

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA



JADILSON MEDEIROS DO NASCIMENTO FILHO

Avaliação termodinâmica de filmes mistos compostos por
***trans*-desidrocrotonina e fosfolipídios**

Recife - PE

2010

JADILSON MEDEIROS DO NASCIMENTO FILHO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA



**Avaliação termodinâmica de filmes mistos compostos por
trans-desidrocrotonina e fosfolipídios**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para obtenção
do Título de Mestre em Inovação
Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Recife - PE

2010

Nascimento Filho, Jadilson Medeiros

Avaliação termodinâmica de filmes mistos compostos por trans-desidrocrotononina e fosfolípidios / Jadilson Medeiros Nascimento Filho.

– Recife: O Autor, 2011.

57 folhas : il., fig., tab.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade

Co-Orientador: Celso Pinto de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação terapêutica, 2010.

Inclui bibliografia e apêndice

1. Fosfolípidios 2. Termodinâmica 3. Plantas medicinais I. Título.

572.57

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-135

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Nascimento Filho, Jadilson Medeiros do Nascimento Filho.

Título: Avaliação termodinâmica de filmes mistos compostos por *trans*-desidrocrotonina e fosfolípidios

Dissertação de mestrado apresentado à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 09/09/2010

Banca Examinadora

Titulares

Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico Recife
(UFPE/CAV)

Assinatura: Nereide Stela Santos Magalhães

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória
(UFPE/CAV)

Assinatura: Emerson Peter da Silva Falcão

Prof.^a Dr.^a Noêmia Pereira da Silva Santos

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória
(UFPE/CAV)

Assinatura: Noêmia Pereira da Silva Santos

*Dedico esta Dissertação
aos meus Pais e familiares.*

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador e Doutor, César Augusto Souza de Andrade, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho de dissertação de mestrado com a finalidade de obtenção do grau de Mestre pela Universidade Federal de Pernambuco, e que também sempre esclareceu minhas dúvidas sobre o tema proposto.

Ao Prof. Dr. Celso Pinto de Melo, coordenador do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais onde desenvolvi a maior parte do projeto, ao qual agradeço pela contribuição na elaboração da dissertação.

A Clécio Gomes, técnico e orientando do Prof. Celso Pinto de Melo pela paciência e por tirar as dúvidas dos experimentos quando surgiam.

A todos os integrantes do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais – PNC uma vez que estão sempre presentes, e sempre que tenho dúvidas pergunto a melhor maneira de realizar os experimentos e também pela conversas do dia a dia e brincadeiras.

A Prof.^a Maria Aparecida Medeiros Maciel da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN por fornecer a trans-Desidrocrotonina (t-DCTN).

A todos os professores que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica por terem me passado muitos conhecimentos, os quais foram adquiridos com o decorrer do tempo e que vieram a me engrandecer como pessoa e como profissional pesquisador.

Aos amigos e colegas ingressantes do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica em 2008 que estavam sempre por perto em todos os momentos.

Aos meus Pais e à minha Irmã, que foram e sempre serão muito importantes para mim, me orientando, me ensinando e sempre me dando força para atingir meus ideais e sonhos.

À toda a minha família, amigos e vizinho com quem convivi e convivo até hoje, por torcerem sempre por mim nas “batalhas” da vida.

E por fim, a Deus, por ter aberto portas e caminhos, me iluminando sempre na realização deste trabalho de dissertação.

EDUCAR

“Educar é mostrar a vida
a quem ainda não a viu.
O educador diz: “Veja!”
- e, ao falar, aponta.
O aluno olha na
direção apontada e
vê o que nunca viu.
Seu mundo
se expande.
Ele fica mais
rico interiormente...”
“E, ficando mais rico interiormente, ele
pode sentir mais alegria
e dar mais alegria -
que é a razão pela
qual vivemos.”

(...)

(Rubem Alves)

RESUMO

NASCIMENTO FILHO, J. M. - Avaliação termodinâmica de filmes mistos compostos por *trans*-desidrocrotonina e fosfolipídios. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A técnica de preparação de filmes interfaciais, denominado com filmes de Langmuir ou monocamadas flutuantes, vem sendo utilizada para elucidar características de interação molecular entre lipídios e fármacos. Portanto, o domínio dessa técnica é de suma importância para avaliação das características físico-químicas das interações entre as moléculas a serem dispersas na interface água-ar, o que permite, por exemplo, elucidar a possível interação de *Trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em sistema de liberação controlada, como o lipossoma, sistema composto por fosfolipídios. O *t*-DCTN é uma molécula (19-nor-diterpeno) extraído do *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), uma planta nativa da região amazônica conhecida como cajucara ou sacaca. Entre as aplicações desta planta, os chás preparados das folhas e cascas do caule de *C. cajucara* têm sido comumente utilizados na medicina popular devido as suas ações terapêuticas, tais como, hipoglicemiante e hipolipidêmica, e sua potencial ação como antitumoral, antimutagênico e antiinflamatório. O comportamento termodinâmico das monocamadas flutuantes mistas dos fosfolipídios zwitteriônicos D,L- α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, C16:0), L- α -dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC, C22:0), L- α -dioleilfosfatidilcolina (DOPC, C18:1) e *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) a diferentes frações molares (x) do diterpeno (*t*-DCTN) tem sido investigado através de isotermas de Langmuir por meio de medidas de pressão e potencial de superfície. Excesso de energia livre de Gibbs da mistura tem sido calculado para diferentes composições da monocamada flutuante a diversos valores de pressão de superfície. O espalhamento das moléculas puras de *t*-DCTN na interface ar-água resulta numa isoterma do tipo condensada e uma pressão máxima lateral igual a 15 mN/m, sendo registrada uma diferença de ΔV com o decorrer da compressão lateral da monocamada. Para os sistemas binários *t*-DCTN/DBPC e *t*-DCTN/DOPC, o máximo de estabilidade foi obtida a $x_{t\text{-DCTN}} = 0,375$ e 0,500 a pressão de superfície de 15 mN/m, com um valor mínimo de ΔG^M igual a -1,7 kJ/mol. As análises dos parâmetros termodinâmicos obtidos tais como, área em excesso, energia livre em excesso e energia livre da mistura confirmaram a miscibilidade dos sistemas binários constituídos por fosfolipídios e *t*-DCTN. Dentre os sistemas binários analisados, o sistema binário composto por *t*-DCTN/DOPC foi o que demonstrou maior estabilidade das monocamadas na interface por apresentarem desvios negativos mais significativos de energia livre de mistura (ΔG^M). Nas monocamadas mistas, as moléculas de fosfolipídios parecem exibir um alto grau de ordenamento na orientação das moléculas dispersas na interface principalmente para valores intermediários de frações molares de *t*-DCTN. As observações acima sugerem que as moléculas de *t*-DCTN exercem um efeito de condensação nas monocamadas mistas de fosfolipídios.

