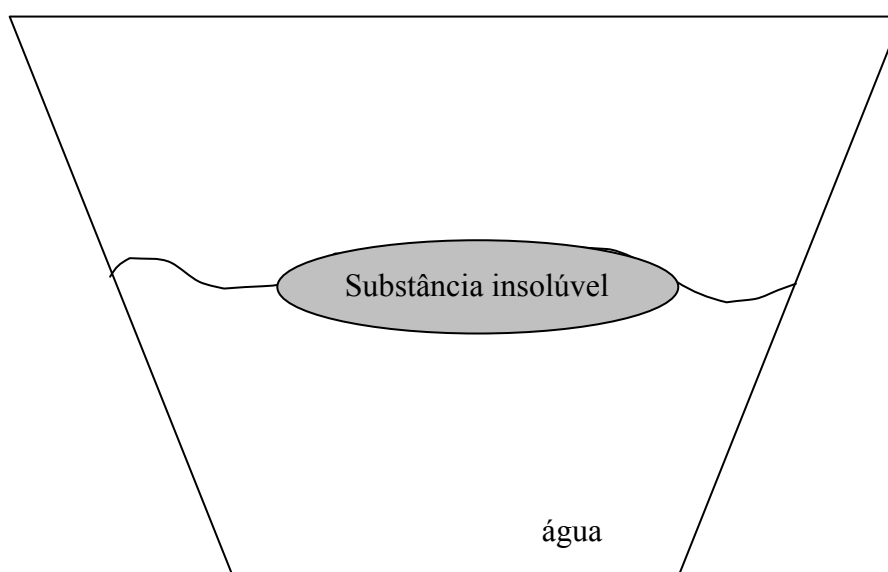


FIGURA 3.3 Esquema da formação de lentes em superfície aquosa

Harkins (Shaw,1975) propôs um coeficiente de espalhamento superficial inicial sobre a água dado pela equação 3.2.

$$S = \gamma_{\text{água/ ar}} - (\gamma_{\text{óleo/ ar}} + \gamma_{\text{óleo/ água}}) \quad (3.2)$$

Para que não ocorra formação de lentes o coeficiente S deverá ser positivo ou nulo.

Assim, pode-se perceber que o efeito de impurezas na fase insolúvel, devido ao efeito de redução do termo $\gamma_{\text{óleo/água}}$, é o de tornar o coeficiente positivo. Em contra partida impurezas na fase aquosa reduzem $\gamma_{\text{água/ar}}$ e conseqüentemente tendem a tornar o coeficiente negativo (Shaw,1975;Rabockai,1979;Adamson,1990). Portanto soluções insolúveis se espalham mais facilmente em água do que a substância pura. Enquanto que, o espalhamento se dá mais facilmente na superfície limpa da água do que na superfície contaminada.

3.1.6 Pressão Superficial

A energia livre superficial (água/ar) é obtida através da tensão superficial. A tensão superficial da água pura é aproximadamente 73 mN/m a 20 °C. Este é um valor muito alto se comparado com outros líquidos. Desta forma a água se torna uma excelente subfase para o estudo de monocamadas.

Quando substâncias anfífilicas são adicionadas à superfície da água com o auxílio de um solvente volátil esta se espalha rapidamente por toda a área. Com a evaporação do solvente uma monocamada da substância é formada. Se estas moléculas forem comprimidas inicia-se um efeito repulsivo entre elas. Este efeito bidimensional da pressão é conhecido como pressão superficial, Π , e é dado pela relação 3.3.

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad (3.3)$$

Onde γ é a tensão superficial na ausência da monocamada e γ_0 é a tensão superficial com a monocamada na superfície da água.

3.1.7 Isotermas Área-Pressão Superficial

Através da compressão das moléculas anfífilicas e monitoramento contínuo da pressão superficial obtém-se um gráfico da área coberta pelas moléculas e a pressão superficial como apresentado na FIG 3.4.

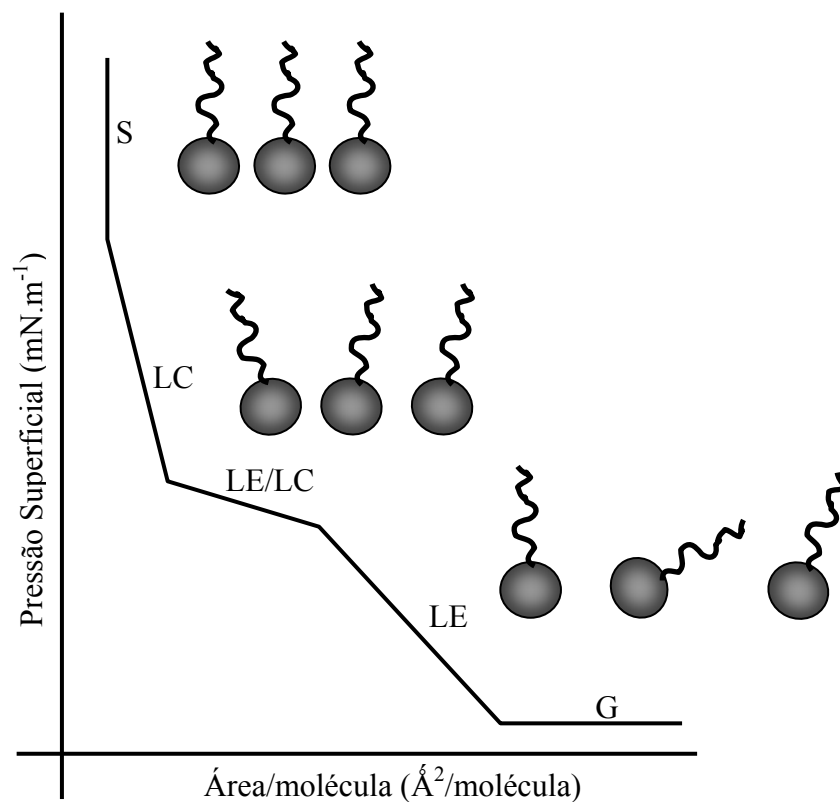


FIGURA 3.4 Isoterma esquemática

Como podemos ver as moléculas anfífilicas passam por diferentes fases conforme são comprimidas. No início elas se comportam como um gás (G) passando por estados semelhantes ao estado líquido onde as moléculas estão expandidas (LE) ou condensadas (LC) e um estado intermediário entre o expandido e o condensado (LE/LC) e por último o estado sólido (S) conforme se aumenta a pressão superficial (Adamson,1990; Bykov,1996; Klopfer,1996; Mafé,1998; Shaw,1975).

3.1.8 Estabilidade Termodinâmica

A tendência de uma reação acontecer define-se termodinamicamente a partir da variação de sua entalpia (ΔH) e entropia (ΔS). Sendo que a entalpia é o calor absorvido quando uma reação endotérmica ocorre à pressão constante. Quando calor é despreendido (reação exotérmica) ΔH é negativo. Quando a reação é endotérmica (absorção de calor), ΔH é positivo. A entropia é uma medida da desordem, ou aleatoriedade, de uma substância ou sistema (Castellan, 1975, Wylen, 1973).

Um sistema sempre tenderá para valores menores de energia e aumento da desordem, leia-se, menor entalpia e maior entropia. O efeito combinado deles vem dado pela energia livre de Gibbs, G.

Esse valor é uma medida da energia do sistema, e um sistema tende espontaneamente na direção de estados de energia menores. Assim, um processo será espontâneo quando ΔG for negativo; será espontâneo no sentido oposto quando ΔG for positivo, e estará em equilíbrio quando ΔG for igual à zero (Adamson, 1990; Castellan, 1990).

Dessa forma a solubilidade de colesterol numa bicamada fosfolipídica pode ser prevista através do estudo da variação da energia livre de Gibbs. Além disso, esse estudo fornece informações relativas à estabilidade termodinâmica de um dado sistema. Pois quanto mais negativo for o valor da variação da energia livre mais estável a mistura irá se encontrar.

3.2 Deposição LB

Os filmes LB são depositados sobre substratos através do contato destes com a superfície da água onde uma monocamada de substância tensoativa foi previamente preparada. O método de deposição que consiste na imersão e retirada de forma vertical do substrato na subfase foi inicialmente proposto por Langmuir e posteriormente aperfeiçoado por Blodgett. Este ficou conhecido como método LB. Schaefer desenvolveu o método onde o contato do substrato com a subfase ocorre de forma horizontal e este método é conhecido atualmente com Langmuir-Schaefer ou LSh. De fato o método LB foi a primeira técnica a

relacionar a química enquanto uma ciência com a possibilidade real de se construir filmes ordenados em escala molecular (Latka,2001; Marques,2003; Ulman,1991; Bykov,1996; Paterno,2001; Monkman,2000).

Os filmes de LB possuem elevada organização estrutural, em escala nanométrica, cujas propriedades dependem das condições de sua fabricação (velocidade de compressão e de transferência, PH, temperatura, força iônica, etc), do número de monocamadas e do tipo de material. Um método de controle da qualidade do filme LB é a taxa de transferência. A razão entre a área de transferência e a área superficial efetiva do substrato sólido fornece o valor da taxa de transferência. Este valor deve situar-se próximo da unidade, indicando a transferência de uma monocamada da superfície da solução aquosa para o substrato sólido (Latka,2001; Monkman,2000;Ulman,1991).

3.2.1 Breve Histórico

A ciência, às vezes, é relatada como uma seqüência de descobertas que ocorrem espontaneamente seguidas de um rápido progresso. O presente relato do desenvolvimento ao longo da história da ciência dos filmes moleculares menciona algumas das contribuições chave dos últimos dois séculos, evidenciando que esta ciência não se resume aos atuais filmes LB.

O primeiro cientista a colaborar no estudo de monocamadas foi Benjamin Franklin (1706-1790). Seus estudos foram desenvolvidos através da observação dos efeitos de vibração na interface entre o óleo e a água. A aplicação dos princípios da observação, experimentação e dedução teórica desenvolvidos por Franklin estimularam vários cientistas alemães no estudo da nova área (Roberts,1990).

John Shields (1822-1890) contribuiu com o estudo de filmes monomoleculares através de seus experimentos relacionados ao espalhamento de óleo em superfícies. Uma de suas conclusões foi a de que o óleo quando espalhado sobre a água acalma sua superfície (Roberts,1990).

O trabalho de Shields serviu de inspiração para que John Aitken (1839-1919), um engenheiro formado pela Universidade de Glasgow, projetasse e construísse equipamentos que pudessem validar a teoria da ação de acalmar que o óleo exercia sobre as superfícies (Roberts,1990).

Quando Lorde Rayleigh (1842-1919) recebeu uma carta de Brunswick na Alemanha em 1891 ele acreditou que estava lendo sobre a fundação de um novo e revolucionário campo de estudos da físico-química, o estudo de monocamadas. Rayleigh discutiu o efeito de camadas superficiais de óleo de oliva na tensão superficial da água. Atualmente acredita-se que ele suspeitava que estes filmes superficiais eram de espessura molecular. Ele notificou que a tensão superficial da água poderia ser reduzida através da contaminação com um filme superficial de uma substância insolúvel. Com isso mudanças permanentes na tensão seriam acompanhadas por mudanças na área da superfície (Roberts,1990).

Agnes Pockels (1862-1935) desenvolveu um equipamento relativamente simples para prosseguir com seus estudos em filmes superficiais. Hoje este equipamento recebe o nome de cuba de Langmuir. A primeira isoterma π -A, tão familiar nos estudos recentes de filmes moleculares, foi publicada por Pockels (Roberts,1990).

Irving Langmuir (1881-1957) nasceu no dia 31 de janeiro no Brooklyn, Nova York. Em 1903 ele se graduou em engenharia metalúrgica pela Universidade de Columbia. Seus estudos na química de superfície lhe premiaram com o prêmio Nobel de Química em 1932. Ele desenvolveu várias técnicas, incluindo a balança de filmes superficiais com a qual seu nome é associado atualmente. Langmuir confirmou que os filmes superficiais têm a espessura de uma camada molecular. Ele também concluiu que as moléculas estão orientadas na superfície da água, com o grupo funcional polar imerso e uma longa cadeia apolar direcionada verticalmente sob a superfície. Seus experimentos foram um grande alicerce para a evidência de forças de curta distância e explicaram de forma clara as bases com que certas moléculas formam ou não bons filmes moleculares (Roberts,1990).

Katharine Blodgett (1898-1979) iniciou experimentos com a transferência de monocamadas de ácidos graxos da superfície da água para substratos sólidos como lâminas de vidro. Os filmes moleculares construídos atualmente com o auxílio da cuba de Langmuir são conhecidos como filmes Langmuir-Blodgett (LB). Blodgett concentrou sua atenção nas propriedades óticas de multicamadas enquanto Langmuir voltou seus estudos para monocamadas de proteínas (Roberts,1990).

3.2.2 A cuba

Agnes Pockels foi a primeira a projetar um tanque com uma barreira para a manipulação de filmes. Neste primeiro projeto a barreira ficava posicionada na extremidade do tanque. Desde então este sistema vem sendo aperfeiçoado e hoje é completamente automatizado (Ulman,1991). De acordo com a FIG 3.5 (Adaptada de: Ulman,1991) o sistema é constituído de uma cuba (A) usualmente de teflon, uma barreira (B) que irá comprimir o filme, Um motor (C) que controla a barreira, uma interface (D) para controle de informação, uma balança (E) para avaliação da pressão superficial, um sistema de movimentação do substrato (F) e o substrato sólido (G).

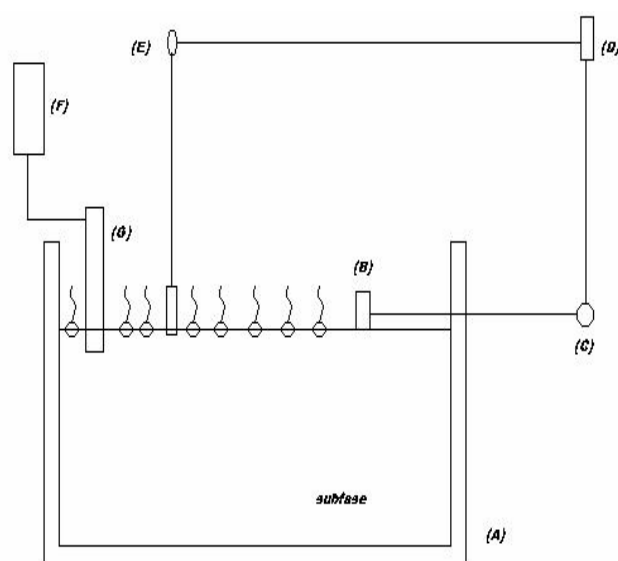


FIGURA 3.5 Esquema de um tanque para deposição LB

Através, de várias imersões e retiradas do substrato na interface ar-líquido, é feita a transferência de uma seqüência de monocamadas do filme de LB (Marques,2003; Ulman,1991; Bykov,1996; Paterno,2001). A estrutura do filme pode variar dependendo dos parâmetros de deposição e das características do substrato sendo basicamente dividido em três tipos (X,Y e Z), como ilustrado na FIG 3.6 (Adaptada de: Marques,2003)

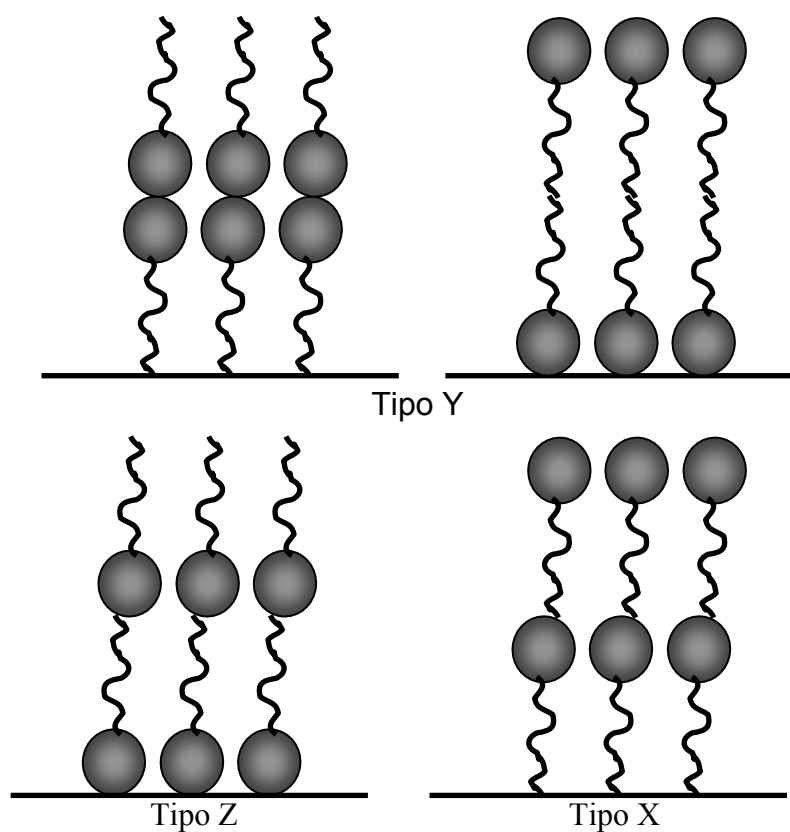


FIGURA 3.6 Esquema dos tipos de deposição através da técnica de LB

A estrutura Y é obtida em substratos com superfície hidrofílica e apresenta os grupos polares próximos em monocamadas adjacentes. As estruturas X e Z apresentam deposição preferencial na imersão e na retirada, respectivamente, o que provoca a formação de uma estrutura assimétrica. A estrutura Z é obtida quando a deposição é realizada sobre substratos hidrofílicos enquanto que a estrutura X ocorre sobre substratos hidrofóbicos.

A fabricação de multicamadas através do método LB não é um processo simples. Para se obter reprodutibilidade dos resultados necessita-se de uma grande atenção a diversos detalhes durante a fabricação, como o ambiente, a subfase, o substrato, o material do filme e a limpeza do equipamento (Ulman,1991).

3.2.3 O ambiente

O ambiente ideal para a deposição necessita de um laboratório com total controle de atmosfera, temperatura e umidade. Além disso, a cuba deve permanecer preferencialmente numa mesa antivibração para se minimizar o efeito de ondas mecânicas. O ar também deve ser isento de contaminantes, pois estes podem ser depositados na superfície da água, ocasionando efeitos prejudiciais à deposição do filme (Ulman,1991).

3.2.4 A Subfase

A subfase comumente utilizada é a água, embora mercúrio, glicerol e alguns outros materiais tenham sido utilizados. A água utilizada deve ser inicialmente destilada e em seguida passar por um sistema deionizador para remoção de íons residuais. O controle do pH da subfase também se faz necessário. Isso devido as moléculas anfífilicas se mostrarem sensíveis a estes parâmetros. A literatura recomenda o uso do valor padrão de tensão superficial de 72 mN/m para a água deionizada com 18 Ω .cm à 25 °C (Ulman,1991; Bykov,1996).

Um fator que exerce extrema influência nos filmes formados é a adição de íons à subfase. Em $\text{pH} < 7$ podem existir outros cátions além do H^+ na subfase. Se estes cátions forem monovalentes a solubilidade do ácido aumenta, e mistelas podem se formar rapidamente. Se os cátions forem bivalentes o filme resultante será insolúvel em água e as monocamadas são estáveis na interface ar-água. No geral a incorporação de cátions bivalentes à subfase tem a tendência de reduzir a área/molécula do filme. Isto ocorre pois estes cátions necessitam de dois ânions para alcançar a neutralidade elétrica. A adição de cátions trivalentes na subfase tende a produzir filmes muito rígidos (Roberts,1990).

3.2.5 *O Substrato*

A técnica LB apresenta uma grande versatilidade com relação ao tipo de substrato utilizado. A maioria das deposições vem sendo realizada em substratos hidrofílicos. Substratos transparentes como o vidro e quartzo são muito empregados nos estudos de caracterização via espectroscopia. Outros materiais como alumina, óxido de cromo, óxido de estanho e mica também são utilizados.

Para se utilizar os substratos deve-se prepará-los em etapas prévias de limpeza segundo o método Mansur (Marques,2003) visando tornar a superfície isenta de contaminantes e realizar um tratamento superficial adequado onde o material poderá se tornar fortemente hidrofóbico ou hidrofílico (Marques,2003; Ulman,1991; Bykov,1996).

3.2.6 *Material do filme e solvente*

O material depositado deve ser anfifílico para se garantir sua estabilidade na interface água/ar. A garantia da pureza deste material e do solvente é de grande importância. O solvente, geralmente orgânico, funciona como um veículo para o posicionamento das moléculas anfifílicas sobre a subfase. Além disso, este deve ser insolúvel na subfase para evitar contaminação e possuir baixo ponto de evaporação. Normalmente utiliza-se clorofórmio ou solução metanol/clorofórmio de alta pureza para dissolução das moléculas anfifílicas (Marques,2003; Ulman,1991; Bykov,1996).

Monocamadas híbridas têm sido estudadas largamente. A monocamada híbrida consiste de um componente presente em maior quantidade, dopado com um segundo material em baixa concentração. Também é possível a formação de monocamadas híbridas onde um dos materiais é anfifílico e outro pode ser hidrofóbico, posicionando-se na região hidrofóbica do filme, ou hidrofílico, posicionando-se na região hidrofílica do filme (Roberts,1990).