Palavras-chave: Filmes de Langmuir, *trans*-desidrocrotonina, fosfolipídios, termodinâmica.

ABSTRACT

NASCIMENTO FILHO, J. M. - Thermodynamic investigation of mixed monolayers of trans-dehydrocrotonin and phospholipids. 2010. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The preparation technique of interfacial films, called with Langmuir film or monolayer floating, has been used to elucidate features of molecular interaction between lipids and drugs. Therefore, domain this technique is of paramount importance to evaluating the physical-chemical interactions between molecules dispersed in the air-water interface, which allows, for example, to elucidate the possible interaction of Trans-dehydrocrotonin (t-DCTN) in controlled release system, such as liposome, system composed of phospholipids. The t-DCTN is a terpenoid molecule (19-nor-diterpene) extracted from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), a native plant from the Amazon region known as cajucara or sacaca. Among other applications of this plant, teas prepared from the *C. cajucara* leaves and stem-bark have been commonly used in popular medicine due to its therapeutic actions as hypoglycemic and hypolipidemic, and its potential as an antitumoral, antimutagenic and anti-inflammatory agent. The thermodynamic behavior of mixed floating monolayers of zwitterionic phospholipids D,L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, C16:0), L- α -dibehenoylphosphatidylcholine (DBPC, C22:0), L- α -dioleoylphosphatidylcholine (DOPC, C18:1) and trans-dehydrocrotonin (t-DCTN) at different molar fractions (x) of the diterpene has been investigated by measuring the surface pressure and surface potential Langmuir isotherms. Excess Gibbs energies of mixing have been calculated for different compositions of the floating monolayer at varying surface pressure values. Spreading of pure t-DCTN molecules at the air-water interface resulted in a condensed-type isotherm and a maximum lateral pressure equal to 15 mN/m, recorded a ΔV in the course of the lateral compression of the monolayer. For the t-DCTN/DBPC and t-DCTN/DOPC binary systems, the maximum stability was obtained at $x_{t-DCTN} = 0.375$ and 0.500 at a surface pressure of 15 mN/m, with a minimum ΔG^M value equal to -1.7 kJ/mol. The analyses of the obtained thermodynamic parameters such as excess areas, excess free energies and free energy of mixing confirmed the miscibility of the phospholipids and t-DCTN in the binary systems. Among the binary systems studied, the binary system composed of t-DCTN/DOPC was demonstrated that the greater stability of monolayers at the interface for presenting the most significant negative deviation of free energy of mixing (ΔG^M). In these mixed monolayers, the phospholipid molecules seemed to exhibit higher long-range orientation order for intermediary values of t-DCTN molar fractions. As a whole, the above observations suggest that the t-DCTN molecules exert a condensing effect on the monolayers when mixed with the phospholipids.

Keywords: Langmuir films, trans-dehydrocrotonin, phospholipids, thermodynamics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Modelo do mosaico fluido proposto por Singer & Nicholson 04
(<http://www.sobiologia.com.br/figuras/Citologia/membranaplasmatica3.jpg>)
- Figura 2** – Estrutura química dos fosfolipídios 05
(http://www.protec.org.br/arquivos/eventos/download/Giuliana_Piovesan_Alves.pdf)
- Figura 3** – Disposição dos fosfolipídios num sistema interfacial ar-água, gás-água ou 13
óleo-água.
- Figura 4** – Isoterma de pressão de superfície por área molecular (Π -A) mostrando as 14
várias fases de agregação obtidas durante uma compressão à velocidade constante
(Ferreira et al., 2005)
- Figura 5** – Representação esquemática dos mecanismos de liberação de fármacos: A) 18
Sistema convencional de liberação e B) Sistema de liberação controlada.
- Figura 6** – Representação da estrutura do lipossoma ([http://www.jornallivre.com.br/161559/o-](http://www.jornallivre.com.br/161559/o-sao-lipossomas.html) 19
[sao-lipossomas.html](http://www.jornallivre.com.br/161559/o-sao-lipossomas.html))
- Figura 7** – Estruturas moleculares dos fosfolipídios e *trans*-Desidrocrotonina (*t*-DCTN) 21
- Figura 8** – Isoterma Π -A da monocamada flutuante de *t*-DCTN (Detalhe: isoterma ΔV - 24
A)
- Figura 9** – Isotermas Π -A dos filmes mistos contendo *t*-DCTN/Fosfo a diferentes 25
concentrações: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC
- Figura 10** – Variação da Π_{max} dos sistemas binários compostos por *t*-DCTN/Fosfo 26
versus concentração relativa do terpeno (x_{t-DCTN})
- Figura 11** – Isotermas ΔV -A dos filmes mistos compostos por *t*-DCTN/Fosfo a 28
diferentes concentrações relativas: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c)
Fosfo=DOPC
- Figura 12** – Variação normalizada do momento de dipolo médio dos sistemas binário *t*- 30
DCTN/Fosfo em filmes de Langmuir com a variação da fração molar do terpeno *t*-DCTN
(x_{t-DCTN}). Para as monocamadas de fosfolipídios puros, x_{t-DCTN} correspondem a 0,0
- Figura 13** – Representação da área em excesso (ΔA^E) dos filmes mistos de Langmuir 31
compostos por *t*-DCTN/Fosfo em função da fração molar do *t*-DCTN: (a) Fosfo=DBPC,
(b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC

Figura 14 – Energia livre em excesso (ΔG^E) em função da fração molar de *t*-DCTN: (a) 33 Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC

Figura 15 – Energia livre de mistura (ΔG^M) dos filmes mistos de Langmuir contendo *t*- 35 DCTN/Fosfo em função da fração molar de *t*-DCTN: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fosfo	Fosfolípido
DBPC	Dibehenoilfosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
<i>t</i> -DCTN	<i>trans</i> -Desidrocrotonina
SLC	Sistema de liberação controlada
PTFE	Politetrafluroetileno
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
pH	Potencial hidrogeniônico
PEG	Polietilenoglicol
DLVO	Derjagin–Landau–Verwey–Overbeek
MLV	Vesículas multilamelares
LUV	Vesículas unilamelares grandes
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
Amm	Área molecular média
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
LE	Fase líquida expandida
LE-LC	Transição de fase entre líquido expandida-líquido condensada
LC	Fase líquida condensada
G	Fase gasosa
$x_{t\text{-DCTN}}$	Fração molar do composto <i>t</i> -DCTN
nm ²	Nanômetros quadrados
R	Constante universal dos gases
T	Temperatura absoluta em Kelvin
mV	Milivolt
A	Área molecular
A ₁ e A ₂	Área molecular das espécies puras
A _{1,2}	Área molecular dos filmes mistos
x ₁ e x ₂	Frações molares dos componentes puros

LISTA DE SÍMBOLOS

Π	Pressão de superfície
X	Fração molar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ν	Frequência
$\text{\AA}$	Angstrom
Π_{max}	Pressão máxima de superfície
Π_{C}	Pressão de colapso
$\mu_{\perp}$	Momento de dipolo perpendicular aparente
$\mu_{\perp 0}$	Momento de dipolo perpendicular aparente puro
ϵ_0	Permissividade no vácuo
ΔV	Potencial de superfície
ΔV_{max}	Potencial máximo de superfície
ΔA^{E}	Área em excesso
ΔG^{E}	Excesso de energia livre
ΔG^{M}	Energia livre de mistura
ΔG^{ID}	Energia livre ideal

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de Figuras	III
Lista de Abreviaturas e Siglas	V
Lista de Símbolos	VI
1. Introdução	01
2. Objetivos	03
2.1 Geral	03
2.2 Específicos	03
3. Revisão Bibliográfica	04
3.1 Membranas Biológicas.....	04
3.2 <i>Croton cajucara</i> Benth.....	06
3.3 Fenômenos Interfaciais.....	09
3.3.1 Tensão Superficial e Interfacial	09
3.3.2 Energia livre de Superfície.....	10
3.3.3 Filmes de Langmuir.....	11
3.3.3.1 Histórico.....	11
3.3.3.2 Tipos de monocamadas.....	12
3.3.3.3 Monocamadas Insolúveis.....	13
3.3.3.4 Pressão de Superfície.....	13
3.3.3.5 Potencial de Superfície.....	15
3.3.3.6 Análises Termodinâmicas.....	16
3.4 Sistema de Liberação Controlada de Medicamentos.....	18
4. Metodologia	21
4.1 Materiais	21
4.2 Métodos	22
4.2.1 Medidas de pressão de superfície e potencial de superfície.....	22
4.2.2 Análises termodinâmicas.....	22
5. Resultados e Discussões	23
6. Conclusões	37
7. Perspectivas	38
Referências	39
Apêndice	49

1) INTRODUÇÃO

De modo geral, o sistema público de saúde brasileiro encontra-se em situação precária, ou seja, com deficiência no atendimento, falta de estruturação e de novas alternativas terapêuticas para grande parte da população que dele necessita, e por esta razão, a inovação em saúde vem sendo discutida no decorrer das últimas décadas. Por se tratar de um sistema complexo, o qual necessita de investimentos a médio e longo prazo, a inovação em saúde visa à melhoria nos serviços de saúde através da produção de medicamentos inovadores e insumos farmacêuticos (Gadelha, 2006; Queiroz & Carvalho, 2005; Folha de São Paulo, 2003; MS/Data SUS).

Portanto, inovação em saúde é uma questão complexa que, geralmente, envolve desde Universidades responsáveis por pesquisa e desenvolvimento (P&D) até a produção dos insumos farmacêuticos pelos grandes complexos industriais de saúde. Desta forma, parcerias públicas e privadas são de grande importância para alavancar a produção de patentes e novos medicamentos destinados ao combate de doenças negligenciadas e patologias que acometem todas as regiões brasileiras e doenças prevalentes em todo o mundo, tais como o diabetes e o câncer (Gadelha, 2003).

Nos últimos anos, um grande número de compostos naturais tem sido estudado por apresentarem inúmeros efeitos terapêuticos para várias doenças, tais como o câncer, doenças infecciosas, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana), entre outras. No entanto, ao nível celular a liberação desses compostos *in vivo* pode ser dificultada pela natureza hidrofílica ou hidrofóbica do fármaco. Por esta razão, o desenvolvimento de lipossomas pode trazer várias vantagens a estes compostos, tais como aumento da solubilidade, controle de liberação das moléculas, melhoramento da biodistribuição e aumento da estabilidade dentro do organismo (Allen & Cullis, 2004; Tan et al. 2010).

Os lipossomas são estruturas vesiculares compostas por uma bicamada lipídica semelhantes às membranas biológicas, com a finalidade de carrear e controlar a liberação de agentes terapêuticos, mais precisamente fármacos (Lasic, 1998). Contudo, a estabilidade dos lipossomas é algo importante para o sucesso da aplicabilidade como sistemas de carregamento de fármaco e liberação prolongada. Essa é a razão pelas quais diversos estudos vêm sendo realizados para prever a estabilidade que é advinda das interações físico-químicas entre os constituintes, como os lipídios e as moléculas a serem encapsuladas.

Assim, para um melhor entendimento e compreensão da estabilidade dos lipossomas é importante implementar estudos referentes às propriedades interfaciais das monocamadas flutuantes, conhecidos como filmes de Langmuir, em sistemas interfaciais água-ar. Através dessa técnica é possível realizar, por exemplo, a análise da atividade tensoativa dos fosfolipídios e dos filmes mistos, com os quais podem ser obtidas informações sobre as interações presentes entre os fosfolipídios com os fármacos a nível molecular e sobre a natureza das ligações intermoleculares existentes.

As análises físico-químicas interfaciais dos filmes mistos são acompanhadas pela determinação dos parâmetros termodinâmicos, que podem ser mensurados de modo quantitativo a partir das isotermas de pressão de superfície, como, por exemplo, os cálculos de área em excesso, excesso de energia livre, energia livre de mistura dos filmes mistos (Fang et al., 2003; Romão et al., 2004).

O fitofármaco a ser utilizado nesta Dissertação foi extraído da espécie *Croton cajucara* Benth, uma planta originária da região Amazônica e conhecida mais popularmente como “sacaca ou cajucara”, por sua vez, é muito utilizada pela população local porque apresenta várias propriedades medicinais e curativas (Maciel et al., 2000). Os efeitos terapêuticos desta planta são atribuídos aos óleos voláteis terpenóides isolados da mesma, sendo o constituinte majoritário desses óleos voláteis, o diterpeno *trans*-Desidrocrotonina (*t*-DCTN), extraído da casca do caule desta espécie de planta (Carvalho et al., 1996; Maciel et al., 1998). Em adição, alguns estudos descrevem que esse composto apresenta citotoxicidade em alguns tecidos vivos e uma elevada hidrofobicidade (Rodriguez & Haun, 1999; Anazetti et al., 2003).

Devido às propriedades físico-químicas apresentadas pelo *t*-DCTN é interessante avaliar o possível melhoramento das suas atividades farmacológicas e também diminuir a citotoxicidade através do seu encapsulamento em carreadores de liberação controlada de fármacos. Neste sentido, este trabalho visa estudar as interações entre os fosfolipídios e o diperteno *t*-DCTN através da análise de filmes interfaciais de Langmuir, com o intuito de desenvolver formulações lipossomais estáveis contendo o *t*-DCTN.

2)OBJETIVOS

Geral

- Avaliar as propriedades físico-químicas dos filmes interfaciais de fosfolipídios, do diterpeno *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e filmes mistos de fosfolipídio-diterpeno, visando contribuir com a compreensão dos fenômenos de estabilidade de lipossomas.

Específicos

- Estudar as propriedades interfaciais de filmes formados por moléculas biológicas em condições dinâmicas (filmes de Langmuir);
- Obter isotermas de pressão de superfície (Π) versus área por molécula (A) para análises das propriedades tensoativas;
- Avaliar as propriedades dielétricas dos filmes puros e mistos através das isotermas de potencial de superfície (ΔV);
- Realizar análises termodinâmicas dos filmes mistos através da área em excesso (ΔA^E), excesso de energia livre (ΔG^E) e energia livre de mistura (ΔG^M).

3) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Membranas Biológicas

As membranas biológicas possuem enorme importância para os seres vivos, uma vez que fazem parte de todas as estruturas celulares existentes nestes organismos. Elas são responsáveis não somente para definir os diversos compartimentos celulares, como também para determinar a natureza da comunicação intra e extracelular e, desta forma, contribuir na funcionalidade celular (Berg et al., 2004). As biomembranas são compostas basicamente por lipídios, formando uma bicamada lipídica, e por proteínas, as quais podem variar de 20 a 80% do peso total das membranas. As proteínas, por sua vez, se inserem integralmente (entre as bicamadas lipídicas) ou periféricamente, quando estão aderidas à sua superfície. Essa descoberta ficou conhecida por muitos pesquisadores no mundo como modelo do mosaico fluído, e foi proposta por Singer & Nicholson em 1972 (Berg et al., 2004) (Figura 1).

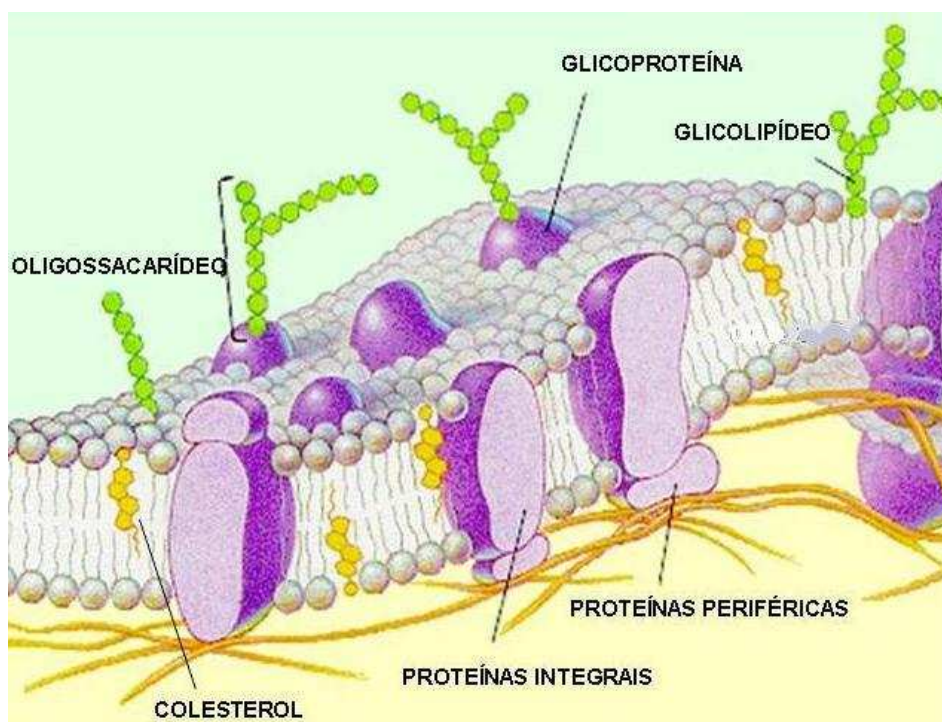


Figura 1 – Modelo do mosaico fluído proposto por Singer & Nicholson (<http://www.sobiologia.com.br/figuras/Citologia/membranaplasmatica3.jpg>).

Em adição, de acordo com a estrutura química os lipídios que compõem as membranas plasmáticas são classificados em dois tipos: a) cadeia aberta, onde estão inclusos os fosfolipídios (glicerofosfolipídios, esfingolipídios), glicolipídios (esfingolipídios, galactolipídios) e lipídios provenientes das arqueobactérias, e; b) cadeia fechada ou cíclica, onde estão presentes os derivados dos esteróides, como o colesterol (Lehninger, 2006).

A estrutura química dos fosfolipídios, classe dos lipídios presente em maior proporção nas membranas plasmáticas, possui um grupo colina e um grupo fosfato associados a um dos radicais da molécula de glicerol, e dois radicais substituídos por ácidos graxos saturados ou insaturados (Figura 2).