Quando os componentes estão em concentrações equiparadas a miscibilidade se torna muito importante. É possível determinar se dois componentes são miscíveis através do

estudo de propriedades como a viscosidade e o potencial de superfície para os componentes puros e para sua mistura. Se os materiais forem imiscíveis eles formarão domínios e apresentaram propriedades com valores intermediários aqueles dos componentes puros. Se, ao contrário, os componentes forem miscíveis suas propriedades são livres para assumir qualquer valor (Roberts,1990).

No caso do material utilizado no filme ser polimérico deve-se ter o controle sobre a massa molar média, pois as propriedades das camadas depositadas, como reologia, estabilidade, uniformidade e propriedades de transferência dependem do número de unidades de repetição (Ulman,1991).

3.2.7 Preparação e configuração dos Equipamentos

Um aspecto importante é o tratamento dos equipamentos entre os experimentos, em outras palavras, o procedimento de limpeza. Toda a superfície da cuba deve estar livre de agentes tensoativos. Isto significa que durante a limpeza não se deve utilizar detergentes orgânicos, somente soluções inorgânicas de limpeza devem ser empregadas (Marques,2003; Ulman,1991). A literatura recomenda uma mistura de 50% (v/v) ácido nítrico/água seguida de lavagem com grandes volumes de água deionizada para todos os equipamentos utilizados.

3.2.8 Mono e Multicamadas de biomoléculas

Os filmes LB são usados no estudo do ordenamento e empacotamento de moléculas usualmente capazes de formar monocamadas insolúveis na interface ar-água. A estrutura biológica que aparentemente é melhor mimetizada pela técnica LB é a membrana celular.

Além dos problemas usuais de solubilidade na subfase e colapso da monocamada existem vários outros tipos de problemas. As biomoléculas precisam ser estáveis quimicamente na interface. Sua estrutura tridimensional, em particular para as proteínas, pode ser sensível às forças superficiais produzindo mudanças na conformação das proteínas que trarão efeitos importantes nas propriedades do filme formado (Roberts,1990).

Filmes de fosfolipídios podem ser um problema, pois estes não se solubilizam facilmente. Para resolver este problema tem-se utilizado uma mistura de clorofórmio com um álcool. Porém, devido a solubilidade dos álcoois em água, o uso de soluções com alta concentração de álcool pode prejudicar os resultados do experimento. A literatura (Roberts,1990) aponta pra o tempo mínimo de 20 minutos de espera para que o solvente se evapore antes de se iniciar a compressão (Roberts,1990).

A difusão na bicamada fosfolipídica abaixo da temperatura de transição de fase é muito similar à observada nas membranas biológicas. Esta é uma evidência importante para a confirmação de que as bicamadas fosfolipídicas obtidas via LB são um modelo razoável das membranas biológicas (Roberts,1990).

A razão para a instabilidade de sistemas acima de 3 camadas de fosfolipídios pode residir no fato destes apresentarem interações fracas entre as camadas adjacentes. Já as monocamadas de materiais não biológicos apresentam interações do tipo dipolo-dipolo entre as camadas adjacentes. Com isso torna-se possível a deposição de inúmeras camadas (Roberts,1990).

3.3 Membranas Celulares

As membranas celulares desempenham um papel de extrema importância em diversos fenômenos biológicos essenciais. Elas englobam toda a célula, controlam as diferenças fundamentais entre o meio intra e extracelulares e definem seus limites geométricos. Através de gradientes iônicos gerados a partir de proteínas especializadas nas membranas é possível sintetizar ATP (adenosina trifosfato). Esta energia pode ser utilizada para direcionar o fluxo de solutos através da membrana ou produzir e transmitir sinais elétricos. Em todas as membranas celulares existem proteínas que atuam como sensores de sinais externos, permitindo que a célula mude seu comportamento frente ao ambiente externo.

Apesar de existirem funções específicas para cada membrana biológica sua estrutura geral corresponde a um filme muito fino de moléculas lipídicas e protéicas, ligadas por forças não-covalentes. As membranas apresentam uma estrutura dinâmica e fluida, permitindo uma mobilidade molecular através do plano das membranas. As moléculas lipídicas se organizam numa camada dupla contínua de espessura aproximada de 5 nm. Esta organização garante a fluidez e funciona como uma barreira relativamente impermeável à passagem de moléculas solúveis em água. As proteínas de membrana têm como função o transporte de moléculas específicas, catálise de reações, ligantes estruturais, receptores para detecção e transdução de sinais químicos.

Estas membranas se constituem basicamente de lipídios e proteínas com pequenas quantidades de carboidratos. Sendo que a porcentagem em peso de carboidratos nas membranas biológicas não ultrapassa 10%. A maioria das membranas celulares de plantas e animais apresenta quantidades próximas de lipídios e proteínas. Contudo as frações de cada constituinte variam muito entre as células, organelas e espécies. O famoso modelo de membrana celular proposto por Singer e Nicolson em 1972 retrata uma bicamada formada por uma matriz de lipídios e proteínas como num mosaico fluido (Ohta,2004; Nakaya,1999).

As membranas não servem somente como barreiras separando os compartimentos aquosos com diferentes composições, mas também como a base estrutural na qual certas enzimas e sistemas de transporte estão firmemente ligados (Lehninger,1976).

A fluidez das membranas celulares é de extrema importância em processos de transporte através das mesmas. Se a fluidez for reduzida além de um nível mínimo estes processos de transporte podem cessar. A fluidez de uma bicamada lipídica depende tanto da sua composição quanto da temperatura em que ela se encontra. Uma bicamada constituída de um único fosfolipídio muda de um estado líquido para um cristalino rígido bidimensional (ou gel) em um ponto de congelamento característico. A temperatura na qual esta transição

de fase ocorre é mais baixa se as cadeias de hidrocarbonetos são mais curtas ou têm ligações duplas (Alberts, 2004).

3.3.1 Fosfolipídios

As moléculas lipídicas constituem em torno de 50% em massa da maioria das membranas celulares animais. A literatura (Alberts,2004) faz referência a aproximadamente 5×10^6 moléculas lipídicas numa área de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ de bicamada lipídica. Os lipídios mais abundantes numa membrana biológica são os fosfolipídios. Os fosfolipídios, também conhecidos por fosfoglicerídios ou fosfatídios são lipídios que derivam do grupo glicerol. Um grupo hidroxila primário do glicerol é esterificado pelo ácido fosfórico e os dois grupos restantes são esterificados por ácidos graxos. Por fim, um álcool liga-se ao ácido fosfórico, garantindo a parte polar aos fosfolipídios (Sousa,1984). As FIG's 3.7 e 3.8 ilustram a estrutura geral de uma fosfatidiletalonamina e de uma fosfatidilcolina, respectivamente.

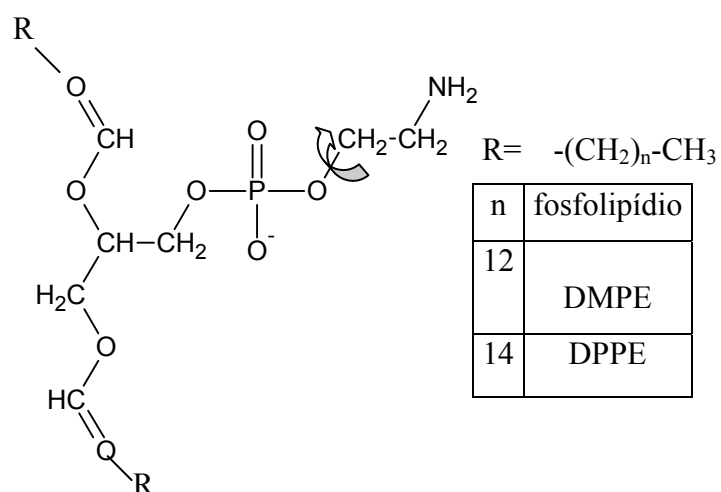


FIGURA 3.7 Esquema de uma estrutura geral de uma fosfatidiletalonamina

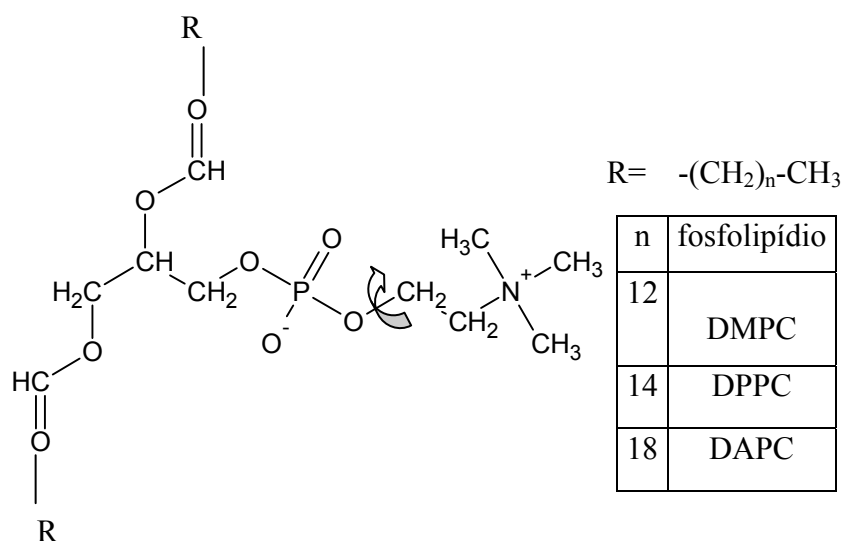


FIGURA 3.8 Esquema de uma estrutura geral de uma fosfatidilcolina

Como os fosfolipídios possuem uma cabeça polar em adição ao grupamento hidrocarbônico apolar, são classificados como substâncias anfífilas. Sua natureza anfífila permite que estes formem naturalmente a bicamada lipídica num ambiente aquoso. Estes podem diferir no tamanho, forma e carga elétrica dos grupos polares, outra variante é a capacidade destes poderem apresentar várias espécies químicas dependendo dos ácidos graxos substituintes em R1 e R2 (Nakaya,1999; Sousa,1984). Como grupos cabeça polares podemos encontrar grupos como a colina e a etalonamina que tem suas estruturas ilustradas na FIG 3.9.

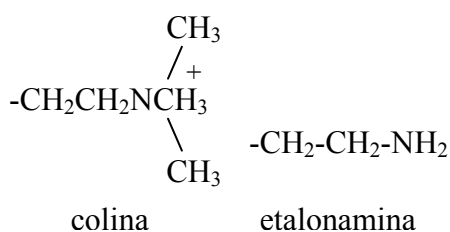


FIGURA 3.9 Fórmula estrutural de grupamentos presentes em fosfolipídios

O formato cilíndrico dos fosfolipídios é o um fator determinante na formação espontânea das duplas camadas em ambientes aquosos. Nestes arranjos a parte hidrofílica da molécula se volta para a superfície da água. Todos os fosfolipídios têm carga negativa no grupo fosfato em pH 7,0, enquanto que o grupo colina tem carga positiva (Sousa,1984).

Estudos recentes mostram que as moléculas de fosfolipídios em duplas camadas sintéticas muito raramente migram de uma monocamada para outra (Alberts, 2004). Este processo é conhecido como “flip-flop”, acontece menos do que uma vez por mês para uma molécula (Kol, 2002; Regev, 2005). No entanto as moléculas lipídicas se deslocam aproximadamente 10^7 vezes por segundo numa mesma monocamada. Estes estudos também revelam que as moléculas lipídicas rotacionam rapidamente em torno de seu eixo longo e que suas cadeias de hidrocarbonetos são flexíveis.

Em solução aquosa, os fosfolipídios podem se dissociar em uma grande variedade de estruturas dependendo da natureza de seu grupo polar, do meio e do comprimento e grau de insaturação das cadeias hidrocarbônicas da cauda. Este polimorfismo se deve basicamente a interação hidrofílica entre os grupos polares e as moléculas de água e a interação hidrofóbica entre as cadeias hidrocarbônicas e as moléculas de água (Sousa,1984; Jensen, 2004; Scherfeld, 2003).

A grande maioria dos fosfolipídios de membranas celulares está distribuída ao acaso na membrana plasmática. As membranas de eucariotos contêm uma grande variedade de fosfolipídios com grupos cabeça variando em tamanho, forma e carga elétrica e com caudas hidrofóbicas variando em tamanho e insaturação. Este fato está relacionado às membranas lipídicas funcionarem como um solvente bidimensional para as proteínas na membrana. Algumas proteínas de membrana necessitam da presença de grupos cabeça específicos dos fosfolipídios para funcionar.

Em alguns casos os fosfolipídios podem, através de forças de atração fortes o suficiente, se organizar em pequenos microdomínios, ou rafts lipídicos (Almeida,2005; Epanand,2004; London,2005; Pike,2005). Estes rafts são mais espessos que outras partes da bicamada e podem acomodar algumas proteínas. Devido a este fato supõem-se que as bolsas lipídicas devem organizar estas proteínas concentrando-se para transporte em pequenas vesículas (Alberts,2004).

3.3.2 Colesterol

A bicamada em diversos casos não é constituída somente de fosfolipídios. Em várias situações também se nota a presença de colesterol. O colesterol é um esteróide, portanto derivado do hidrocarboneto tetracíclico saturado peridrosciclopentanofenantreno. Os esteróides diferem no número e posição das ligações duplas, no tipo, número e posição de grupos substituintes dentre outras características. O colesterol é um dos esteróides mais abundantes em tecidos animais e pertence a um grande subgrupo dos esteróides, os esteróis. Este subgrupo consiste de álcoois esteróides contendo um grupo hidroxílico e uma cadeia alifática de oito ou mais átomos de carbono (Alberts,2004). A FIG 3.10 traz a estrutura de uma molécula de colesterol.

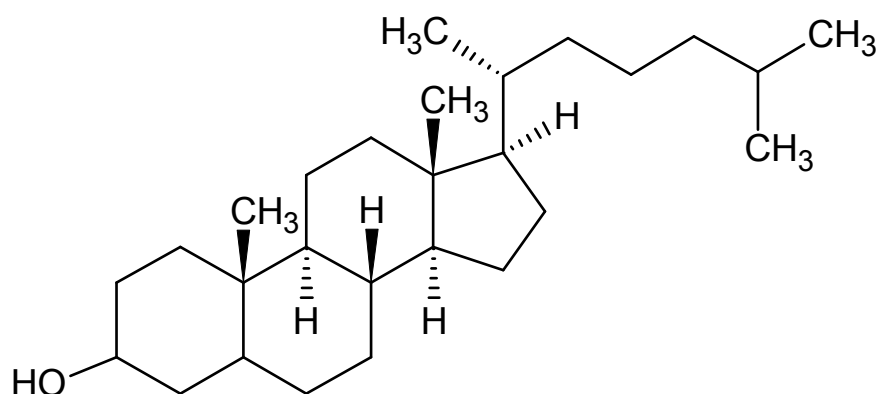


Figura 3.10. Estrutura de uma molécula de colesterol

As moléculas de colesterol melhoram as características de impermeabilidade das biomembranas. O colesterol é parcialmente miscível na bicamada fosfolipídica (London,2005).

Elas se orientam na estrutura da bicamada fosfolipídica de forma que seus grupamentos hidroxila fiquem próximos aos grupos das cabeças polares das moléculas fosfolipídicas. Com isso seus rígidos anéis esteróides interagem com a região da cauda hidrofóbica mais

próxima ao grupo cabeça chegando a imobilizá-las de forma parcial. Esta imobilização ocasiona no fato da bicamada ficar menos sujeita a deformações nesta região diminuindo assim a permeabilidade de pequenas moléculas hidrossolúveis. Outra característica importante do colesterol é que este tem a tendência de tornar a bicamada menos fluida. Contudo nas altas concentrações em que é encontrado na maioria das membranas plasmáticas de eucariotos, impede que as cadeias hidrofóbicas se aproximem e se cristalizem. Assim ele coíbe possíveis transições de fase (Diakowski, 2006).

O colesterol funde a 150 °C e é insolúvel em água, sendo que sua dissolução ocorre de forma excelente em clorofórmio, éter e benzeno. Ele ocorre em membranas plasmáticas de muitas células animais (Gallegos, 2004; Lehninger, 1976; Róg, 2001).

3.3.3 *Proteínas*

Apesar da estrutura básica das membranas biológicas ser fornecida pela bicamada fosfolipídica, as proteínas presentes na membrana desempenham um papel fundamental nas funções específicas das membranas (Lehninger, 1976).

As proteínas são os compostos orgânicos mais encontrados nas células e representam pelo menos a metade de seu peso seco. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em uma função biológica diversa (Wallace, 1997).

São constituídas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, tendo cada uma muitos resíduos de α -aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. Todas elas, independentemente de sua função, são formadas por um conjunto de vinte aminoácidos. As proteínas podem ser classificadas segundo sua conformação tridimensional. Existem proteínas fibrosas em forma de bastões ou lâminas; que apresentam cadeias peptídicas paralelas e relativamente extensas. São insolúveis e servem como elementos estruturais. Proteínas globulares têm cadeias polipeptídicas firmemente enoveladas; são esféricas ou globulares e possuem ação dinâmica (Alberts, 2004).

A estrutura primária da proteína é formada por sua seqüência específica de aminoácidos. A estrutura secundária representa o arranjo tridimensional onde a proteína adquire a forma estendida ou helicoidal ao longo de um eixo, como nas proteínas fibrosas. A estrutura terciária se refere à maneira pela qual as cadeias estão arranjadas no espaço de forma enovelada para dar origem as proteínas globulares. A estrutura quaternária traz a idéia de como as cadeias polipeptídicas individuais se associam (Alberts, 2004; Lehninger, 1976)

O fator determinante no arranjo tridimensional de uma proteína é sua seqüência de aminoácidos (Lehninger, 1976).

As proteínas exercem diversos papéis como catalisadores, elementos estruturais, agentes protetores, veículos de transporte, dentre outros. A literatura (Lehninger, 1976; Wallace, 1997) indica que as proteínas presentes nas membranas celulares utilizam formas tridimensionais semelhantes a canais para realizar o transporte de íons de forma específica.

Assim como os fosfolípidios, as proteínas transmembrana são anfífilas. As regiões hidrofóbicas atravessam a membrana e interagem com as caudas hidrofóbicas das moléculas lipídicas no interior da bicamada, onde elas estão isoladas da água. As regiões hidrofílicas ficam expostas à água nos dois lados da membrana (Alberts, 2004).

3.3.4 Transporte de pequenas Moléculas

Devido a sua estrutura a bicamada lipídica serve como barreira à passagem da maioria das moléculas polares. Para utilizar-se desta propriedade as células desenvolveram mecanismos para o transporte de moléculas hidrossolúveis. Estes mecanismos permitem a ingestão de nutrientes essenciais, excreção de produtos metabólicos e regulação de concentrações intracelulares de íons. Este transporte através da bicamada lipídica é realizado por proteínas transmembrana especializadas, cada qual sendo responsável pela transferência de um íon específico, de uma molécula, ou de um grupo de íons ou moléculas semelhantes (Alberts, 2004; Pike, 2005).

De maneira geral quanto menores e mais solúveis em lipídios são as moléculas (mais hidrofóbicas ou apolares), mais rapidamente difundirão através da bicamada lipídica. As pequenas moléculas apolares se dissolvem facilmente nas bicamadas. As pequenas moléculas polares sem carga, como a água, se difundem pela bicamada, porém com uma velocidade bem mais lenta que a das pequenas moléculas apolares. No entanto as bicamadas lipídicas são impermeáveis a íons, não importando o tamanho, a carga e o alto grau de hidratação destas moléculas (Barry, 1969; De Robertis, 2001)

Nas membranas biológicas existem proteínas de transporte de membrana especiais que garantem o transporte de íons através dos meios intra e extracelular. A especificidade das proteínas de membrana foi inicialmente identificada durante a década de 50. Existem duas classes principais de proteínas transportadoras de membranas, as carreadoras e as de canal (De Robertis, 2001).

As proteínas carreadoras ligam o soluto específico a ser transportado e sofrem uma série de mudanças em sua conformação para conduzir o soluto ligado através da membrana (Alberts, 2004).

As proteínas de canal exercem uma interação muito mais fraca com o soluto. Elas formam canais que se estendem através da bicamada lipídica. Nos momentos em que estes poros se encontram abertos ocorre a passagem de solutos específicos (no geral íons inorgânicos de tamanho e carga apropriados) através destes. A observação destes dois mecanismos mostra claramente que o transporte por meio de proteínas de canal ocorre a uma velocidade muito mais rápida que o transporte controlado por proteínas carreadoras (Alberts, 2004).

3.3.5 Canais Iônicos

A grande maioria das proteínas de canal nas membranas biológicas de animais e vegetais que ligam o citosol ao meio extracelular se apresentam em forma de poros estreitos fortemente seletivos que podem ser abertos e fechados. Devido ao fato de que na maioria

dos casos essas proteínas se relacionarem ao transporte de íons estas ficaram conhecidas como canais iônicos (Chung,1999; Kandel,2000).

Os canais iônicos não podem ser ligados a uma fonte de energia para efetuarem o transporte ativo, com isso o transporte realizado por eles é sempre passivo. Desta forma o objetivo dos canais iônicos é difundir rapidamente íons inorgânicos (como o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) a favor de seus gradientes eletroquímicos (Fagni,1996; Garofoli,2003).

Existem duas características que distinguem os canais iônicos de poros aquosos. Em primeiro lugar eles apresentam seletividade de íons. Este fato sugere que os canais são estreitos o suficiente em determinadas regiões. Forçando um grande contato das paredes do canal com os íons permeáveis. Estes íons devem perder o máximo possível das moléculas de água associadas a eles para poderem passar através da parte mais estreita do canal. Esta região é denominada filtro de seletividade. Com isso quando as concentrações iônicas estão elevadas o fluxo de íons por um canal aumenta de forma proporcional até que se estabiliza (Kandel,2000).

Em segundo lugar os canais iônicos não permanecem abertos indefinidamente. Eles são controlados por estímulos específicos. Os principais estímulos que são conhecidos atualmente são o controle através da aplicação de voltagem na bicamada, através da aplicação de uma tensão mecânica e através da ligação de um ligante (Debanne,2003; Fagni,1996). Sendo que este ligante pode ser um mediador extracelular (por exemplo, um neurotransmissor), um mediador intracelular (por exemplo, um íon) ou um nucleotídeo. Outra forma de se controlar a atividade de um canal iônico é através da fosforilação e da desfosforilação de uma proteína. No entanto se qualquer um destes estímulos for prolongado a maioria dos canais passa para um estado fechado “inativo”. Neste estado “inativo” eles aguardam a remoção do estímulo para posterior abertura (Kandel,2000).

3.3.6 Membranas Celulares Artificiais

As membranas celulares naturais desempenham um papel de extrema importância em diversos fenômenos biológicos essenciais. Elas englobam toda a célula controlando as diferenças fundamentais entre o meio intra e extracelulares. Através de gradientes iônicos gerados a partir de proteínas especializadas nas membranas é possível sintetizar ATP (adenosina trifosfato). Esta energia pode ser utilizada para direcionar o fluxo de solutos através da membrana ou produzir e transmitir sinais elétricos. Em todas as membranas celulares existem proteínas que atuam como sensores de sinais externos, permitindo que a célula mude seu comportamento frente ao ambiente externo (Alberts, 2004; Lehninger,1976; Robertis,2001).

Estas membranas se constituem basicamente de lipídios e proteínas com pequenas quantidades de carboidratos. Sendo que a porcentagem em peso de carboidratos nas membranas biológicas não ultrapassa 10%. A maioria das membranas celulares de plantas e animais apresenta quantidades próximas de lipídios e proteínas. Contudo as frações de cada constituinte variam muito entre as células, organelas e espécies. O famoso modelo de membrana celular proposto por Singer e Nicolson em 1972 retrata uma bicamada formada por uma matriz de lipídios e proteínas como num mosaico fluído (Ohta,2004; Nakaya,1999).

Os filmes LB são usados no estudo do ordenamento e empacotamento de moléculas usualmente capazes de formar monocamadas insolúveis na interface ar-água. A estrutura biológica que aparentemente é mais bem mimetizada pela técnica LB é a membrana celular (Bykov,1996; Roberts, 1990).

Diversos autores vem estudando bicamadas depositadas através do uso da técnica LB para se desenvolver sistemas artificiais (Rekilä,2002; Rinia,1999; Róg, 2001; Scherfeld,2003). O uso da técnica LB se deve ao fato desta apresentar características de processo que possibilitam mais controle e velocidade na construção da bicamada. A técnica de automontagem demanda um tempo elevado para se organizar o filme e técnicas como o

crescimento de feixe epitaxial fazem uso de vácuo, o que impossibilita o emprego de moléculas biológicas (Paterno,20001).

A grande vantagem de se trabalhar com membranas celulares artificiais reside na possibilidade de se controlar sua composição química. Uma membrana natural apresenta diversos constituintes, cada um com sua função específica, tornando a membrana extremamente complexa. No entanto as membranas artificiais nanoestruturadas terão o controle a nível molecular de seus constituintes, viabilizando assim o controle de suas propriedades.

3.4 Biossensores

Um biossensor pode ser definido como sendo um dispositivo que apresenta um elemento biológico sensível conectado a um transdutor (Eggins,1997). Como transdutor entende-se o dispositivo capaz de converter sinais físicos e químicos em sinais mensuráveis, usualmente sinais eletrônicos, cuja magnitude seja proporcional à concentração da espécie ou grupamento químico (Silva,2002; Eggins,1997; Wolfbeis,2002). Como ilustrado na FIG 3.11 um biossensor funciona através do mimetismo de organismos vivos. O detector biológico atua de forma semelhante às membranas gustativas ao perceber o sabor. O sinal é convertido em impulsos elétricos tanto nos transdutores quanto nas células nervosas e enviado a um dispositivo que irá processar as informações, no caso de biossensores um microprocessador e no caso de organismos vivos o cérebro.

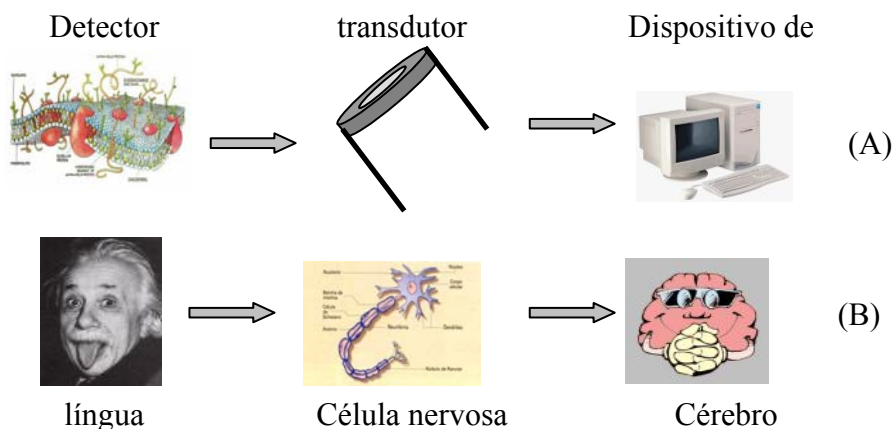


FIGURA 3.11 Esquema comparativo entre biossensor (A) e detecção em organismos vivos (B)

Um biossensor combina a especificidade e seletividade dos sistemas biológicos ao poder de cálculo do microprocessador. O biossensor tem a função de detectar e analisar de forma qualitativa e quantitativa uma dada espécie química em tempo real e de forma contínua num meio de interesse (Silva,2002; Dutra,2000; Eggins,1997).

3.4.1 Propriedades de Interesse em Biossensores

Todos os biossensores atualmente necessitam de certas características básicas para exercerem da melhor forma possível suas funções. Estas características incluem a seletividade, a sensibilidade, a estabilidade e a reprodutibilidade (Silva,2002;Eggins,1997).

A seletividade indica a capacidade do biossensor de responder a somente um tipo de entidade, chamada de analito. Qualquer outra espécie química deve se ignorada e quando isto não ocorre diz-se que o sensor está sofrendo interferência.

A faixa limite de detecção do sensor é avaliada pela sua sensibilidade. A sensibilidade é uma propriedade que depende da aplicação do sensor. Sendo que em alguns casos pode-se exigir um alcance de valores muito baixos (Eggins,1997).

A molécula responsável pelo mecanismo de bioreconhecimento deve permanecer com suas características básicas de detecção durante a maior quantidade de tempo possível. A propriedade que analisa este tempo é a estabilidade.

Uma outra característica que se exige de um biossensor é sua capacidade de ser reutilizado. Contudo na maioria dos casos, os mecanismos de detecção em um biossensor são irreversíveis (Silva,2002; Dutra,2000; Eggins,1997).

Com isso percebe-se que os biossensores apresentam excelentes propriedades de seletividade e sensibilidade, contudo sua estabilidade e sua reprodutibilidade ainda representam certa limitação.

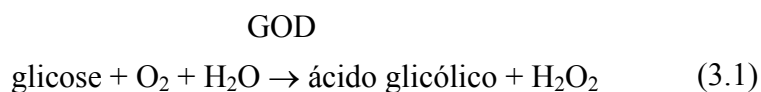
3.4.2 O Primeiro Biossensor

O primeiro biossensor foi descrito por Clark e Lyons em 1962 para o monitoramento de glicose. Este biossensor foi patenteado em 1970 e sua produção teve início em 1974 pela Yellow Springs Instrument Company (Silva,2002; Eggins,1997).

O monitoramento de glicose é de grande importância devido a sua relação com os processos de metabolismo humano. Em certos casos o pâncreas não consegue produzir insulina de forma a controlar adequadamente o nível de glicose no sangue. Em pacientes com este quadro tem-se administrado doses de insulina para se controlar o nível de glicose.

Há algumas décadas a única forma de se avaliar o desajuste de insulina era através de exames laboratoriais que devido ao fator tempo não representam de forma adequada a condição do paciente diabético. Com o auxílio de biossensores o próprio paciente pode, com uma gota de sangue, obter a concentração de glicose no sangue em um tempo estimado de 1 minuto.

Os biossensores de glicose são baseados no fato de que a enzima glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose em ácido glicólico (Eggins,1997). A reação de oxidação da glicose catalisada pela glicose oxidase (GOD) esta representada na reação 3.1.



Juntamente a esta enzima Clark utilizou-se de um eletrodo de oxigênio. A quantidade de glicose é proporcional ao aumento no fluxo de oxigênio que chega ao eletrodo (Eggins,1997). A FIG 3.12 descreve de forma esquemática este biossensor, sendo que este esquema é muito utilizado em vários biossensores.

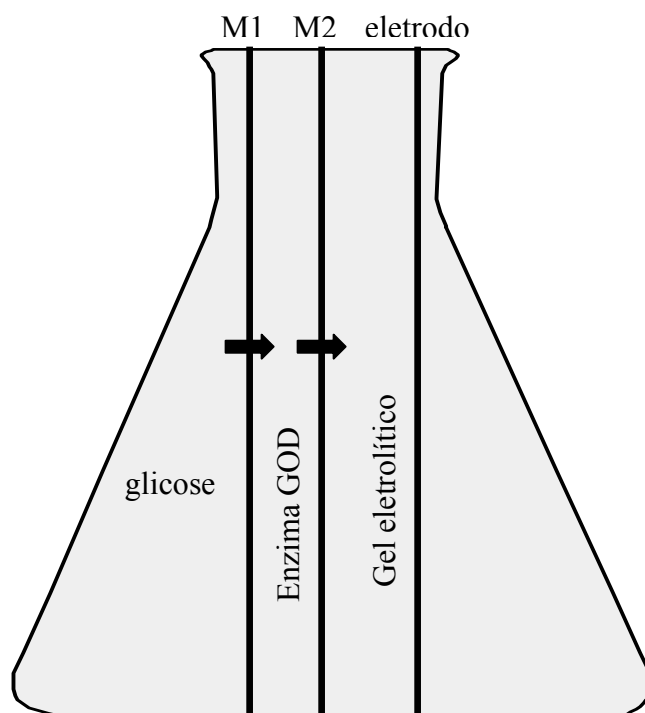


FIGURA 3.12 Esquema ilustrativo de um biossensor de glicose onde M1 é uma membrana permeável a O_2 e glicose e a membrana M2 é permeável somente a O_2

3.4.3 As Partes de um Biossensor

3.4.3.1 O analito

Existem diversos tipos de sistemas que podem ser analisados por um biossensor. A princípio qualquer substância que seja consumida ou produzida em uma reação bioquímica pode ser analisada por um biossensor, desde que este possa ser construído para este fim. Como exemplos pode-se citar os açúcares, a uréia, creatinina, colesterol, glicose, antígenos e diversos aminoácidos (Silva,2002; Eggins,1997; Wolfbeis,2002).

3.4.3.2 O componente biológico

A importância do componente biológico se deve ao fato de que este eleva consideravelmente a especificidade do substrato. Ele pode catalisar a reação envolvendo o

substrato ou pode ligar-se de forma seletiva ao substrato. Os quatro principais grupos de materiais utilizados são as enzimas, os anticorpos, os ácidos nucleicos e os receptores.

Uma enzima é uma macromolécula de grande complexidade constituída em grande parte por proteínas. Em muitas enzimas, principalmente as empregadas nos biossensores, o modo de ação envolve a oxidação ou redução que pode ser detectada eletroquimicamente. As enzimas apresentam alta especificidade e sensibilidade e um ótimo tempo de resposta. Contudo são materiais que ainda apresentam elevado custo de extração, isolamento e purificação, além de geralmente perderem um pouco de sua funcionalidade quando imobilizadas num transdutor ou após um curto período de tempo em serviço.

Os organismos possuem um sistema imunológico que desenvolve anticorpos, proteínas capazes de se ligar a um antígeno e minimizar sua ação prejudicial. As vantagens como componente biológico são sua alta seletividade e sensibilidade. Contudo eles não apresentam o efeito catalítico. Anticorpos se ligam de forma específica muito mais fortemente a seus antígenos do que enzimas a seus substratos (Silva, 2002; Dutra, 2000; Eggins, 1997).

Entre os compostos orgânicos nitrogenados há aqueles que possuem na molécula o núcleo de purina (base púrica ou purínicas). Sendo que as bases de maior interesse biológico são a adenina e a guanina. Outra base de grande interesse é o núcleo pirimidina (bases purimídicas), sendo elas a citosina, a timina e a uracila. A FIG 3.13 ilustra a estrutura destas bases de interesse biológico.

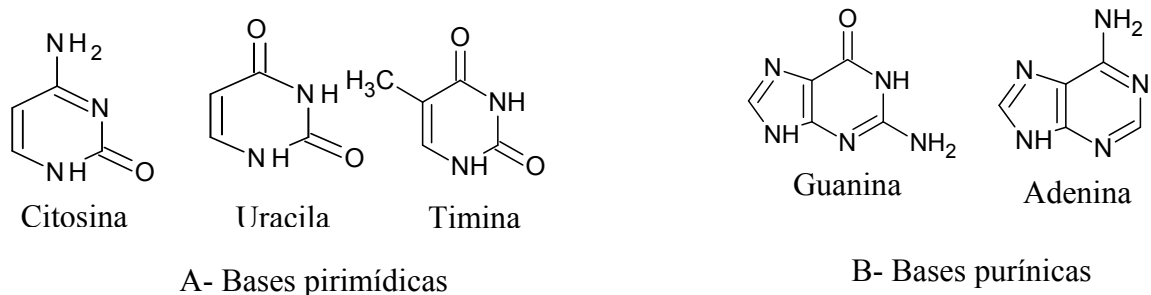


FIGURA 3.13 Bases purínicas e purimídicas de interesse biológico

Os ácidos nucléicos, ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), são componentes essenciais para todos os seres vivos, sendo que diferem somente numa pentose e numa base pirimídica.

O uso de ácidos nucléicos tem tido grande importância na área de desenvolvimento de biossensores para a detecção de doenças genéticas, infecções virais e cânceres.

Em se tratando de receptores biológicos tem-se feito diversas descobertas no que diz respeito a neuroreceptores e sua interação com neurotransmissores e neurotoxinas. Na área de biossensores estes componentes biológicos ainda são uma intensa fonte de pesquisa. Estes materiais apresentam aspectos interessantes para serem utilizados no desenvolvimento de biossensores.

Outros materiais biológicos também vem sendo utilizados como alguns tecidos de plantas, animais e microorganismos (Eggins,1997; Wolfbeis, 2002).

Para se obter um biossensor operacional o componente biológico precisa ser depositado apropriadamente sobre o transdutor. Este processo é conhecido como imobilização. Existem cinco métodos principais de imobilização como se segue.

Adsorção é o método mais simples e que envolve menor preparação. Porém a ligação obtida é fraca e não garante um dispositivo estável. Contudo, aspectos como durabilidade, estabilidade e compatibilidade levaram ao desenvolvimento de outras técnicas.

O encapsulamento foi o método utilizado em alguns dos biossensores desenvolvidos recentemente. A biomolécula se encontra envolta por uma membrana que limita sua contaminação e biodegradação. O encapsulamento pode proteger o componente biológico de mudanças na temperatura, pH, força iônica e composição química. Além disso, a

membrana pode ser permeável a algumas substâncias (moléculas pequenas, gases e elétrons).

No método da ligação cruzada a biomolécula é ligada quimicamente à superfície do substrato. Há uma certa limitação na difusão. As propriedades mecânicas são pobres neste caso.

Através da técnica de ligação covalente obtemos um controle rigoroso entre um grupo funcional da biomolécula e a superfície do suporte sólido (Dutra, 2000; Eggins, 1997; Silva, 2002).

Na técnica de formação de gel o material biológico é misturado a uma solução de monômero, que é polimerizada até a formação de um gel. Contudo o gel pode servir de barreira à difusão do analito e resultar na perda de sua funcionalidade (Dutra, 2000; Eggins, 1997; Göpel, 1995).

A imobilização de componentes biológicos em superfícies de forma específica é de grande interesse na área de sensoriamento. Para que o biossensor apresente boas características a imobilização deve garantir que a biomolécula não perca sua funcionalidade. Algumas das possíveis técnicas são ilustradas nas FIG 3.14 a 3.16 (adaptadas de: Silva, 2002).

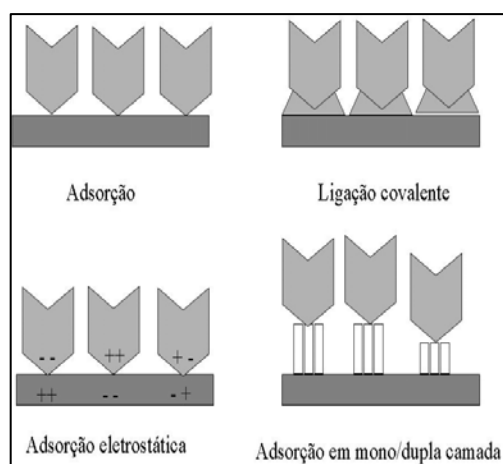


FIGURA 3.14 Formas de imobilização de biomoléculas I

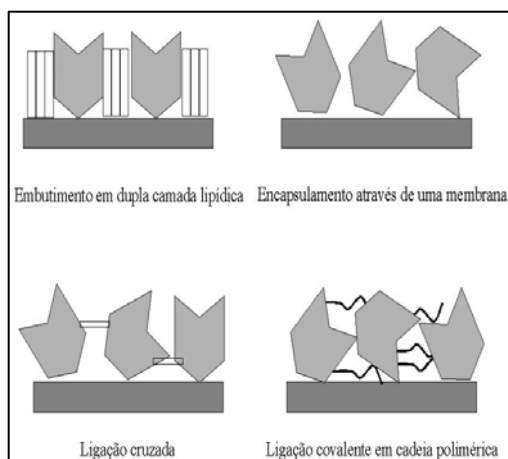


FIGURA 3.15 Formas de imobilização de biomoléculas II

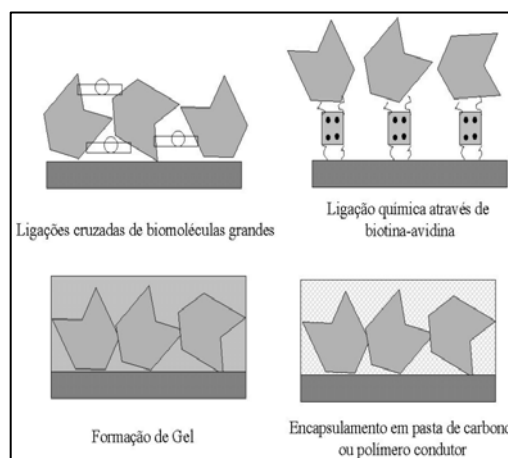


FIGURA 3.16 Formas de imobilização de biomoléculas III

Uma das técnicas utilizadas atualmente consiste na imobilização através da bicamada lipídica obtida com a deposição de filmes ultrafinos LB que permite o controle de espessura do filme a nível molecular.

3.4.3.3 Transdução

O dispositivo de transdução corresponde a um sistema que tem a capacidade de converter, por exemplo, um sinal químico num sinal elétrico. Os transdutores podem ser classificados em eletroquímicos, eletromagnéticos e térmicos.

Transdutores eletroquímicos se utilizam da conversão de um sinal da alteração da carga e transferência de elétrons provenientes de uma reação química.

Os transdutores eletromagnéticos usam do mecanismo de conversão de ondas eletromagnéticas para executar seu objetivo.

Nos transdutores térmicos o princípio de funcionamento envolve a entalpimetria, utilizando-se de termistores e termopares para efetuarem sua função (Dutra, 2002; Eggins, 1997; Silva, 2002)

4. METODOLOGIA

A Fig 4.1 ilustra o fluxograma desenvolvido até o momento para se avaliar as isotermas dos sistemas estudados.