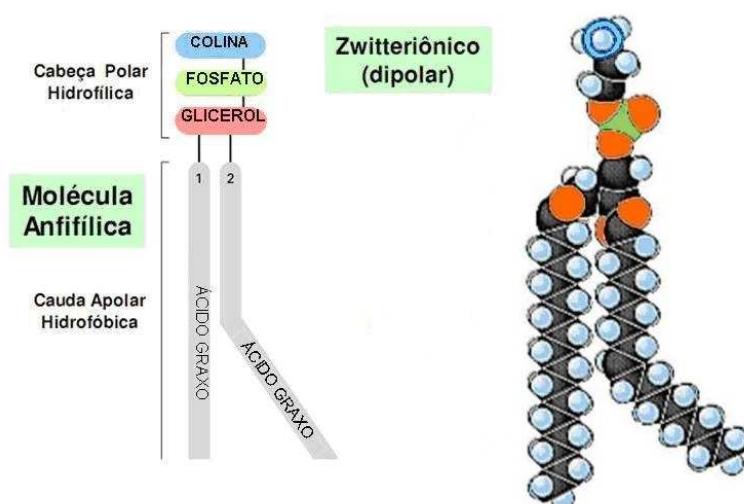


Figura 2 – Estrutura química dos fosfolipídios (http://www.protec.org.br/arquivos/eventos/download/Giuliana_Piovesan_Alves.pdf).

O arranjo e o ponto de fusão destas moléculas são determinados pela presença ou não de insaturações nas cadeias hidrocarbonadas. Desta forma, quando existir a presença de insaturação em sua cadeia a temperatura de transição de fase do lipídio será diminuída e esta insaturação também influirá no processo de empacotamento das moléculas de fosfolipídios, que será dificultado (Campbell, 2000).

Os lipídios são moléculas anfifílicas, portanto, sua organização em bicamadas, quando em solução, irá ocorrer de acordo com a polaridade que também é dependente das forças de interação que estão envolvidas no processo de empacotamento de suas moléculas. Desta forma, as partes apolares encontram-se voltadas para o interior das bicamadas constituintes das biomembranas e, conseqüentemente, a parte hidrofílica (polar) fica voltada para o exterior

da mesma. As forças que estabilizam estas membranas são as forças hidrofóbicas (forças que estão relacionadas à associação dos grupos não polares com outros em solução aquosa e geralmente estão relacionadas com grupamentos CH₂) e de Van der Waals (Beringer, 2006) presentes nas caudas hidrocarbonadas, enquanto que as forças atuantes nos grupos polares são predominantemente repulsivas por apresentarem a mesma carga (Campbell, 2000).

O fator de empacotamento depende do grau de saturação dos lipídios que compõem as membranas, como segue: se saturados (cadeias alifáticas), o seu empacotamento será rígido e ordenado, sendo fluido e desordenado quando os mesmos apresentarem insaturação, mais precisamente quando estiver na posição cis, porque esta é a conformação de cada molécula que apresenta um maior espaçamento entre um fosfolipídio e outro. Outro fator que pode influenciar no empacotamento é a temperatura: quando elevada, provoca o aumento do grau de desordem na bicamada. A desordem pode ser contornada pela adição ou a presença de colesterol nas biomembranas, que confere a elas uma maior rigidez e evita o movimento “flip-flop” dos fosfolipídios por se intercalar entre as caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios (Campbell, 2000).

3.2. *Croton cajucara* Benth

Desde tempos imemoráveis é conhecido que diversas espécies de plantas apresentam propriedades curativas para diferentes enfermidades. Tal fato foi melhor conhecido quando colonizadores europeus, após invadirem terras ainda não exploradas, identificaram uso de plantas com finalidade curativa por nativos da região amazônica, com base nas propriedades que eram advindas de substâncias fitoquímicas extraídas das plantas através de chás e infusões (Maciel et al., 2002).

Atualmente, a utilização de plantas medicinais para o tratamento e cura de enfermidades é muito disseminada entre as camadas de baixa e média renda. Contudo, esta cultura, repassada de geração em geração, encontra-se distribuídas em diversas regiões brasileiras, principalmente, na região amazônica. Nesta região está presente, a Floresta Amazônica, a maior reserva florestal existente no Brasil contendo diversas espécies de plantas conhecidas e desconhecidas. No entanto, esta floresta termina sendo alvo de pesquisas científicas relacionadas, principalmente, a identificação de novos compostos com atividades terapêuticas.

A espécie *Croton cajucara* Benth, pertencente à família *Euforbiaceae*, é encontrada na região amazônica e popularmente conhecida como “sacaca” ou “cajucara” (Maciel et al., 2003). Esta espécie é muito utilizada pela cultura popular da região por apresentar várias indicações terapêuticas, como o combate à diarreia, diabetes, malária, febre, estomatites, e também o controle de índices elevados de colesterol (Veiga et al., 2005). As propriedades curativas dos chás da sacaca são devidas aos compostos fitoquímicos extraídos das cascas do caule e folhas desta planta.

As propriedades terapêuticas identificadas são pertinentes aos compostos fitoquímicos clerodanos, que somam mais de 800 espécies químicas. O constituinte extraído em maior proporção é o diterpeno *t*-DCTN e os constituintes isolados em menor proporção são a *trans*-cajucarina, sacarina, *trans*-crotonina, cajucarina e cajucarinolideo (Maciel et al., 1998).

O *t*-DCTN é um diterpeno da classe dos clerodanos (Figura 7), extraído de plantas com 3 a 6 anos, e que possui diversos efeitos farmacológicos descritos na literatura, como seguem:

1. Atividades *in vivo*:

- Atividade Hipoglicemiante ficou evidente quando o composto *t*-DCTN apresentou uma redução em torno de 50-53% da glicemia em ratos hiperglicêmicos machos (Farias et al., 1997);
- Atividade Hipolipidêmica foi observada uma redução de 37% da taxa de triglicerídeos e diminuição dos níveis de colesterol pela administração de uma dose de 50mg/kg de *t*-DCTN por via oral (Silva et al., 2001);
- Atividade Antiulcerogênica foi comprovada, em estudos posteriores, quando o *t*-DCTN apresentou um excelente poder preventivo de úlceras gástricas, porque suprimiu a secreção gástrica ácida agindo como antagonista não competitivo dos receptores envolvidos em tal secreção e também apresentou o função de aumentar níveis séricos de prostaglandinas (PEG2), substâncias responsáveis pela proteção da mucosa gástrica (Hiruma-Lima et al. 1999);
- Atividade Antiinflamatório foi avaliada pelo método de indução de edema de pata em ratos pela administração subcutaneamente de substâncias químicas, como histamina, carragenina e dextrana, na região sub-plantar da pata esquerda enquanto que na pata direita foi injetado solução salina. Contudo, ocorreu uma redução de 49% da inflamação após sete dias administrando 200mg/kg de *t*-DCTN (Carvalho et al., 1996).