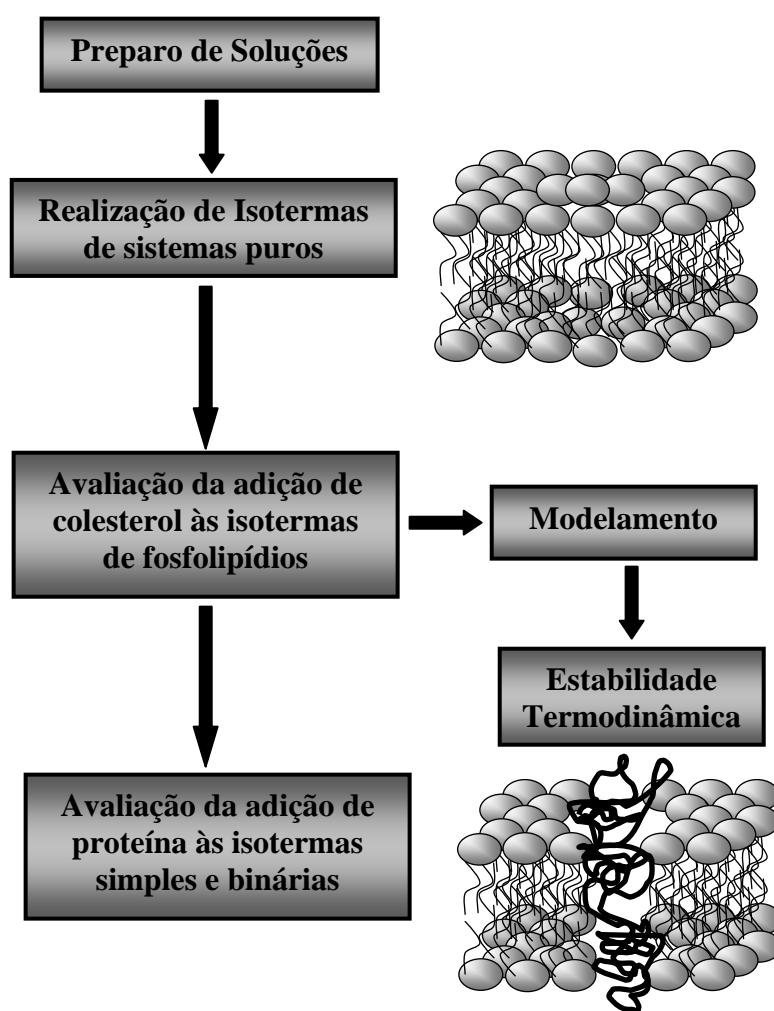


FIGURA 4.1 Fluxograma de etapas para estudo de isotermas de fosfolípidios, e deposição através da técnica LB.

4.1 Preparo de Soluções

4.1.1 Água deionizada pH 6

Um becker de 1000 mL com água deionizada apresentando resistividade de 18 MΩ.cm e pH inicial de $5,5 \pm 0,1$, à temperatura ambiente, deve ser posto em agitação. A memória de cálculo a seguir indica o volume de solução NaOH 0,1 M que deverá ser adicionado para se elevar o pH para $6,0 \pm 0,1$. A equação 4.1 refere-se a este volume.

$$\text{pH}=5,5 \quad -\log[\text{H}^+] = 5,5 \quad [\text{H}^+] = 3,1623 \times 10^{-6} \text{ mols/L}$$

$$\text{Supondo 1L de solução : } n_{\text{H}^+} = 3,1623 \times 10^{-6} \text{ mols}$$

$$\text{pH}=6,0 \quad -\log[\text{H}^+] = 6,0 \quad [\text{H}^+] = 1 \times 10^{-6} \text{ mols/L}$$

$$\text{Supondo 1L de solução : } n_{\text{H}^+} = 1 \times 10^{-6} \text{ mols}$$

$$\Delta n_{\text{H}^+} = 2,1623 \times 10^{-6} \text{ mols}$$

$$\Delta n_{\text{H}^+} = n_{\text{OH}^-} \quad n_{\text{OH}^-} = 2,1623 \times 10^{-6} \text{ mols}$$

$$\boxed{\text{Volume.de.solução} = \frac{n_{\text{OH}^-}}{[\text{NaOH}]}} \quad (4.1)$$

Com isso, para 1000 mL de água deionizada adiciona-se 21,5 μL com o auxílio de uma seringa de 50 μL e aguarda-se o sistema entrar em homogeneização. O becker deve ser vedado e acondicionado na geladeira a fim de se manter a temperatura em torno de 20°C. A

água deve ser utilizada num prazo máximo de 1 dia para se evitar variações consideráveis no pH.

4.1.2 Solução de fosfolipídio

Inicialmente deve-se calibrar a balança analítica. O vidro de relógio deve ser posicionado sobre a balança e em seguida realizar o protocolo de tara. Deve-se pesar 0,0100 g do fosfolipídio e transportar esta massa para o balão volumétrico de 10 mL. O volume deve ser completado com uma solução clorofórmio (CHCl_3 MERCK $\approx 99\%$)/metanol (CH_3OH CRQ 99,8%) 9:1 (v/v). Deve-se agitar bem o frasco até a solução alcançar a homogeneidade. Em seguida a solução deve ser acondicionada em refrigerador visando, desta forma, evitar-se a evaporação do solvente. A solução obtida corresponde à concentração de 1 mg/mL. Para o preparo de uma solução de 0,1 mg/mL utiliza-se da mistura de 1 mL da solução preparada em 9 mL de solvente clorofórmio:metanol. Assim obtém-se uma solução 0,1 mg/mL de fosfolipídio.

4.1.3 Solução de Colesterol

Inicialmente deve-se calibrar a balança analítica. O vidro de relógio deve ser posicionado sobre a balança e em seguida realizar o protocolo de tara. Deve-se pesar 0,0020g de colesterol ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$, Aldrich, $\approx 99\%$) e transportar esta massa para o balão volumétrico de 10 mL. O volume deve ser completado com uma solução clorofórmio: metanol 9:1 (v/v). Deve-se agitar bem o frasco até a solução alcançar a homogeneidade. Assim, obtém-se a solução de concentração 0,2mg/ml. Em seguida a solução deve ser acondicionada em refrigerador visando, desta forma, evitar-se a evaporação do solvente.

4.1.4 Solução de PBS

Deve-se dissolver os seguintes sais em 800 ml de H_2O deionizada:

- 80 g de NaCl;

- 2,0 g de KCl;
- 14,4 g de Na₂HPO₄;
- 2,4 g de KH₂PO₄.

Em seguida, caso seja necessário se ajusta o pH para 7,4 com solução de 5N NaOH. Este volume deve ser ajustado para 1L com água deionizada. Para se obter a solução de PBS na concentração desejada deve-se diluir esta solução preparada na proporção de 1: 9 solução: água deionizada. Para se conservar a solução deve-se armazená-la num frasco vedado na geladeira.

4.1.5 Solução BSA 1mg/mL

Inicialmente deve-se calibrar a balança analítica. O vidro de relógio deve ser posicionado sobre a balança e em seguida realizar o protocolo de tara. Deve-se pesar 0,1000 g de BSA e transportar esta massa para o balão volumétrico de 100 mL. O volume deve ser completado com a solução de PBS. Deve-se agitar bem o frasco até a solução alcançar a homogeneidade. Em seguida a solução deve ser acondicionada em refrigerador visando desta forma evitar a desnaturação da proteína. A solução obtida corresponde a concentração de 1 mg/mL.

4.2 Obtenção de Isotermas

Ressalta-se que para fins de reprodutibilidade foram realizados ensaios visando-se obter três isotermas para cada sistema em estudo.

4.2.1 Isotermas de sistemas simples de fosfolipídios

Deve-se retirar toda a água do tanque com seringa de 20 mL e secar com lenço de papel. Em seguida limpar a cuba de Langmuir com lenço de papel umedecido em clorofórmio e

aguardar de 15 a 30 minutos para a evaporação do clorofórmio. Depois adicionar 190 mL de água deionizada pH 6 a 20°C. Neste momento realiza-se a remoção de impurezas da superfície da água deionizada com seringa descartável de 5 mL para pressão superficial igual a 0,3mN/m. Para todos os sistemas analisados (DMPC, DPPC, DAPC, DMPE, DPPE) o volume utilizado foi de 20µL com as soluções de concentração 1 mg/mL para todos os sistemas. A partir deste momento deve-se aguardar de 20 a 30 minutos para evaporação do solvente, inserir os dados relativos à isoterma no software utilizado (Nima516.exe) e iniciar o experimento com a velocidade de compressão desejada. Deve-se controlar a temperatura da subfase em $22 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o experimento usando-se sistema de refrigeração com vazão de líquido controlada.

4.2.2 Isotermas de sistemas híbridos binários fosfolipídio/colesterol

Retirar toda a água do tanque com seringa de 20 mL e secar com lenço de papel. Em seguida limpar a cuba de Langmuir com lenço de papel umedecido em clorofórmio e aguardar de 15 a 30 minutos para a evaporação do clorofórmio. Depois adicionar 190 mL de água deionizada pH 6. Neste momento realiza-se a remoção de impurezas da superfície da água deionizada com seringa descartável de 5 mL para pressão superficial igual a 0,3mN/m. A TAB.4.1 abaixo traz as frações molares de colesterol utilizadas sendo que o volume de fosfolipídio utilizado foi na faixa de 20µL. Adicionam-se os volumes e a partir deste momento deve-se aguardar de 20 a 30 minutos para evaporação do solvente. Em seguida inserir os dados relativos à isoterma no software utilizado (Nima516.exe) e iniciar o experimento com a velocidade de compressão desejada.

Tabela 4.1 Frações molares de colesterol adicionadas aos fosfolipídios

Sistema	Fração Molar Colesterol
DPPC	0,1
DPPC	0,2
DAPC	0,1
DAPC	0,2

4.2.4 Isotermas de sistemas binários DPPC/proteína e ternários DPPC/colesterol/proteína

Retirar toda a água do tanque com seringa de 20 mL e secar com lenço de papel. Em seguida limpar a cuba de Langmuir com lenço de papel umedecido em clorofórmio e aguardar de 15 a 30 minutos para a evaporação do clorofórmio. Depois adicionar 180 mL de água deionizada pH 6. Neste momento realiza-se a remoção de impurezas da superfície da água deionizada com seringa descartável de 5 mL para pressão superficial igual a 0,3mN/m. Agora deve-se adicionar 10mL da solução de BSA, 20 µL de DPPC e para o estudo de sistemas ternários 13 µL da solução de colesterol. A partir deste momento deve-se aguardar de 20 a 30 minutos para evaporação do solvente. Em seguida inserir os dados relativos à isoterma no software utilizado (Nima516.exe) e iniciar o experimento com a velocidade de compressão desejada.

4.3 Modelamento

4.3.1 Modelamento de Isotermas

A área/molécula teórica foi obtida através da equação 4.1 seguindo trabalhos recentes encontrados na literatura (Chou,2000; Fang,2003; Gong, 2002).

$$A_{adt} = A_1 X_1 + A_2 X_2 \quad (4.1)$$

Onde A_1 e A_2 correspondem às áreas/molécula dos constituintes e X_1 e X_2 suas respectivas frações molares.

Em uma planilha de Excel[®] foram importados os dados relativos às áreas/molécula dos dois constituintes. Devido ao fato do colesterol apresentar menor quantidade de pontos experimentais realizou-se uma extrapolação da curva na região “sólida”. A pressão superficial utilizada foi a pressão superficial experimental obtida para um fosfolipídio.

A isoterma aditiva obtida foi derivada com o auxílio do software Origin[®]. Com isso foi possível se determinar o ponto em que ocorre a passagem do estado “líquido” para o “sólido”.

De posse destes pontos de inflexão realizou-se regressão linear no software Excel[®]. Obtendo-se desta forma uma equação linear que representa a região “sólida” da isoterma e seu coeficiente de correlação.

4.3.2 Estabilidade termodinâmica

O presente estudo de miscibilidade dos filmes LB de fosfolipídios foi baseado em atuais trabalhos apresentados pela literatura (Chong,2000; Fang, 2003; Gong, 2002; Merino, 2005) As equações 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 foram retiradas dos trabalhos acima referenciados.

Para o estudo da estabilidade termodinâmica dos sistemas formados realizou-se inicialmente o cálculo da área em excesso através da equação 4.2.

$$A_{ex} = A_{exp} - A_{adt} \quad (4.2)$$

Onde A_{exp} corresponde à área/molécula obtida experimentalmente e A_{adt} à área/molécula obtida através da regra aditiva. O termo A_{ex} é conhecido como área em excesso. A equação 4.3 apresentada abaixo permite efetuar-se o cálculo do excesso de energia livre de mistura, ΔG_{ex} .

$$\Delta G_{ex} = \int_0^{\pi} A_{ex} d\pi \quad (4.3)$$

Onde π é a pressão superficial. A integração foi realizada através do software Origin[®]. Para se obter a energia livre de mistura, ΔG_{mix} , utiliza-se a equação 4.4 abaixo.

$$\Delta G_{mix} = \Delta G_{ex} + \Delta G_{ideal} \quad (4.4)$$

Onde a energia livre de mistura ideal, ΔG_{ideal} , pode ser calculada através da equação 4.5.

$$\Delta G_{ideal} = RT(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2) \quad (4.5)$$

Onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura e X_1 e X_2 são as frações molares dos constituintes.

4.3.3 Avaliação da energia gasta para se obter a fase LC à 40 mN.m^{-1} para sistemas puros

O presente estudo de histerese dos filmes LB de fosfolipídios foi baseado em atuais trabalhos apresentados pela literatura (Caetano,2004; Sousa,2006).

Realizou-se o cálculo da integral das isotermas de compressão e expansão e dessa forma é possível determinar a energia necessária para se posicionar as moléculas de fosfolipídios na fase LC à 40 mN.m^{-1} .

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isotermas de sistemas simples de fosfolipídios e colesterol

Foram obtidas três isotermas para cada sistema em estudo. Em cada isoterma utilizou-se uma solução de 1mg/mL. O volume utilizado foi de 20 μ L para as isotermas de colesterol. A velocidade de compressão foi de 1,5 $\text{cm}^2/\text{minuto}$. O tempo de evaporação do solvente foi de 30 minutos em todos os casos.

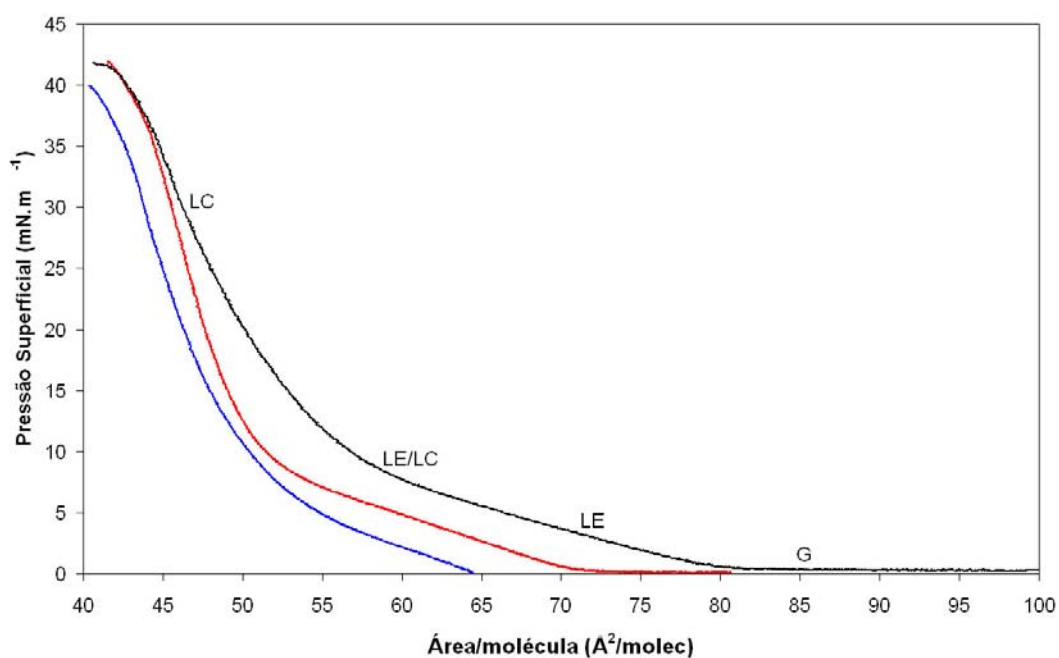


FIGURA 5.1 Isotermas de colesterol

A FIG 5.1 ilustra as isotermas obtidas para o colesterol. A compressão iniciou na faixa de 100 a 141 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ e fraturou na faixa de 40 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Estas isotermas evidenciaram a existência das fases LE (líquido expandido), LE/LC (fase intermediária), LC (líquido condensado) e G (pseudo-gás). A fase de pseudo-gás se inicia na faixa de 107 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ para os sistemas em estudo e termina na faixa de 70 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Nesta região a pressão superficial se mantém constante na faixa de 0,0 a 0,5mN/m. Para o colesterol a fase LE se inicia entre 65 e 80 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ e termina quando alcança a faixa entre 52 e 57

$\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Durante a fase LE a pressão superficial cresce vagarosamente entre os valores de $0,0 \text{ mN/m}$ e 7 mN/m . Quando a compressão alcança o valor de $60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e a pressão 7 mN/m a monocamada entra na região da fase LE/LC. Esta fase se manteve até a compressão alcançar a faixa de 60 a $55 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e a pressão superficial apresentou um crescimento entre 7 e 13 mN/m . A partir deste momento a pressão superficial começou um crescimento rápido, indicando a fase LC. Deve-se resaltar que a região da curva em estudo sobre a repetitibilidade corresponde a fase LC. Em muitos casos a aparência curva da fase LC pode desaparecer e então a pressão superficial inicia um crescimento a taxas maiores, indicando o aparecimento de uma nova fase conhecida como fase S (fase sólida). A fase S não pode ser identificada nas isotermas de colesterol, pois a pressão se manteve crescendo a taxa constante, e a aparência da curva permaneceu até os sistemas entrarem em colapso.

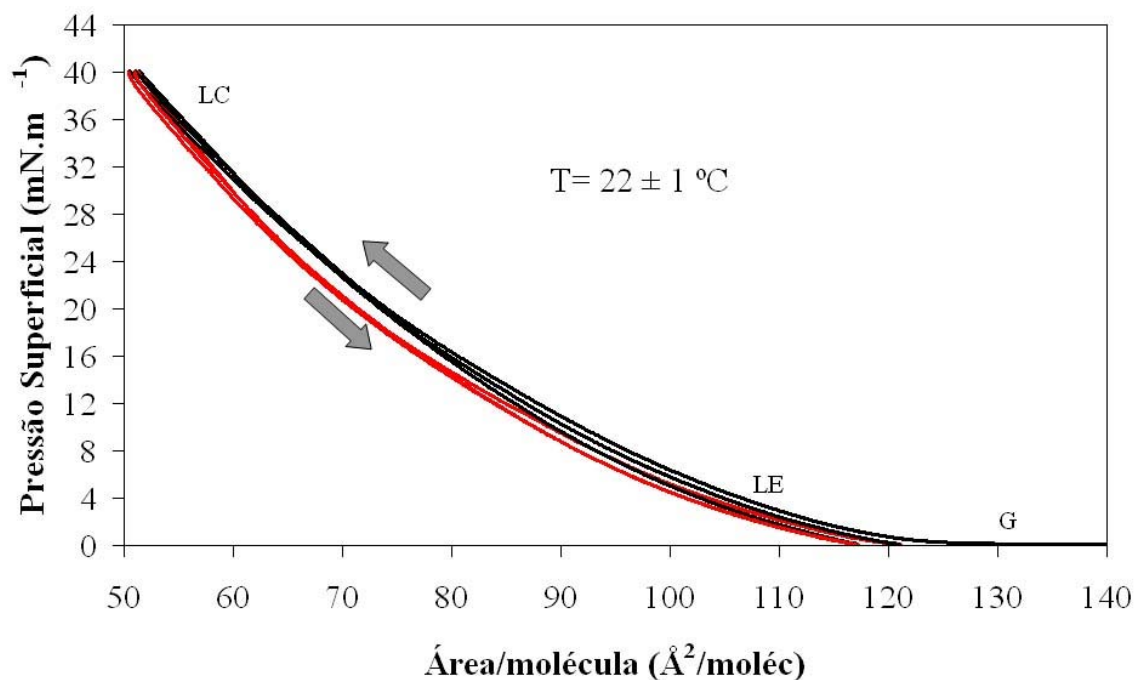


FIGURA 5.2 Ciclos de Compressão/Expansão para o DMPC

A FIG 5.2 traz os ciclos de compressão/expansão para o DMPC. Para se facilitar a análise as curvas de compressão se encontram na cor preta e as curvas de expansão na cor vermelha. A compressão iniciou na faixa de $140 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou na faixa de $50 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Estas isotermas evidenciaram a existência das fases LE (líquido expandido),

LC (líquido condensado) e G (pseudo-gás). A fase de pseudo-gás se iniciou na região de $140 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou na faixa de $120 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Nesta região a pressão superficial se manteve constante em torno de $0,0 \text{ mN/m}$. A fase LE se iniciou entre $115 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou quando alcançou a faixa de $85 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Durante a fase LE a pressão superficial cresceu alcançando os valores de $0,0 \text{ mN/m}$ a 15 mN/m . Quando a compressão alcançou o valor de $80 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e a pressão 18 mN/m os ciclos entram na região da fase LC. A fase S não pode ser identificada nas isotermas de DMPC.

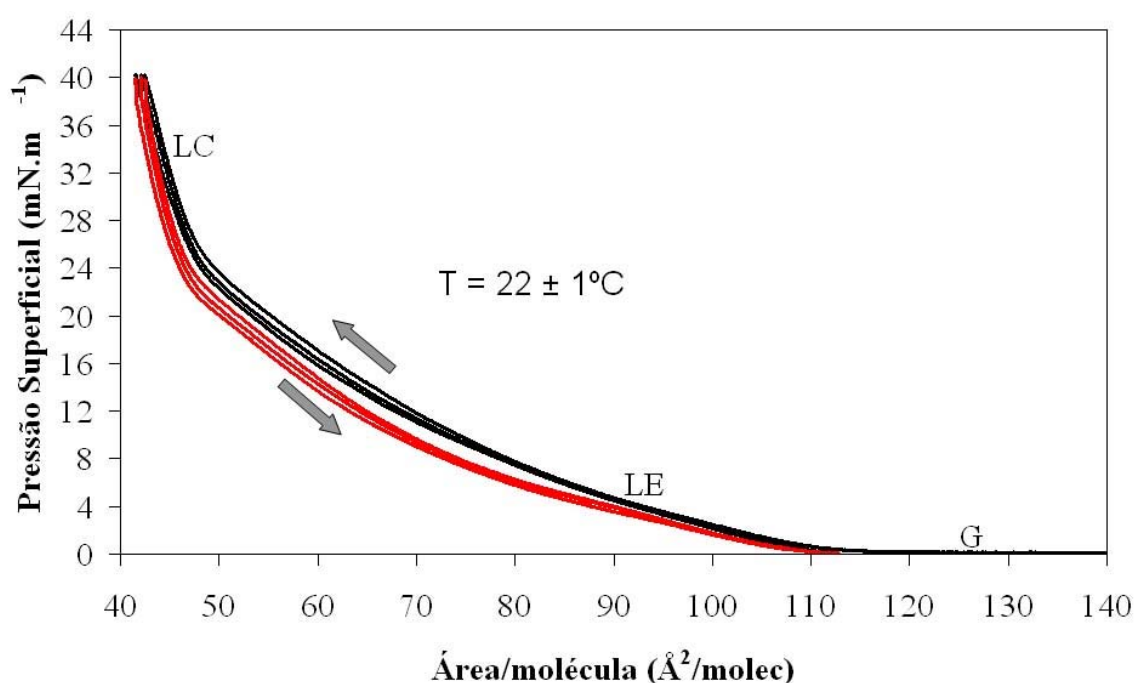


FIGURA 5.3 Ciclos de Compressão/Expansão para o DPPC

A FIG 5.3 ilustra os ciclos de compressão/expansão obtidos para o DPPC. Para se facilitar a análise as curvas de compressão se encontram na cor preta e as curvas de expansão na cor vermelha. A compressão iniciou na faixa de $140 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou na faixa de $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Estes ciclos evidenciaram a existência das fases LE (líquido expandido), LC (líquido condensado) e G (pseudo-gás). A fase de pseudo-gás se iniciou na faixa de $140 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou na faixa de $110 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Nesta região a pressão superficial se manteve constante em torno de $0,0 \text{ mN/m}$. A fase LE se iniciou entre $110 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ e terminou quando alcançou a faixa de $50 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Durante a fase LE a pressão

superficial cresceu alcançando os valores de 0,0 mN/m a 22 mN/m. A partir deste momento a pressão superficial iniciou um crescimento rápido, indicando a fase LC. A fase S não pode ser identificada nas isotermas de DPPC, pois a pressão se manteve crescendo a taxa constante e a aparência da curva permaneceu até os sistemas alcançarem a pressão alvo de 40 mN/m.

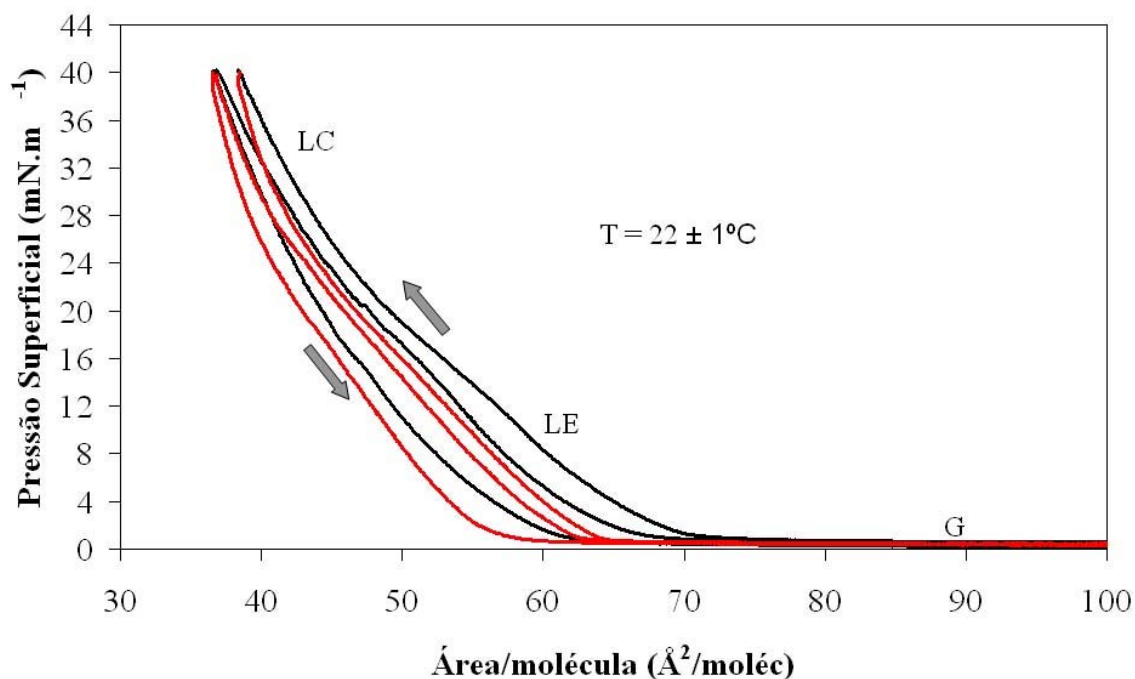


FIGURA 5.4 Ciclos de Compressão/Expansão para o DAPC

A FIG 5.4 ilustra os ciclos de compressão/expansão obtidos para o sistema de DAPC puro. Para se facilitar a análise as curvas de compressão se encontram na cor preta e as curvas de expansão na cor vermelha. Assim como nas FIG's 5.2 e 5.3 referentes ao estudo de monocamadas de colinas na interface ar/água nota-se a presença das fases G, LE e LC. Para este sistema a área/molécula obtida na fase LC foi de $53 \text{ Å}^2/\text{molécula}$. Sendo que esta fase teve início na pressão superficial de 20 mN/m.

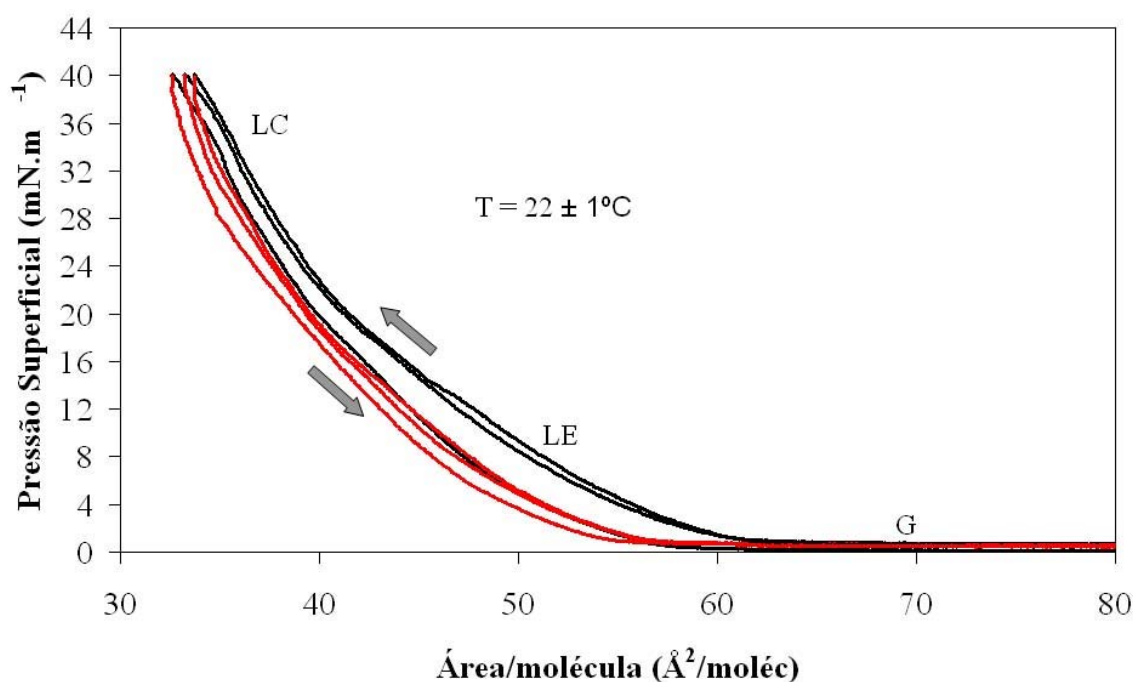


FIGURA 5.5 Ciclos de Compressão/Expansão para o DPPE

A FIG 5.5 ilustra os ciclos de compressão/expansão para o sistema de DPPE puro. Para se facilitar a análise as curvas de compressão se encontram na cor preta e as curvas de expansão na cor vermelha. Nelas pode-se perceber a presença das fases G, LE e LC. Para este sistema a área/molécula média encontrada na fase de líquido condensado foi de 47 Å²/molécula. Esta fase teve início na pressão superficial de 20 mN/m.

A FIG 5.6 ilustra os ciclos de compressão/expansão obtidos para o sistema de DMPE puro. Para se facilitar a análise as curvas de compressão se encontram na cor preta e as curvas de expansão na cor vermelha. Nelas pode-se perceber a presença das fases G, LE, LE/LC e LC. Para este sistema a área/molécula média encontrada na fase de líquido condensado foi de 50 Å²/molécula. Esta fase teve início na pressão superficial de 25 mN/m. Neste sistema foi possível se observar a formação da fase LE/LC caracterizada por uma mudança na inclinação das curvas entre a fase LE e LC.

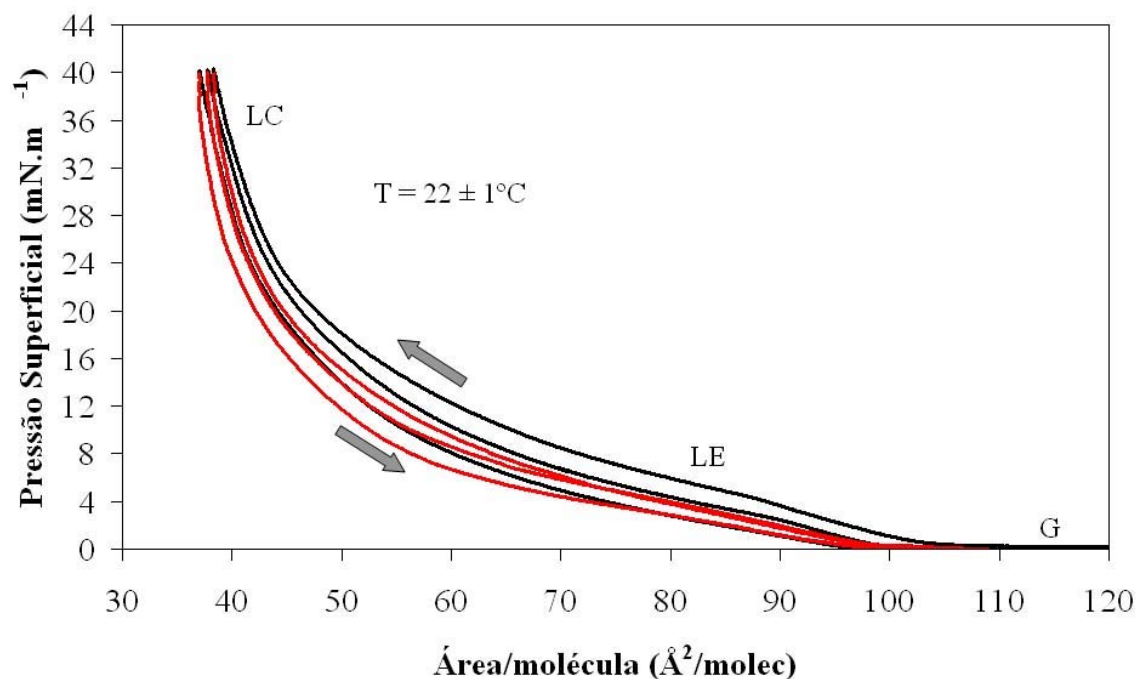


FIGURA 5.6 Ciclos de Compressão/Expansão para o DMPE

A presença da fase S nas monocamadas está relacionada com as interações entre as moléculas de fosfolípido. Estas interações podem ser ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e repulsão entre cadeias hidrofóbicas. Estas interações sofrem contribuições dos graus de liberdade de movimentação das moléculas. Portanto, como a fase S é aquela na qual as moléculas se apresentam num estado mais próximo umas das outras, se pode afirmar que as interações resultantes entre elas devem ser de forças atrativas. Essa situação é complexa devido à mobilidade das moléculas e à repulsão das cadeias carbônicas. Com isso tornou-se difícil observar a fase S nos sistemas em estudo.

A TAB 5.1 apresenta dados obtidos experimentalmente de monocamadas dos sistemas em estudo. A área/molécula é obtida pela média de três regressões lineares na região de LC. O ponto em que a reta intercepta o eixo das abcissas fornece a área que hipoteticamente é ocupada por uma molécula na fase líquido condensado. A compressibilidade, C_s , ou seja, o

módulo de compressão, de uma monocamada é uma medida das interações elásticas do empacotamento das moléculas na monocamada.

A compressibilidade é um dos meios mais sensíveis para se determinar como as mudanças estruturais ocorrem nas cadeias acil de fosfolipídios durante a montagem da bicamada fosfolipídica (Latka,2004; Zhao,2006). Este parâmetro permite se avaliar as interações entre os fosfolipídios e uma proteína ou colesterol, por exemplo.

Tabela 5.1 Áreas/molécula médias e desvios padrão e compressibilidade

Sistema	Média ($\text{\AA}^2/\text{molec}$)	Desvio Padrão	Compressibilidade (m/mN)
Colesterol	53	2	0,06925
DMPC	93	0,3	0,01065
DPPC	56	0,3	0,04857
DAPC	53	3	0,05830
DMPE	50	2	0,06260
DPPE	47	0,1	0,06170

O tamanho da cadeia é um fator crucial na área/molécula encontrada nos sistemas em estudo. Quanto maior a cauda hidrofóbica menor a área que cada molécula ocupa sob a superfície da água (Yun, 2002). Assim os resultados obtidos para o DMPC (apresenta 12 átomos de carbono na cadeia hidrofóbica), para o DPPC (apresenta 16 átomos de carbono na cadeia hidrofóbica) e para o DAPC (20 átomos de carbono) se encontram com o esperado. A FIG 5.7 ilustra a relação do tamanho da cauda hidrofóbica com a área/molécula.

A FIG 5.7 nos permite observar uma grande variação na área/molécula entre os sistemas DMPC($93 \text{\AA}^2/\text{molec}$)/DPPC($56 \text{\AA}^2/\text{molec}$) e DPPC($56 \text{\AA}^2/\text{molec}$)/DAPC($53 \text{\AA}^2/\text{molec}$). A FIG 5.8 ilustra essa grande diferença entre os sistemas em estudo.

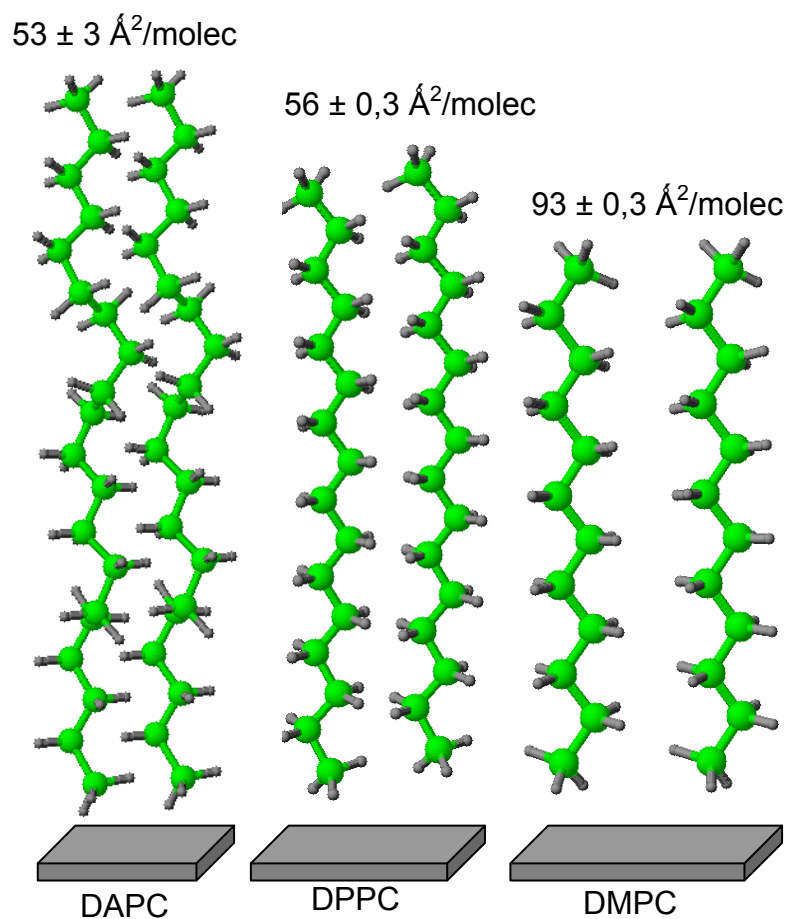


FIGURA 5.7 Ilustração relacionando o tamanho da cadeia hidrofóbica com a área/molécula

Este fato pode ser esclarecido pela temperatura de fusão de cada fosfolípido. A literatura (Collier, 2001) relata que em temperaturas acima da temperatura de fusão a bicamada se apresenta num estado fluído que apresenta uma desorganização maior do que as bicamadas formadas em temperaturas abaixo da temperatura de fusão. Estas se encontram no estado de gel. Em temperaturas próximas à temperatura de fusão ocorre a separação de fases com formação de domínios em gel e fluído.

A temperatura de fusão tende a aumentar com o tamanho da cadeia carbônica. A temperatura de fusão do DMPC e do DPPC foram reportadas como sendo 23 °C e 41°C respectivamente (Collier,2001).

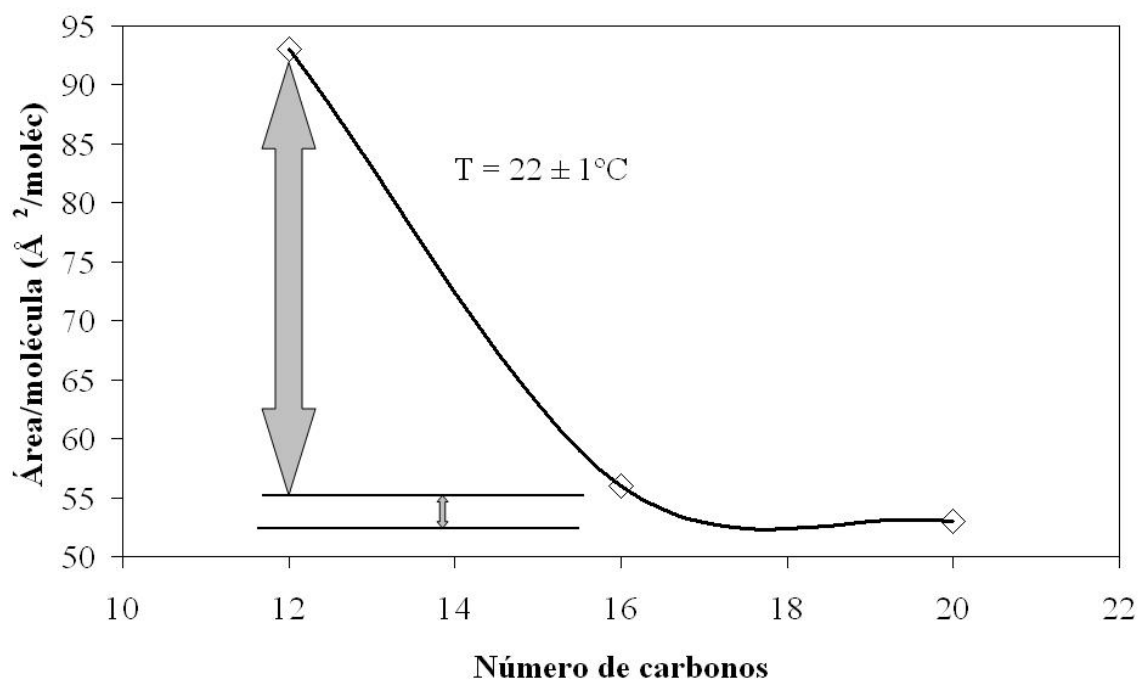


FIGURA 5.8 Efeito do tamanho da cadeia na área/molécula obtida experimentalmente

Como os experimentos foram realizados à $22 \pm 1^\circ\text{C}$ nota-se que houve a formação de domínios de gel e fluído para o DMPC e no caso do DPPC e DAPC a formação da fase fluída. Com isso se explica os valores obtidos para as áreas/molécula para esses sistemas.

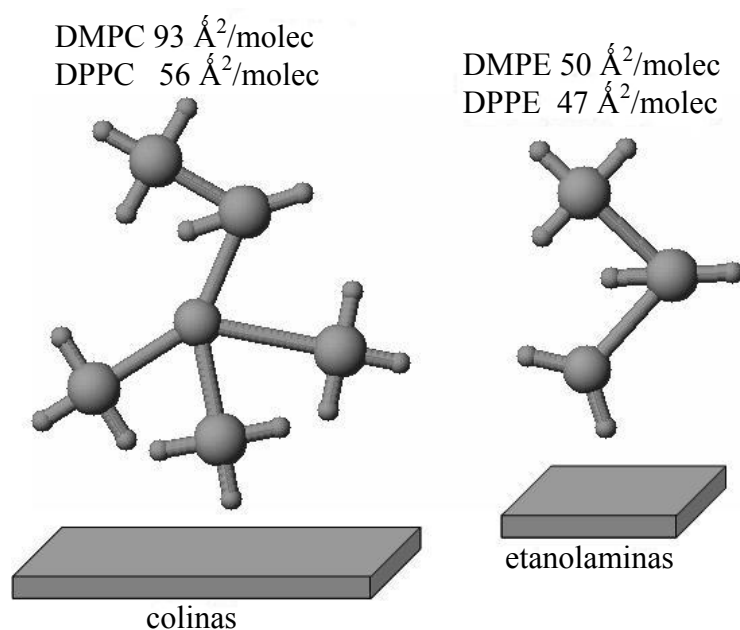


FIGURA 5.9 Ilustração relacionando o grupo cabeça com a área/molécula

A FIG 5.9 ilustra de forma clara o efeito da extremidade hidrofílica na área/molécula obtida nas isotermas experimentais. Pode-se notar que a colina (amina substituída por 3 grupos metila) por ocupar um maior volume no espaço que a etanolamina (amina primária) apresenta maiores áreas por molécula.