2. Atividade *in vitro*:

- Atividade Antiproliferativa: a citotoxicidade do *t*-DCTN e seu derivado Cajucarina foi avaliada em células de carcinoma Ehrlich e sarcoma 180 através do método MTT para avaliar a viabilidade celular, demonstrando que o *t*-DCTN apresentou uma menor dose-resposta em relação as células em estudo e que sua ação foi comparável com a ação de um potente anticancerígeno, 5-fluorouracil (Grynberg et al., 1999).

Contudo, o uso do *t*-DCTN demonstrou apresentar uma ação citotóxica em hepatócitos de ratos e linhagens de células fibroblásticas (V79) (Rodriguez & Haun, 1999), como também um derivado diterpenóide denominado de dimetilamina-crotonina apresentou atividade citotóxica em células leucêmicas humanas (HL60) (Anazetti et al., 2003).

Apesar das diversas propriedades farmacológicas descritas acima para o *t*-DCTN, não existe nenhum relato sobre a atividade antimicrobiana relacionada a este composto, sabe-se que compostos terpenóides como o linalol (monoterpeno), apresentou ação inibitória em microorganismos planctônicos (Alviano et al., 2005), e o ácido acetilaleuritólico (triterpeno) apresentou inibição do crescimento de cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (Peres et al. 1997).

As características descritas acima para o terpeno o tornam relevante do ponto de vista farmacológico, porém ainda persiste o problema de sua baixa solubilidade em meio aquoso, por serem óleos voláteis extraídos de plantas. Essa baixa solubilidade dificulta a sua veiculação em formas farmacêuticas convencionais sendo necessária a utilização de um nanocarreador.

Alguns estudos sobre os fenômenos que ocorrem na superfície destes sistemas nanocarreadores, chamados de fenômenos interfaciais, vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de se observar o comportamento e a interação dos vários compostos com atividade terapêutica em contato com os lipídios constituintes das membranas biológicas (Fernández-Botello et al., 2008; Hąc-Wydro et al., 2007; Gzyl-Malcher et al., 2008).

3.3 – Fenômenos Interfaciais

Fenômenos interfaciais são aqueles que ocorrem em uma região limite entre duas ou mais fases físicas da matéria que co-existem entre si. Desta forma, as moléculas inseridas nesta região possuem propriedades físico-químicas inerentes a ambas as fases (Goodwin, 2004; Sinko, 2008).

Diversos tipos de interfaces podem existir em estado bidimensional, a depender dos estados físicos da matéria (sólido, líquido ou gasoso) (Sinko, 2008), tais como:

- Interfaces sólidas: ocorrem quando estão presentes duas fases sólidas, uma fase sólida e outra líquida ou mesmo uma fase sólida e outra gasosa.
- Interfaces líquidas: quando existe a possibilidade de estarem envolvidas duas fases líquidas ou uma fase líquida e uma gasosa;

Ambas as interfaces líquidas e sólidas apresentam papel importante no que diz respeito ao entendimento dos fenômenos associados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Muito embora as interfaces sólidas apresentem grande importância na área farmacêutica, porque estão presentes nos grânulos revestidos e na produção de comprimidos multicamadas, seus estudos ainda não são tão disseminados quanto os das interfaces líquidas (Sinko, 2008).

As interfaces líquidas são encontradas em vários sistemas dispersos, como nas emulsões, e nos domínios vesiculares denominados lipossomas. De modo geral, na obtenção de dispersões há formação de uma região limite entre o meio disperso e o dispersante (geralmente aquoso), o que vem a ser chamada de filme interfacial. A técnica capaz de analisar os filmes interfaciais sofreu com o decorrer de alguns séculos várias modificações e avanços, e atualmente é denominada de preparação de filmes de Langmuir. Através dessa técnica é possível analisar o comportamento entre duas fases com propriedades distintas através da formação de simples monocamadas flutuantes.

3.3.1 – Tensão Superficial e Interfacial

A tensão superficial é uma das propriedades mais importantes para a formação dos filmes interfaciais, porque está intimamente relacionada com as forças de coesão e adesão que são provenientes das ligações de hidrogênio presentes entre as moléculas de água que compõem a subfase ou a superfície líquida da mesma. Contudo, estas ligações químicas são responsáveis pela formação de uma película estável na interface água-ar (Roberts, 1990).

Na interface água-ar, as moléculas que se encontram presentes no seio da solução são cercadas por moléculas de mesmas forças, de maneira que, as forças resultantes entre elas se anulam; na superfície da subfase, porém, a força resultante apresenta uma componente voltada para o interior do volume da subfase (Myers, 1999). Portanto, a tensão superficial é originária das forças resultantes provenientes da superfície da interface líquido-gás, que geralmente são compostas por moléculas de água; no entanto, a tensão interfacial, geralmente, ocorre quando dois líquidos imiscíveis estão em contato mútuo. Desta forma, a tensão interfacial é determinada através da força existente entre os dois líquidos por unidade de comprimento da interface (Sinko, 2008).

Moléculas com características anfifílicas apresentam propriedades tensoativas efetivas, ou seja, quando dispersas na interface água tendem a reduzir a tensão superficial do líquido que compõe a subfase através da quebra das forças de coesão e adesão. Devido a esta característica físico-química essas moléculas são chamadas de surfactantes ou recebem o nome de detergentes (Roberts, 1990).

3.3.2 – Energia Livre de Superfície

As forças de coesão e adesão são responsáveis por formarem na interface água-ar uma energia potencial de superfície, que é sentida por qualquer molécula presente no volume da solução que tente atingir a superfície líquida na região interfacial. Em adição, para a ocorrência deste fenômeno se faz necessário a realização de um trabalho contra as forças vetoriais resultantes que são voltadas para o interior da subfase (Goodwin, 2004).

Portanto, quanto maior for a área superficial do líquido, maior será o número de moléculas da interface água-ar que apresenta esse excesso de energia potencial adicional e, consequentemente, esta correlação entre a energia potencial com a área nos leva a concluir que existe uma energia livre de superfície que pode ser determinada no estado estacionário pela expressão:

$$\gamma = (\partial G / \partial A)_{T, P}, \quad (1)$$

onde, γ representa a tensão interfacial ou superficial, ∂G a energia livre de superfície, ∂A a área da superfície líquida, T a temperatura absoluta em Kelvins e P a pressão atmosférica

3.3.3 – Filmes de Langmuir

Por definição as monocamadas flutuantes são formadas pela dispersão de agentes tensoativos (compostos que alteram a tensão superficial), como os fosfolipídios (lipídios com cabeças polares e cadeia hidrocarbonada) em uma interface água-ar, de modo a obter uma simples camada delgada de espessura a nível molecular organizada sobre uma superfície de um líquido, também conhecido como subfase (Ferreira et al., 2005).