Maiores valores de C_s indicam uma monocamada mais flexível (Zhao, 2006). Vale ressaltar que o DMPC apresentou a mais baixa compressibilidade dos sistemas em estudo. Essa baixa compressibilidade indica que a monocamada é rígida e que possivelmente ocorre pouca reorientação das moléculas de DMPC durante a compressão.

5.2 Efeito da adição de colesterol em fosfatidilcolinas

O deslocamento das isotermas para a esquerda (ΔA) ilustrado na FIG 5.10 indica o efeito de compressão do filme observado ao se adicionar colesterol à monocamada fosfolipídica.

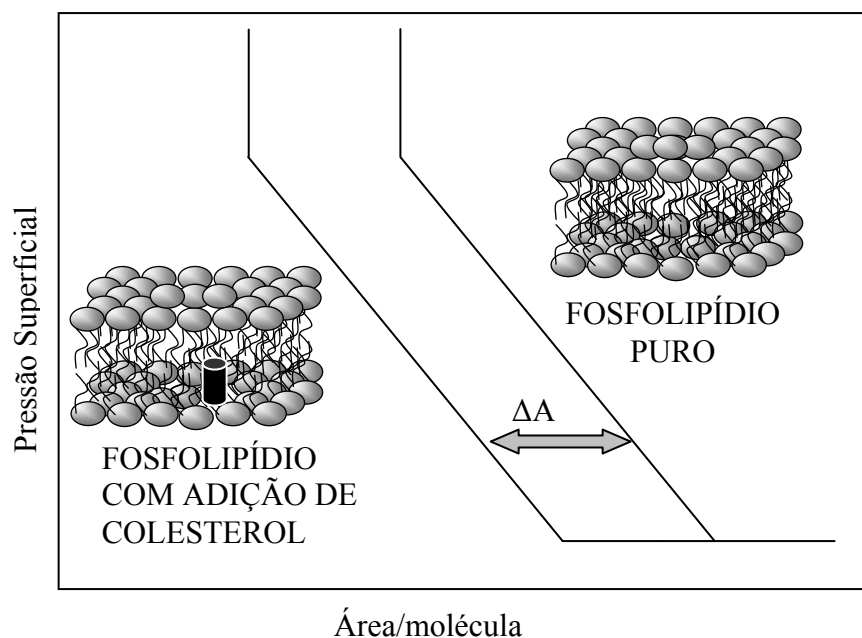


FIGURA 5.10 Esquema ilustrando deslocamento para a esquerda das isotermas de fosfolipídios causado pela adição de colesterol

A TAB 5.2 traz os resultados obtidos para a adição de 10% e 20% mol/mol de colesterol ao DPPC e ao DAPC. Nota-se que a variação encontrada entre os valores experimentais e teóricos apresentou um desvio máximo de 4,0%, indicando conformidade do modelo com a realidade.

Tabela 5.2. Áreas/molécula médias e desvios padrão

Sistema	Média (Å ² /molec)	Desvio Padrão	Área aditiva (Å ² /molec)	Δ(%)	ΔA (Å ² /molec)
DPPC puro	56	0,3	---	---	---
DPPC + COL 10%	43	3,0	44	2,3	13
DPPC + COL 20%	42	0,6	42	0	14
DAPC puro	53	3,0	---	---	---
DAPC + COL 10%	49	1,0	51	4,0	4
DAPC + COL 20%	47	2,0	48	2,0	6

Os resultados indicam conformidade da regra aditiva utilizada no modelamento das isotermas com os resultados experimentais. Esse fato permite se utilizar esse modelamento para se prever áreas/molécula.

As FIG's 5.11 e 5.12 ilustram as isotermas obtidas através do modelamento matemático e as equivalentes encontradas experimentalmente para os sistemas DPPC/COL e DAPC/COL com adição de 10% e 20% de colesterol. Para se facilitar a análise as curvas obtidas experimentalmente para os fosfolipídios estão na cor preta, a curva do colesterol está na cor azul e as curvas obtidas através da regra aditiva se encontram na cor vermelha.

A adição de colesterol teve o efeito de deslocar a isoterma para a esquerda, conforme ilustrado na FIG 5.10. Isso devido ao colesterol se comportar como um defeito na estrutura da camada fosfolipídica criando um campo de tensão no filme. Este campo comprime as caudas hidrocarbônicas dos fosfolipídios e reduz a área por molécula.

Para soluções ideais a variação de volume é desprezível. Em se tratando de monocamadas fosfolipídicas bidimensionais após se adicionar colesterol espera-se inicialmente que a variação da área ocupada por cada molécula fosfolipídica seja nula. Assim a área/

molécula da solução fosfolípido/colesterol pode ser encontrada diretamente da Eq. 4.1 proposta na literatura de forma semelhante à lei de Amagat (Castellan,1975; Wylen,1973). Esta definição mostra que a área/molécula da solução segue uma relação linear entre as áreas/molécula dos constituintes puros.

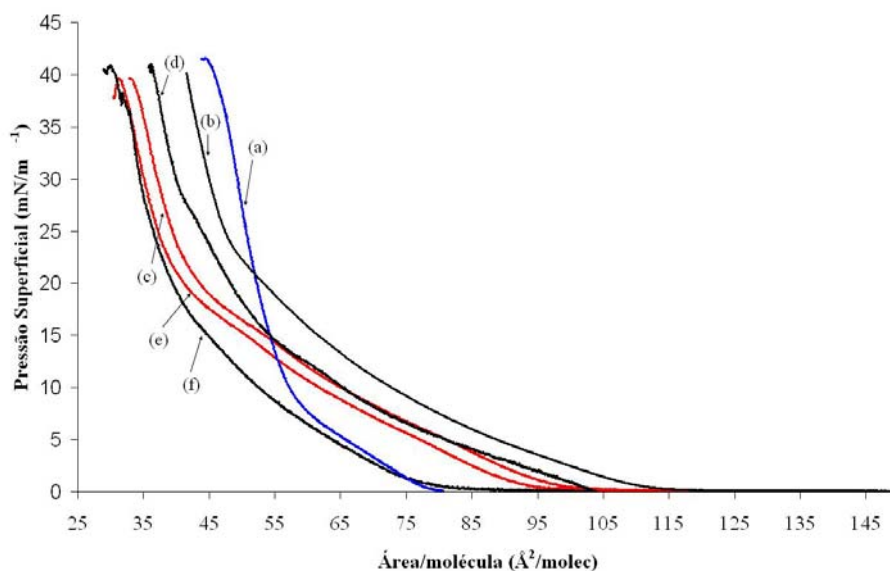


FIGURA 5.11 Isotermas experimentais e aditivas para o sistema DPPC/COL: (a) colesterol; (b) DPPC; (c) DPPC+COL 10% aditiva; (d) DPPC + COL 10% experimental; (e) DPPC + COL 20% aditiva; (f) DPPC + COL 20% experimental.

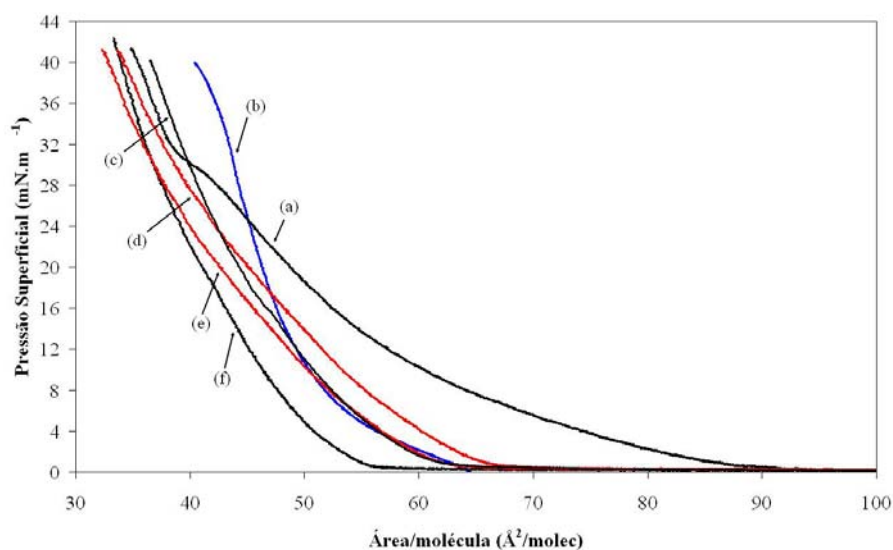


FIGURA 5.12 Isotermas experimentais e aditivas para o sistema DAPC/COL: (a) DAPC + COL 10% experimental; (b) colesterol; (c) DAPC puro; (d) DAPC + COL 10% aditiva; (e) DAPC + COL 20% aditiva; (f) DAPC + COL 20% experimental.

Contudo os resultados experimentais obtidos neste trabalho indicam que ocorre um desvio da idealidade negativo para estas soluções, conforme ilustrado nas Figs. 5.13 e 5.14.

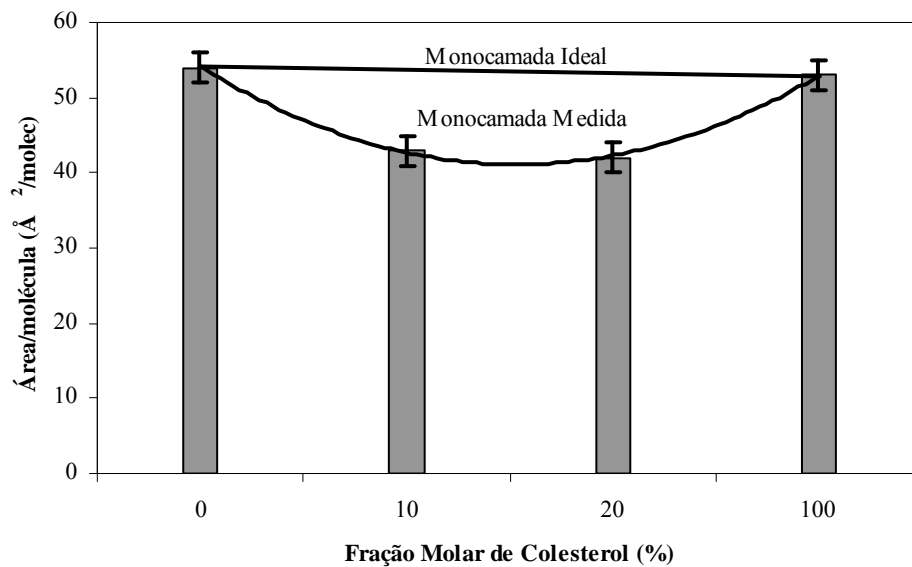


FIGURA 5.13 Diagrama composição-área/molécula para monocamada de DAPC: COL ideal e medida

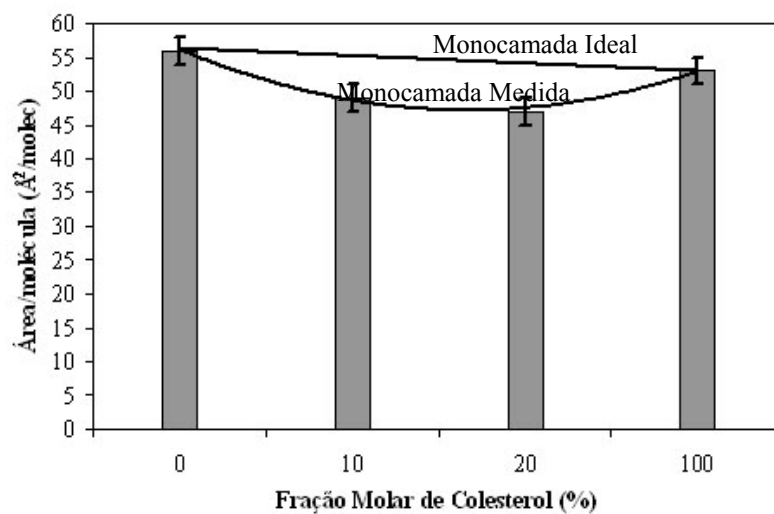


FIGURA 5.14 Diagrama composição-área/molécula para monocamada de DPPC: COL ideal e medida

Neste caso a adição de colesterol às fosfatidilcolinas apresentou um desvio negativo indicando que o colesterol tem uma menor tendência de repulsão em relação a monocamada à que observaríamos numa monocamada ideal de mesma concentração. Assim este desvio negativo indica a existência de interações atrativas entre as duas moléculas na monocamada. Essa menor tendência se deve as forças atrativas entre o colesterol e as fosfatidilcolinas que serão discutidas no capítulo 5.4 e as ligações de hidrogênio discutidas a seguir.

O sistema composto de colesterol em fosfolipídios já é estudado por alguns autores (Sparr, 2002, Chou, 2000; Latka, 2005; Zhao, 2006). A adição de colesterol se mostrou importante para os valores de área/molécula encontrados. Através da FIG 5.9 observa-se que ao se adicionar pequenas quantidades de colesterol aos sistemas (10% e 20%) ocorreram quedas bruscas nos valores encontrados para a área/molécula (Chou, 2000; Latka, 2005; Zhao, 2006). Este fato já era esperado, pois segundo Höltje et al(2001) a molécula de colesterol se posiciona na região hidrofóbica do fosfolipídio e acaba por comprimir todo o sistema.

Este efeito da molécula de colesterol em monocamadas fosfolipídicas pode ser analisado através de estudos recentes (Keller, 2000; Rekilä, 2002) que indicam a possível formação de complexos entre o colesterol e os fosfolipídios. Essa reação de complexação é observada em estudos experimentais (McConnell, 2003) em que a formação de complexos fosfolipídio-colesterol é correlacionada com a temperatura de fusão dos fosfolipídios. Um trabalho (Pandit, 2004) propôs que uma rede de ligações de hidrogênio pode ser formada em bicamadas contendo uma mistura de fosfolipídios e colesterol. Deve-se considerar que esta ligação de hidrogênio formada entre o grupo hidroxila do colesterol e o grupo cabeça dos fosfolipídios tem considerável importância na estrutura da bicamada. De fato, simulações computacionais confirmam a existência dessas ligações de hidrogênio (Miao, 2002). No entanto, a consideração da ligação de hidrogênio envolvendo átomos de hidrogênio do colesterol e átomos de oxigênio dos fosfolipídios, conforme ilustrado na FIG 5.15, são válidas somente em situações onde o colesterol se comporta como o doador de elétrons e o fosfolipídio como um receptor de elétrons.

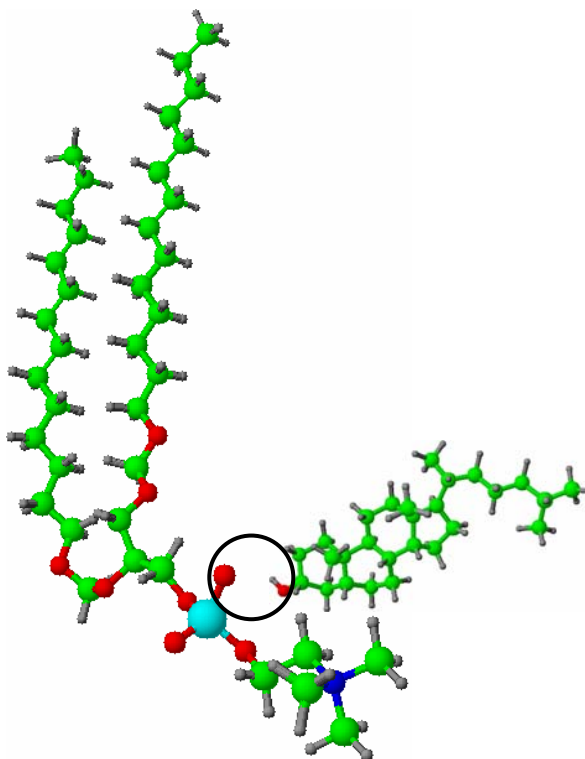


FIGURA 5.15 Ilustração da ligação convencional de hidrogênio entre DPPC e colesterol

Embora este fato possa explicar a formação de complexos 1:1, a descrição e a prováveis características da maioria dos complexos exige a consideração de que o colesterol se comporta como um receptor e o fosfolipídio como um doador. Isto é possível quando há interação entre os átomos de hidrogênio do grupo metil da colina e o átomo de oxigênio da hidroxila do colesterol (Anderson, 2000) conforme ilustrado na FIG 5.16. Este tipo de ligação de hidrogênio é mais fraca que a convencional $\text{OH}\cdots\text{O}$. No entanto estudos de química quântica da ligação de hidrogênio $\text{CH}\cdots\text{O}$ revelam que ela apresenta características de força e direção semelhantes a ligação $\text{OH}\cdots\text{O}$. Além disso, a literatura (Pandit,2004) mostrou que a força da interação $\text{CH}\cdots\text{O}$ aumenta substancialmente com a adição de grupos de elétrons livres no carbono do átomo doador. Com isso o grupo colina presente no DPPC garante que seus grupos metil possam interagir fortemente com o grupo hidroxila do colesterol. Estas ligações de hidrogênio possibilitam o efeito de condensação do colesterol.

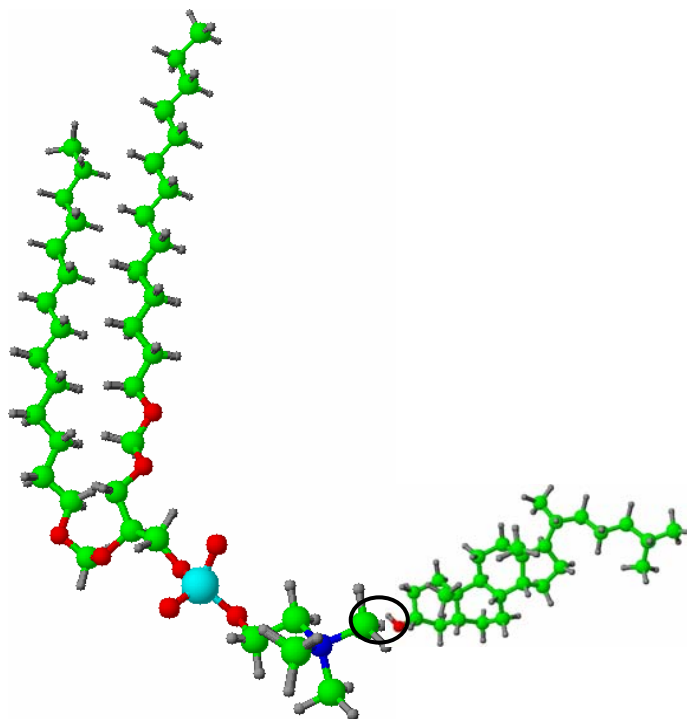


FIGURA 5.16 Ilustração da ligação $\text{CH}\cdots\text{O}$ de hidrogênio entre DPPC e colesterol

No efeito de condensação causado pela adição de colesterol as moléculas de fosfolípido se aproximam mais e ocupam áreas menores na superfície da água se comparadas à situação onde existe ausência de atrações intermoleculares colesterol-fosfolípido. Estes resultados de área/molécula média mostram que a incorporação de colesterol em monocamadas de fosfatidilcolinas altera a organização das moléculas, causando considerável redução na área/molécula média experimental. Assim a tendência geral observada é que o colesterol produza um efeito de condensação em monocamadas de fosfatidilcolinas (Bach, 2003). A FIG 5.16 ilustra de forma esquemática a posição das moléculas na bicamada fosfolipídica sem e com a presença de colesterol. Na FIG 5.17 nota-se que o grupo OH do colesterol tende a se posicionar se orientando com a parte hidrofílica do fosfolípido (Pandit,2004).

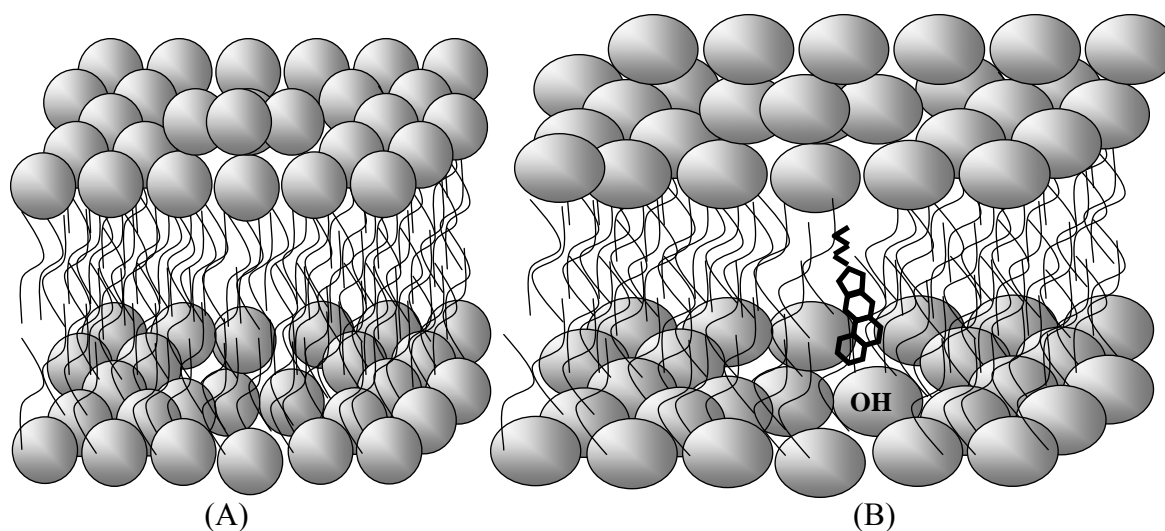


FIGURA 5.17 Posição das moléculas na bicamada fosfolipídica sem (A) e com (B) a presença de colesterol

5.4 Estabilidade Termodinâmica

A interação entre moléculas diferentes nas misturas DPPC: COL (9:1 mol/mol) e DPPC:COL (8:2 mol/mol) pode ser examinada pela análise quantitativa da área em excesso (A_{ex}). Quando os 2 componentes são completamente imiscíveis ou formam uma mistura ideal, a A_{ex} será igual a zero (Berring, 2005; Chou, 2000; Lee, 2005). As FIGs 5.18 e 5.19 mostram a A_{ex} das misturas de composição em estudo para pressões superficiais de 0 mN/m a 42 mN/m. As curvas obtidas estão na cor preta para a incorporação de 10% de colesterol à monocamada fosfolipídica e na cor vermelha para a incorporação de 20% de colesterol à monocamada.

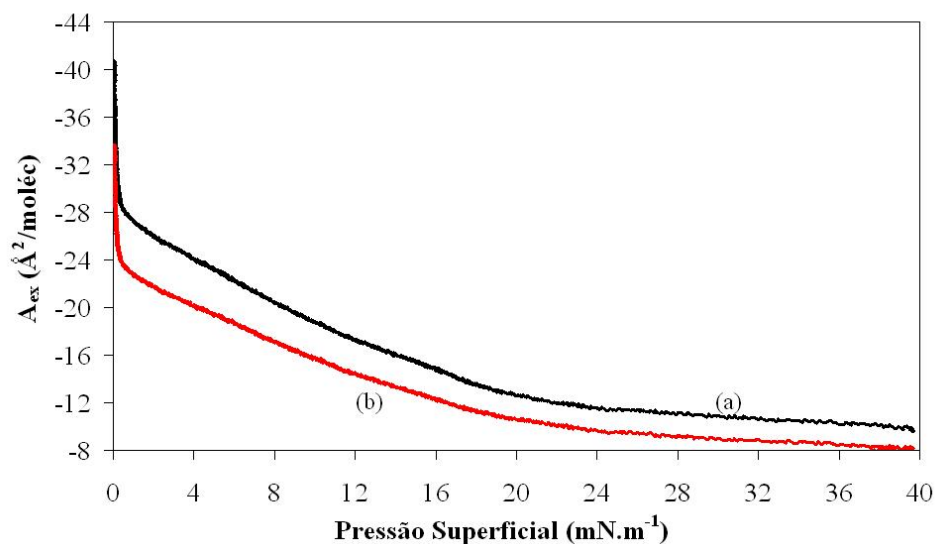


FIGURA 5.18 Área em excesso para os sistemas (a) DPPC+COL 10% e (b) DPPC+COL 20%

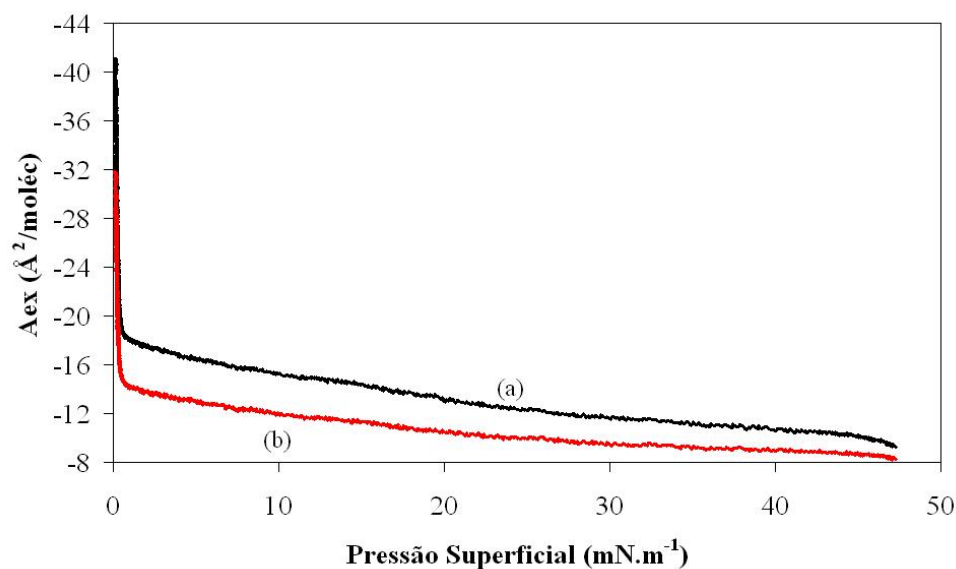


FIGURA 5.19 Área em excesso para os sistemas (a) DAPC+COL 10% e (b) DAPC+COL 20%

Valores negativos para a A_{ex} são observados em toda a faixa de pressões superficiais analisada, indicando que ocorrem interações atrativas entre os dois componentes (Chou, 2000). Este resultado é um indício de que soluções de COL em DPPC e DAPC são miscíveis na monocamada em água deionizada de pH 6 (Gong, 2002). A tendência geral de condensação do colesterol em monocamadas de DPPC e DAPC é validada por mais este

indício. Além disso, o desvio da idealidade observado variou com a pressão superficial. O desvio mais significativo ocorreu na pressão próxima a 0 mN/m. Conforme a pressão superficial aumentava o desvio se tornava menos significativo. Este resultado é razoável devido ao fato das moléculas estarem mais compactas a altas pressões e o efeito das interações moleculares no empacotamento molecular ser menos significativo.

A variação no excesso de energia livre para os sistemas DPPC e DAPC com adição de 10 e 20% de colesterol em função da pressão superficial esta representada nas FIGs 5.20 e 5.21.

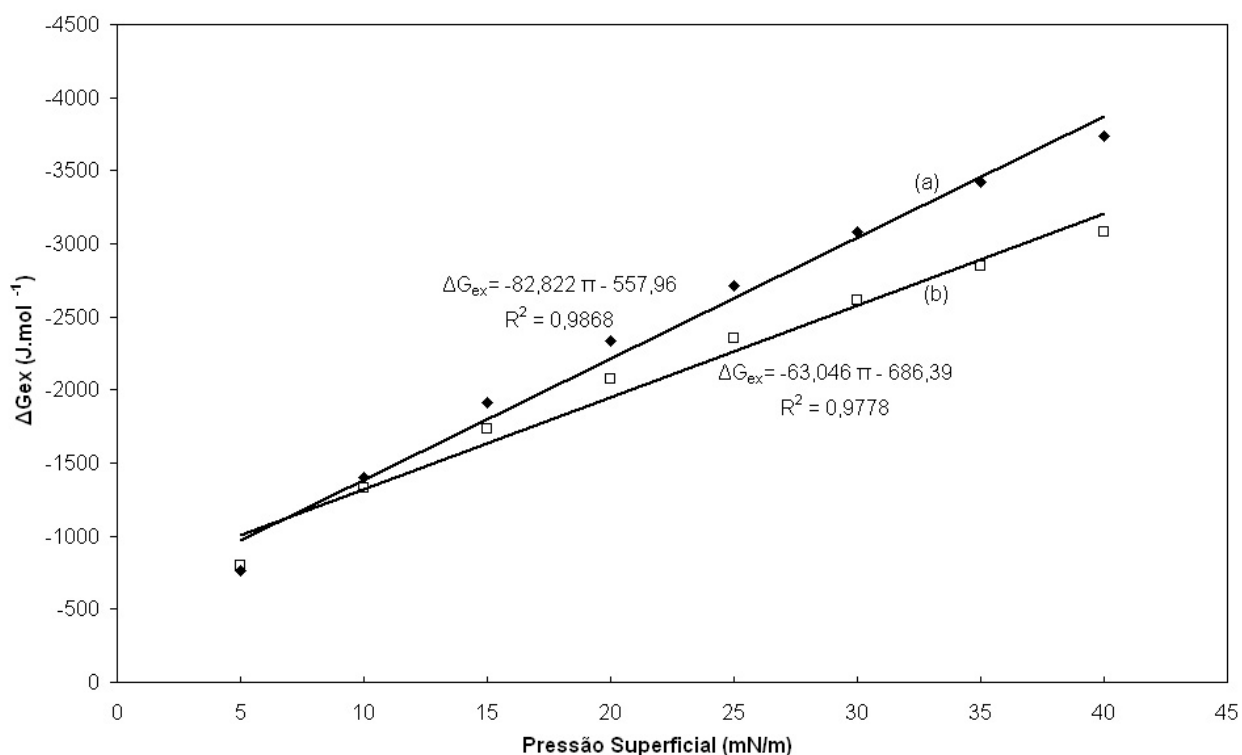


FIGURA 5.20 Excesso de energia livre de mistura como uma função da pressão superficial para (a) DPPC+COL 10% e (b) DPPC+COL 20%

Sendo que ΔG_{ex} é a variação no excesso de energia livre de mistura. Baseado nesta definição, ΔG_{ex} é a contribuição da interação mútua entre moléculas com uma variação em sua energia livre de mistura. Os valores negativos de ΔG_{ex} observados nas Fig's 5.20 e 5.21 sugerem que existe uma interação atrativa entre os dois tipos de moléculas nas monocamadas híbridas (Fang, 2003; Gong, 2002; Latka, 2005). A figura mostra as curvas

de ΔG_{ex} para a adição de 10% e 20% de colesterol aos sistemas de DPPC e DAPC numa faixa de 0mN/m a 40 mN/m. Os valores mínimos ocorrem a pressão de 40 mN/m com a adição de 10% de colesterol para uma subfase de água deionizada com pH 6.

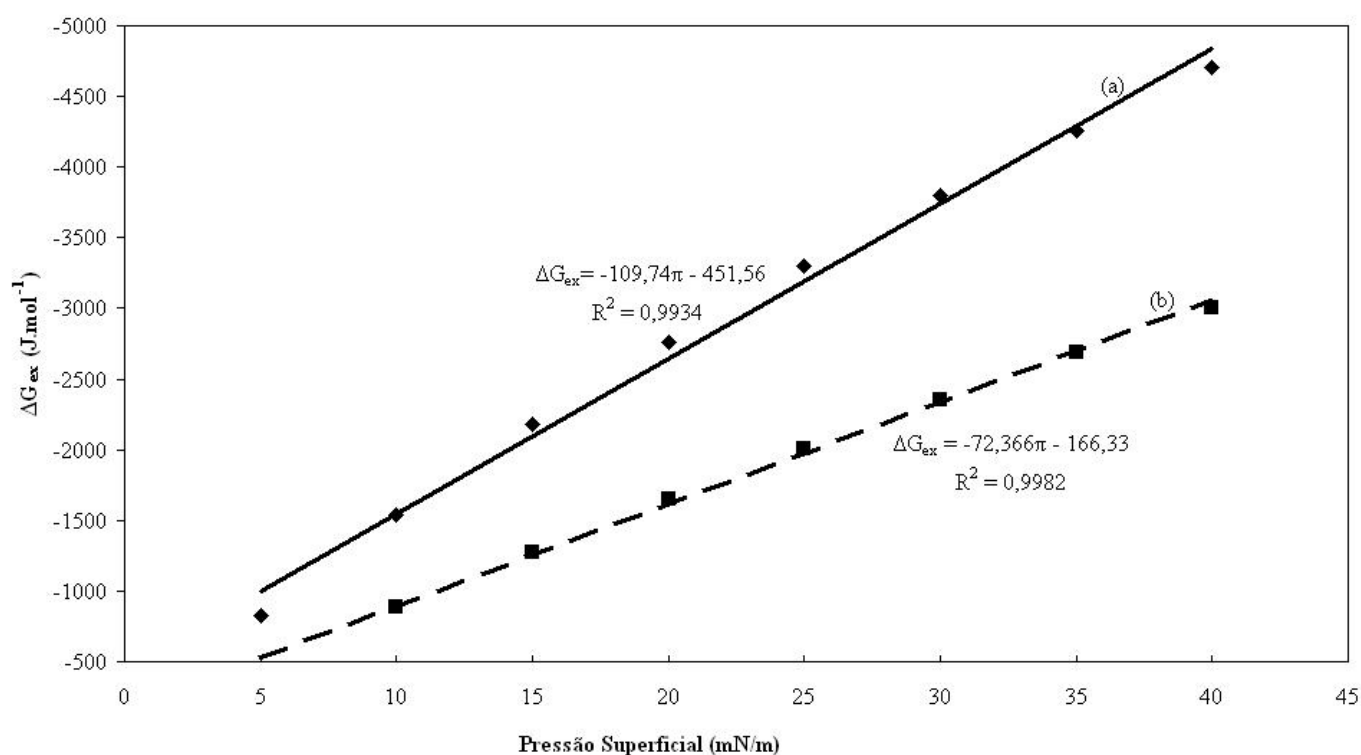


FIGURA 5.21 Excesso de energia livre de mistura como uma função da pressão superficial para (a) DAPC+COL 10% e (b) DAPC+COL 20%

A ocorrência de um mínimo implica que a influência da interação molecular na estabilidade termodinâmica da monocamada é mais significativa na pressão de 40 mN/m e a composição de fosfatidilcolina:colesterol de 9:1 mol/mol. O valor de ΔG_{ex} diminui com o aumento da pressão, pois a interação molecular se torna mais significativa quando as moléculas se encontram num estado mais condensado. O fato de ΔG_{ex} ser menor para uma dada pressão na adição de 10% de colesterol em relação a adição de 20% de colesterol reside no fato do colesterol se solubilizar mais facilmente na monocamada em concentrações mais baixas (Gong, 2002).

5.5 Avaliação da energia gasta para se obter a fase LC à 40 mN.m^{-1} para sistemas puros

Através da integração numérica obtida pelo software Origin 7.0 na faixa de 0 a 40 mN.m^{-1} da região hachurada na FIG 5.22 abaixo, obteve-se a energia que é gasta pelo sistema para que 1 mol de moléculas alcance a fase LC. Ao se comprimir as moléculas fosfolipídicas elas passam por diversas transições de fases nas quais estas vão se posicionando no espaço. Para que estes fenômenos ocorram o sistema consome energia. Ao se expandir as moléculas que foram comprimidas elas voltam a relaxar retornando à condição inicial do sistema. No entanto nem toda energia fornecida ao sistema é conservada, pois parte desta foi gasta durante as transições de fase. Esta energia gasta foi calculada como sendo a região hachurada no gráfico segundo a FIG 5.22 e apresentada na TAB. 5.3.

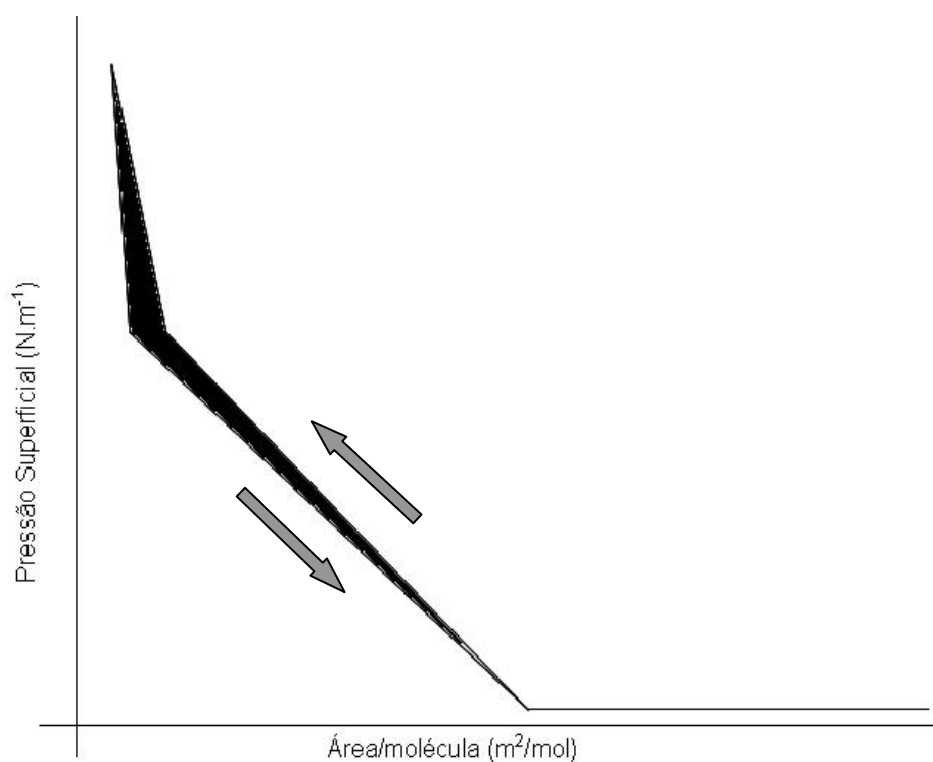


FIGURA 5.22 Ciclo esquemático de expansão/compressão

Os valores obtidos experimentalmente se encontram na TAB. 5.3. Observa-se que há uma necessidade de quantidades maiores de energia para grupos terminais colinas em relação a grupos etalonamina. Isto provavelmente se deve ao tamanho superior encontrado nas

colinas em relação às etalonaminas. O fato de fosfolipídios com cadeias hidrocarbônicas menores apresentarem maior energia para se posicionar na fase LC provavelmente se relaciona com as transições de fase encontradas em cada fosfolipídio.

Tabela 5.3 Energia gasta para se obter a fase LC à 40 mN.m^{-1}

Sistema	Energia (kJ/mol)
DMPC	-12
DPPC	-9
DAPC	-4
DMPE	-6
DPPE	-4

5.6 Incorporação de BSA em DPPC puro e DPPC/COL 20%

A incorporação da proteína BSA foi feita no sistema de DPPC puro e no sistema de DPPC + COL 20%. A FIG 5.23 ilustra os resultados obtidos para o sistema de DPPC+BSA.

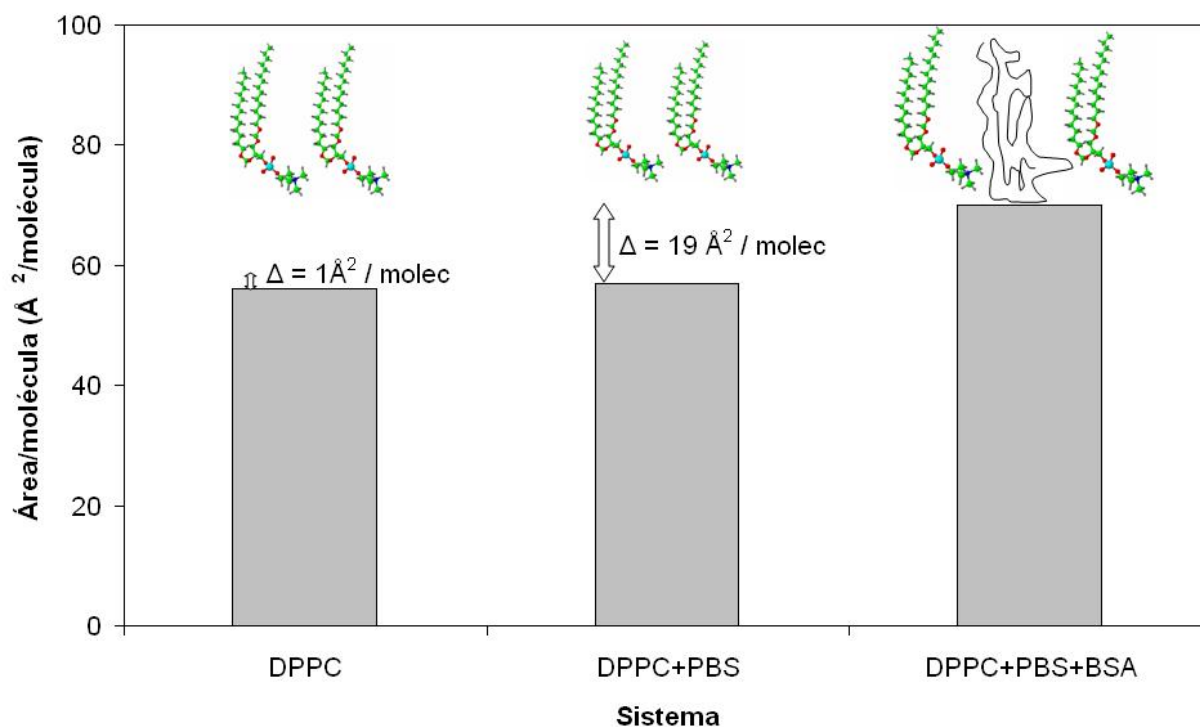


FIGURA 5.23 Efeito da adição de BSA ao sistema de DPPC

Inicialmente se adicionou 10 mL da solução de PBS à subfase visando-se avaliar o efeito dessa solução no sistema em estudo. A FIG 23 nos mostra que o efeito do PBS na área/molécula das moléculas de DPPC é mínimo, obtendo-se uma área/molécula de $57 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para o sistema de DPPC+PBS e $56 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para o sistema de DPPC puro. Em seguida realizaram-se isotermas de compressão para o sistema contendo DPPC+PBS+BSA obtendo-se a área/molécula de $70 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Este valor encontrado para o sistema DPPC+PBS+BSA é um indicativo de que as moléculas de proteínas foram incorporadas da subfase para a monocamada aumentando-se significativamente a área/molécula conforme ilustrado na FIG 23.