3.3.3.1 – Histórico

Para chegar ao nível de complexidade e aprimoramento que encontramos atualmente, no estudo dos filmes preparados sob a forma de monocamadas foi bastante útil a contribuição de vários pesquisadores, como Benjamin Franklin, Lord Rayleigh, Agnes Pockels, Irving Langmuir e Katharine-Blodgett (Roberts, 1990; Gaines, 1966a).

Em 1757, Benjamin Franklin ao viajar em navios para Inglaterra observou que as ondas formadas pelo deslocamento do navio nas águas do mar eram diminuídas ou acalmadas, em decorrência do derramamento de dejetos oriundos da cozinha dos navios. Essa observação veio a ser ressaltada em anos subseqüentes quando se descobriu que os materiais oleosos provenientes dos navios eram responsáveis por reduzir as forças de coesão entre as moléculas de água, consequentemente, reduzindo as marolas (Sinko, 2008).

Por volta de 1899, Rayleigh contribuiu para o desenvolvimento desta técnica, quando publicou alguns resultados de uma jovem e desconhecida cientista chamada Agnes Pockels (1862-1935) (Derrick, 1982). Ela foi um dos pesquisadores que mais contribuíram para a base da ciência da matéria condensada, ao estudar as propriedades interfaciais de substâncias oleosas (óleos, ácidos graxos) dispersas sobre uma superfície aquosa. Após ter construído um aparato de metal com estrutura retangular de estanho, Pockels realizou as primeiras medidas de tensão superficial de líquidos (Roberts, 1990; Sinko, 2008). Com isso, foi possível realizar as primeiras medidas de tensão superficial e, conseqüentemente, obter os primeiros gráficos de tensão superficial *versus* área ocupada por cada molécula (Gaines, 1966a).

Por sua vez, Irving Langmuir (1881-1957) é até hoje lembrado devido às numerosas publicações e também pelo aprimoramento do equipamento e da técnica de estudo de filmes interfaciais, que foi denominada de filmes de Langmuir. Ele sugeriu que moléculas espalhadas na superfície líquida formariam monocamadas flutuantes, observando e

constatando que a orientação de compostos com características anfifílicas na superfície dos líquidos é tal que os grupos polares se encontram imersos na água enquanto que as cadeias não polares ficariam voltadas para o ar (Roberts, 1990). Os experimentos eram realizados num equipamento contendo um reservatório o qual era recoberto por material hidrofóbico, que é até hoje denominado de cuba de Langmuir (Gaines, 1966a; Roberts, 1990).

Langmuir também orientou a engenheira e pesquisadora Katharine Blodgett no desenvolvimento da técnica de deposição dos filmes flutuantes em substratos sólidos, uma vez que até então eles somente eram estudados em superfície líquida sem que fossem obtidos informações sobre as disposições, composição e espessura (Hughes et al., 2008). A técnica de deposição de monocamadas flutuantes em substratos sólidos ficou conhecida como filmes de Langmuir-Blodgett (LB). A partir de então, foi possível analisar e estudar a morfologia dos filmes interfaciais através de técnicas, tais como a difração de raios-X, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e microscopia de força atômica (Gaines, 1966a).

3.3.3.2 – Tipos de Monocamadas

As monocamadas flutuantes podem ser classificadas de acordo com a solubilidade dos adsorvatos (agentes tensoativos) na subfase líquida. Geralmente, esta classificação é determinada pela quantidade de átomos de carbono presentes nas cadeias hidrocarbonadas. Desta forma, compostos anfifílicos contendo cadeias hidrofóbicas com um número de átomos de carbono entre 5 e 12 unidades (C5 - C12) formam filmes “solúveis” (Jasper & Houseman, 1963). Já os compostos anfipáticos contendo um número de átomos de carbono na cadeia hidrocarbonada superior a 12 unidades (> C12) formam monocamadas “insolúveis” (Chattoraj & Birdi, 1984). Um exemplo clássico de monocamadas solúveis é o álcool amílico, um composto contendo cinco átomos de carbono (5C) na sua cauda hidrocarbonada, enquanto que o álcool cetílico apresenta 16C nesta cadeia hidrocarbonada, conferindo formação de monocamada insolúvel na superfície aquosa (Sinko, 2008).

3.3.3.3 – Monocamadas Insolúveis

Os lipídios utilizados para formação de filmes de Langmuir são substâncias gordurosas, com características anfifílicas e que, geralmente, formam monocamadas insolúveis (Berg et al., 2004). A característica anfifílica dessas moléculas se deve à presença de uma dupla polaridade existente na mesma molécula. Contudo, esta propriedade influenciará na disposição dos fosfolipídios, com a cabeça polar voltada para interface aquosa e a apolar voltada para interface ar, formando uma monocamada na região interfacial água-ar (Figura 3).



Figura 3 – Disposição dos fosfolipídios em um sistema interfacial água-ar, água-gás ou água-óleo.

Esta disposição já havia sido descrito por Langmuir, uma vez que as moléculas quando empacotadas sob compressão lateral ficam dispostas perpendicularmente à interface água-ar, ou seja, as cadeias hidrofóbicas formam um ângulo de 90° com a subfase, fazendo com que seja gerado um momento de dipolo perpendicular (Gaines, 1966a; Roberts, 1990; Myers, 1999).

3.3.3.4 – Pressão de Superfície

É possível utilizar diversos métodos para quantificar a tensão superficial ou interfacial (Sinko, 2008; Goodwin, 2004), como seguem:

- Método por ascensão capilar, que se baseia na ascensão do líquido através de um tubo capilar ocasionado pela pressão atmosférica, com isso poderá ser determinado a tensão superficial do líquido através da altura e do ângulo de contato formado com a parede do tubo;

- Método do anel de DuNoüy, que se baseia na força necessária para desprender um anel de platina imerso na interface líquida, que é registrado uma vez que o anel encontra-se acoplado a um tensiômetro;
- Método da placa de Wilhelmy, que permite medir a pressão de superfície pelas forças de coesão que atuam na superfície da placa, que se encontra presa a um tensiômetro.