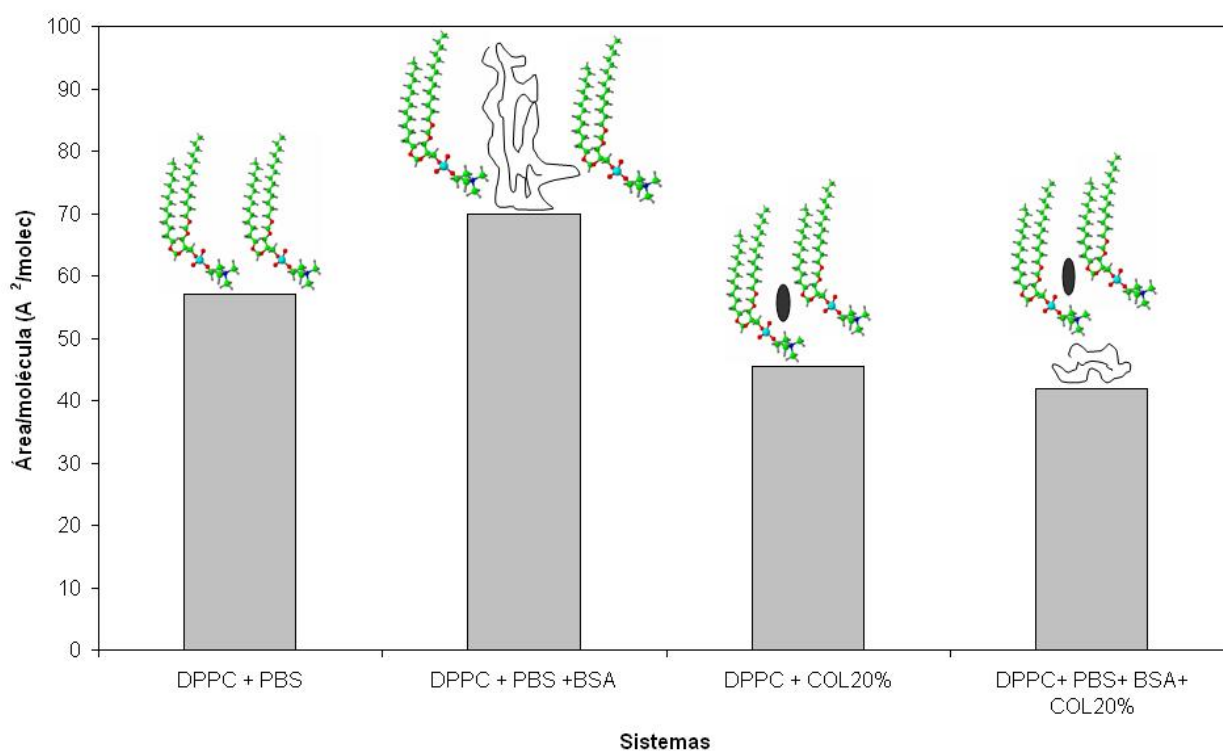


FIGURA 5.24 Efeito da adição de 20% de colesterol em DPPC na incorporação de BSA

A FIG 24 ilustra o efeito da adição de BSA no sistema contendo DPPC+COL20%. A área/molécula encontrada para o sistema DPPC+COL20%+PBS+BSA é muito semelhante àquela obtida para o sistema contendo DPPC+COL20%. Isto nos leva a crer que as ligações convencionais e não-convencionais de hidrogênio formadas entre o colesterol e o DPPC nessa composição de 20% levam a formação de uma rede que impede a proteína de se

mover da subfase para a monocamada. Dessa forma inibindo a incorporação da BSA no filme de DPPC+COL20%.

6. CONCLUSÕES

Os ciclos de compressão/expansão e as isotermas obtidas indicam que as monocamadas se apresentam estáveis e reprodutíveis. Sendo que estas apresentaram forma e valores semelhantes às encontradas na literatura (Andrade, 2005; Lee, 2005).

Os valores encontrados mostram a dependência que existe entre o tamanho da cadeia carbônica com a área/molécula média mostrando que cadeias maiores ocupam uma área menor na superfície da subfase (Collier, 2001).

A adição de colesterol à monocamada fosfolipídica mostrou exercer grande influência na área ocupada pelas moléculas de fosfolipídios. O colesterol apresentou a característica de redução desta área. Indicando a existência de forças atrativas entre as moléculas de colesterol e de fosfolipídios, formando dessa forma redes de ligações de hidrogênio.

Os resultados obtidos através do uso da regra aditiva se mostraram semelhantes aos resultados obtidos experimentalmente. Isso indica que o uso da regra aditiva é uma solução viável para se prever as áreas/molécula para sistemas binários de fosfatidilcolinas com colesterol.

A análise termodinâmica constatou que existem interações atrativas entre as moléculas de colesterol e de DPPC. Além disso, indicou que nas frações molares de 10% e 20% o colesterol se solubiliza na monocamada formando desta forma uma única fase.

A incorporação de BSA em monocamadas fosfolipídicas através de sua adição na subfase se mostrou um processo viável. Pode-se perceber que a incorporação de BSA em monocamadas de DPPC contendo 20% de colesterol foi muito pequena. No entanto a incorporação de BSA em sistemas contendo DPPC puro se mostrou eficaz.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A.W. *Physical Chemistry of Surfaces*. 5^a edition, New York: John Wiley & Sons, Inc, 1990, p.777.

ALMEIDA, P.F.F., POKORNY, A., ET AL., Thermodynamics of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, article in press, 2005.

ANDERSON, T.G., MCCONNELL, H.M. Multiple cholesterol-phospholipid complexes in membranes. *Colloids and Surfaces A*, Vol. 171, 13-23, 2000.

ANDRADE, C.A.S., MAGALHÃES, N.S.S., ET AL., Thermodynamic characterization of the prevailing molecular interactions in mixed floating monolayers of phospholipids and usnic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*, article in press, 2005.

BACH, D., WACHTEL, E. Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1610, 187-197, 2003.

BACH, D., MILLER, I.R. Attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared spectroscopy of dimyristoyl phosphatidylserine-cholesterol mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1514, 318-326, 2001.

BARRY, JOHN MICHAEL, ET AL. *An introduction to the structure of biological molecules*. Englewood Cliffs: c1969. 190p.

BERRING, E.E., BORRENPOHL, K. ET AL. A comparison of the behavior of cholesterol and selected derivatives in mixed sterol phospholipid Langmuir monolayers: a fluorescence microscopy study. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol 136, 1-12, 2005

BYKOV, V.A. Langmuir-Blodgett films and nanotechnology. *Biosensors and Bioelectronics*, V.11, No 9, 923-932, 1996.

CASTELLAN, G.W. *Físico-Química*. 1^a edição, Volume 1, Livros Técnicos e Científicos, 1975, p.489.

CHOU, T.H., CHANG, C.H., Thermodynamic behavior and relaxation processes of mixed DPPC/cholesterol monolayers at the air/water interface. *Colloids and Surfaces B*, Vol. 17, 71-79, 2000.

CHUNG, S. Permeation of Ions Across the potassium channel: Brownian Dynamics Studies. *Biophysical Journal*, Vol.77, 2517-2533, 1999.

COLLIER, J.H., MESSERSMITH, P.B., Phospholipid strategies in biomineralization and biomaterials research, *Annu. Rev. Mater. Res.*, Vol 31, 237-263, 2001.

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

DAVIS,F., HIGSON,S.P.J. Structured thin films as functional components within biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol 21, 1-20, 2005.

DE ROBERTIS, PATRICIO, E.D., *Bases da biologia celular e molecular*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2001. 418p.

DEBANNE,D. Brain plasticity and ion channels. *Journal of Physiology*, Vol 97, 403-414, 2003.

DIAKOWSKI, W., OZIMEK, L., ET AL., Cholesterol affects spectrin-phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in a membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1758, 4-12, 2006.

DIAZ,M.E., CERRO,R.L. On the effect of subphase pH and counterions on transfer ratios and dynamic contact angles during deposition of multiple Langmuir–Blodgett monolayers, *Thin Solid Films*, Vol. 485, 224-229, 2005.

DIOCIAIUTI,M., BORDI,F., ET AL., Aggregation of Gramicidin A in Phospholipid Langmuir–Blodgett Monolayers. *Biophysical Journal*, Vol. 82, 3198-3206,2002

DOMÉNECH, Ò., MONTERO, S.M., ET AL., Surface planar bilayers of phospholipids used in protein membrane reconstitution: An atomic force microscopy study. *Colloids and Surfaces B*, Vol. 47, 102-106, 2006.

DUTRA, R.A.F. *Biossensores.II* Curso de Imobilização de proteínas em suportes sólidos. In: Recife, Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000, 90p.

EGGINS,B.R. *Biosensors An Introduction*. Chichester:John Wiley & Sons,1997,p.212.

EPAND,R.M. Do proteins facilitate the formation of cholesterol-rich domains? *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1666, 227-238, 2004

FAGNI,L. BOCKAERT,J. Effects of nitric oxide on glutamate-gated channels and other ionic channels. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 10, 231-240, 1996.

FANG, K., ZOU,G., ET AL., Thermodynamic characterization of mixed monolayers of phosphatidylcholine and arachidic acid on different subphases. *Colloids and Surfaces A*, Vol. 224, 53-63, 2003.

FOGLER, H.S., *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*, 3ª edição, Rio de

Janeiro: LTC editora, 2002, p.892.

FUJI KEIJAI COMPANY, disponível em: www.fuji-keizai.com/e/report/biossensor2004_e.html, último acesso em:02/07/2005

GALLEGOS, A.M. ET AL Structure and cholesterol domain dynamics of an enriched caveolae/raft isolate. *Biochemical J.* , Vol 382, 451-461, 2004.

GAROFOLIS, S. JORDAN, P.C. Modeling Permeation Energetics in the KcsA Potassium Channel. *Biophysical Journal*, Vol. 84, 2814-2830, 2003.

GIESSIBL, F.J. AFM's path to atomic resolution. *Materials Today*, 32-41, maio de 2005.

GLASMÄSTAR, K, LARSON.C., ET AL., Protein Adsorption on Supported Phospholipid Bilayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 246, 40-47, 2002

GONG,K., FENG,S.S., ET AL., Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A*, Vol. 207, 113-125, 2002

GÖPEL,W.,HEIDUSCHIKA,P. Interface analysis in biossensor design. *Biosensors & Bioelectronics*, Vol 10, 853-883,1995.

HAN,K. Effect of subphase divalent ions on optical second harmonic properties of hemicyanine Langmuir-Blodgett films interleaved with compatible spacer, *Thin Solid Films*, Vol.476, 152– 156, 2005.

HANDELEY,J. Product Review- Quartz Crystal Microbalances. *Anal. Chem.A- Pages*, 225-229,2001

HATTAB,N.E., DAGHBOUCHE,Y., ET AL., FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC. *Talanta*, Vol. 68, 1230-1235, 2006.

HIDALGO,A.A., TABAK,M., OLIVEIRA JR., O.N. The interaction of meso-tetraphenulporphyrin with phospholipid monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol 134, 97-108, 2005

HISHIDA, N., SETO,H., ET AL., Stacking structures of dry phospholipid films on a solid substrate. *Colloids and Surfaces A*, Vol. 284-285, 2006.

HÖLTJE,M., FÖRSTER,T., ET AL., Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1511, 156-167, 2001

JENSEN,M.,MOURITSEN,O.S. Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1666, 205-226,2004.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ,J.H., JESSEL, T.M. *Principles of Neural Science*.4^a edition, New York: MacGraw-Hill, 2000,p.1414.

KELLER, C.A., KASELMO, B. Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophysical Journal*. Vol. 75, 1397-1402,1998

KELLER, S.L., RADHAKRISHNAN, A., MCCONNELL, H.M. Saturated Phospholipids with high melting temperatures form complexes with cholesterol in monolayers. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 104, 7522-7527, 2000.

KLOPFER, K.J. VANDERLICK, T.K. Isotherms of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers: features revealed and features obscured. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol 182, 220-229, 1996

KOL,M.A., KRUIJFF,B., KROON,A.I.P.M. Phospholipid flip-flop in biogenic membranes:what is need to connect opposite sides. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Vol. 13, 163-170, 2002

KÓTA,Z. , PÁLI,T. , MARSH,D. Orientation and Lipid-Peptide Interactions of Gramicidin A in Lipid Membranes: Polarized Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy and Spin-Label Electron Spin Resonance. *Biophysical Journal* , Vol 86, 1521-1531, 2004

LATKA, P.D., WYDRO, K.H. Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol.37, 21-25, 2005.

LATKA,P.D., Dhanabalan,A., ET AL Modern physicochemical research on Langmuir Monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol 91, 221-293, 2001.

LATKA,P.D., WYDRO,K.H., Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface. *Colloid and Surfaces B*, Vol 37, 21-25, 2004.

LAUGEL,C.,YAGOUBI,N.,BAILLET,A., ATR-FTIR spectroscopy: a chemometric approach for studying the lipid organization of the stratum corneum. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 135, 55-68, 2005.

LEHNINGER.A.L. *Bioquímica Vol 1*. 2^a edição, São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA,1976, p.262

LONDON, E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1746, 203-220, 2005

MAFÉ, S., MANZANARES, J.A., KONTTURI, K., Phospholipid monolayers at water/oil interfaces modelling of surface pressure-molecular area isotherms. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 457, 155-162, 1998.

MANSUR, H.S. *Notas de aula Caracterização de Materiais e Interfaces*, CPGEM, DEMET, UFMG, 2004.

MANSUR, H.S., OLIVEIRA, J.E., MANSUR, A.A.P. Phospholipids Molecular Films obtained by Langmuir-Blodgett Method Investigated by Fourier Infrared Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance. In: *2005 Materials Research Society Spring Meeting*, 2005, San Francisco - CA-USA. Proceedings: Symposium M, Developing Nano-Bio Interfaces, Vol. 820, p. 336-336, 2005.

MARQUES, M.E. *Instalação, configuração, padronização e caracterização de equipamento de deposição de filmes moleculares de Langmuir-Blodgett*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2003, 77p (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, área de concentração: Engenharia de Materiais).

MCCONNELL, H.M., RADHAKRISHNAN, A. Condensed Complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1610, 159-173, 2003.

MERINO, S., DOMÈNECH, Ò, ET AL, Surface thermodynamic properties of monolayers versus reconstruction of a membrane protein in solid-supported bilayers. *Colloids and Surfaces B*, Vol. 44, 93-98, 2005.

MEUSE, C.W. KRUEGER, S., ET AL, Hybrid Bilayer Membranes in air and water: infrared spectroscopy neutron reflectivity studies. *Biophysical Journal*, Vol. 74, 1388-1398, 1998.

MIAO, L., NIELSEN, M., ET AL. From lanosterol to cholesterol structural evolution and differential effects on lipid bilayers. *Biophysical Journal*, Vol. 82, 1429-1444, 2002.

MIÑONES, J.J.R., PATINO, J.M.R., ET AL The effect of polar groups on structural characteristics of phospholipid monolayers spread at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A*, Vol 203, 273-286, 2002

MONKMAN, G., Monomolecular langmuir Blodgett films- tomorrow's sensors? *Sensors Review*, Vol. 20, No 2, 127-131, 2000

NAKAHARA, H., NAKAMURA, S., ET AL, Celebroside Langmuir monolayers originated from the echinoderms I. Binary systems of celebrosides and phospholipids.

Colloids and Surfaces B, Vol.42, 157-174,2005.

NAKAYA, T., LI, Y.J. Phospholipids polymers. *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 24, 143-181, 1999.

O'SULLIVAN, C.K. GUILBAULT, G.G. Commercial quartz crystal microbalances- theory and applications. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol.14, 1999, 663-670.

OHTA, Y. YOKOYAMA, S., ET AL. Membrane properties of binary and ternary systems of ganglioside GM1/ dipalmitoylphosphatidylcholine/ dioleoylphosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol.34, 147-153, 2004.

PANDIT, S.A., BOSTICK, D., BERKOWITZ, M.L. Complexation of Phosphatidylcholine lipids with Cholesterol. *Biophysical Journal*, Vol. 86, 1345-1356, 2004.

PATERNO, L.G., MATTOSO, L.H.C., OLIVEIRA, O.N. Filmes Moleculares Ultrafinos Produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Química Nova*, Vol. 24, No 2, 228-235, 2001.

PENG, J.B., BARNES, G.T., GENTLE, I.R. The structure of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol.91, 163-219, 2001

PIKE, L.J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: An evolving story. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1746, 260-273, 2005

POHLE, W. ET AL Comparative FTIR spectroscopic study upon the hydration of lecithins and cephalins. *Journal of Molecular Structure*, Vol 408/409, 273-277, 1997

RABOCKAI, T. *Físico-Química de Superfícies*. São Paulo: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, p.128, 1979.

RAMSTEDT, B., SLOTTE, J.P. Interaction of Cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: A comparative study of the effect of the chain length. *Biophysical Journal*, Vol. 76, 908-915, 1999

REGEV, R. HAYON, D.Y., ET AL Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 70, 161-169, 2005.

REKILÄ, H.O. RAMSTEDT, B., ET AL. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, Vol. 41, 66-97, 2002.

RINIA, H.A., DEMEL, R.A., ET AL, Blistering of Langmuir Blodgett Bilayers Containing Anionic Phospholipids as Observed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, Vol 77, 1683-1693, 1999

ROBERTS,G. *Langmuir-Blodgett Films*. 1ª edition, New York: Plenum Press, 1990, p.425.

RÓG,T., GIERULA,M.P. Cholesterol Effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: A molecular simulation study. *Biophysical Journal*, Vol. 81, 2190-2202, 2001

SCHERFELD,D.KAHYA,N.SCHWILLE,P. Lipid Dynamics and Domain Formation in Model Membranes Composed of ternary mixtures of insaturated and saturated phosphatidcholines and cholesterol. *Biophysical Journal*, Vol.85, 3758-3768, 2003.

SERFIS, A.B., BRANCATO,S., FLIESLER,S.J., Comparative behavior of sterols in phosphatidylcholine-sterol monolayer films. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1511, 341-348, 2001.

SHAW, D.J. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, p.185, 1975.

SILVA, C.G. *O que é nanotecnologia?* disponível em:
www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano10.htm , último acesso em:04/08/2005

SILVA,L.B.J. *Preparação e caracterização da blenda condutora de Polianilina-Poli(metacrilato de hidroxietila) e sua interação com biomacromoléculas*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2002,87p (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, área de concentração:Engenharia de Materiais)

SILVERSTEIN,R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Rio de Janeiro:Guanabara Dois, p.299,1979.

SILVERSTEIN,R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Rio de Janeiro:Guanabara Dois, p.299,2000.

SOUSA,C.F. *Estudo da localização de pireno em bicamadas de fosfolipídios usando difração de raios X*. Campinas:Instituto de Física, UNICAMP,1984,p.68 (Dissertação, Mestrado em Física)

SOUZA, N.C., CAETANO,W., ET AL, Interaction of small amounts of bovine serum albumin with phospholipid monolayers investigated by surface pressure and atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 297, 546-553, 2006.

SPARR, E. HALLIN, L., ET AL Phospholipid-Cholesterol Bilayers under osmotic stress. *Biophysical Journal*, Vol 83, 2015-2025, 2002

TAGAMI, Y., IKIGAI, H., OISHI, Y. AFM observations of (DMPC/cholesterol) mixed monolayer on aqueous solution of *Vibrio Cholerae* hemolysin. *Colloids and Surfaces A*, article in press, 2005.

ULMAN, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*. San Diego: Academic Press, p.442, 1991.

VAN WYLEN, G.J., SONNTAG, R.E. *Fundamentos da Termodinâmica Clássica*. 1ª edição, Edgard Blücher, 1973, p.616.

VITOVIC, P., KRESÁK, S., ET AL The study of the interaction of a model α -helical peptide with lipid bilayers and monolayers. *Bioelectrochemistry*, Vol 63, 169-176, 2004

WALLACE, B.A. Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *Journal of Structural Biology*, V.121, 123-141, 1998

WEIDEMANN, G., VOLHARDT, D. Long range tilt orientational order in phospholipid monolayers: a comparison of the order in the condensed phases of dimyristoylphosphatidylethanolamine and dipalmitoylphosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces A*, Vol. 100, 187-202, 1995.

WOLFBEIS, O.S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.*, Vol 74, 2663-2673, 2002.

YUN, H. ET AL. Physicochemical Properties of Phosphatidylcholine (PC) monolayers with different alkyl chains, at the air/water interface. *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 24, No 3, 377-383, 2003.

ZHAI, X., KLEIJIN, J.M. Molecular structure of dipalmitoylphosphatidylcholine Langmuir-Blodgett monolayers studied by atomic force microscopy. *Thin Solid Films*, Vol 304, 327-332, 1997.

ZHAO, L., FENG, S.S., Effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipids within the lipid monolayer at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, article in press, 2006.