Quando os agentes ativos são dispersos na interface e ocorrer a compressão da monocamada através de barreiras mecânicas, é possível mensurar as pressões de superfície (Π) por área molecular (A) através de isotermas. A pressão de superfície é determinada pela diferença de tensão superficial do líquido puro e do líquido recoberto ($\Pi = \gamma_0 - \gamma$) (Gaines, 1966a). As isotermas Π - A , que registram a variação de pressão de superfície como função da área livre da interface, mostram as várias fases de agregação das moléculas dispersas numa subfase, simulando os diferentes estados físicos da matéria (Figura 4).

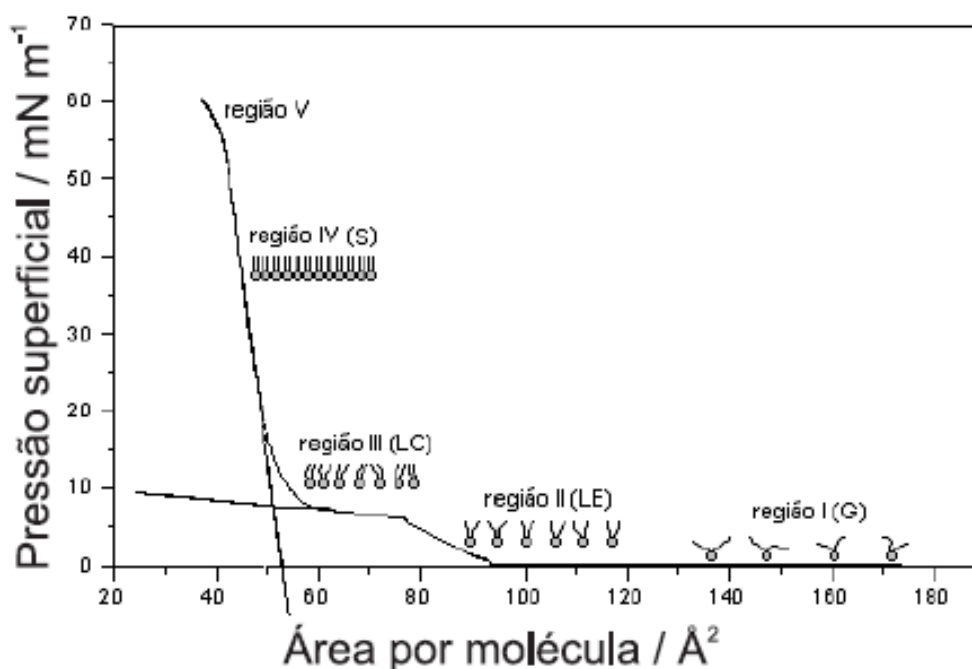


Figura 4 – Isoterma de pressão de superfície versus área por molécula (Π - A) mostrando as várias fases de agregação obtidas durante uma compressão à velocidade constante (Ferreira et al., 2005).

Na Figura 4 podemos visualizar as várias fases de agregação (Ferreira et al., 2005; Sinko, 2008; Governado-Mitre et al., 1995). A primeira fase (região I) é denominada de gasosa (G), uma vez que as moléculas estão dispersas aleatoriamente sem que ocorra nenhum tipo de interação. A partir da compressão lateral do filme haverá uma mudança na fase de

agregação das moléculas dispersas da fase gasosa (G) para líquido-expandida (LE) representada pela região II, quando ocorre uma diminuição da área ocupada por cada molécula. Nesta fase é observado o início da orientação das moléculas em relação à subfase, quando também começam a existir forças intermoleculares, mesmo que ainda pequenas. Com o decorrer da compressão, o filme se reorganiza passando da fase LE (região II) para a região III correspondente a fase líquido-condensada (LC). Nesta fase, as forças intermoleculares entre as moléculas são bem maiores quando comparadas com as existentes nas fases anteriores e o material disperso encontra-se disposto com a parte hidrofílica adsorvida a superfície líquida, enquanto que a hidrofóbica fica verticalmente voltada para interface ar.

Com uma compressão ainda maior, surge uma nova forma de organização do filme (região IV), a fase sólida (S), na qual as cadeias hidrocarbonadas dos lipídios encontram-se empacotadas ao máximo, até que se atinja uma pressão de superfície limite (região V), denominada de pressão colapso (Π_c) (Ferreira et al., 2005), depois da qual a monocamada observada em apenas duas dimensões (2D) é desordenada, assumindo então a forma tridimensional (3D) pela sobreposição de monocamada ou expulsão de moléculas da região interfacial (Lee, 2008).

3.3.3.5 – Potencial de Superfície

As monocamadas de Langmuir conferem à interface uma propriedade elétrica, que está associada ao grau de orientação das moléculas na interface (Quinn e Wolf, 2009) e, conseqüentemente, à alteração do momento de dipolo que variará com a compressão lateral, gerando uma diferença de potencial (DDP). Esta DDP gera na interface um potencial de superfície (ΔV) que é medido pela diferença de potencial entre o líquido recoberto pela monocamada e o líquido puro ($\Delta V = V - V_0$), sendo possível tal mensuração através do método de placa vibrante (Gaines, 1966a; Terminassiansaraga, 1979).

Neste método, a superfície da subfase funciona como uma das placas de um capacitor, enquanto que a segunda placa se encontra vibrando acima da subfase. Os movimentos vibracionais ocasionam uma variação da capacitância e, como conseqüência, tem-se a geração de uma voltagem que é amplificada e medida por um detector (Gaines, 1966a).

Portanto, o ΔV pode ser medido pelo modelo de Helmholtz (Hidalgo et al., 2004; Hiemenz, 1986) nos quais os lipídios das monocamadas, no máximo da sua compressão, são

considerados como um conjunto de momentos de dipolos elétricos presentes na interface, o que é descrito em:

$$\Delta V = \mu_{\perp} / \varepsilon_0 A, \quad (2)$$

onde $\mu_{\perp}$ é a componente normal do momento de dipolo, ε_0 é a permissividade do vácuo e A é a área molecular média.

O entendimento microscópico dessa propriedade elétrica advinda do potencial de superfície se baseia na teoria da dupla camada elétrica ou de Gouy-Chapman, que envolve um termo de polarização (ΔV_p), dependente do momento de dipolo perpendicular das moléculas dispersas e uma contribuição elétrica proveniente da carga líquida do filme em contato com a fase aquosa (ψ_o) (Oliveira Jr., 1990; Andrade et al., 2005).

Esta dupla camada elétrica é composta por uma camada interna, contra-iônica, chamada de camada de Stern, onde as cargas são consideradas pontuais e de cargas contrárias as cabeças polares. Outra camada, conhecida como difusa com densidades de cargas se esmaecendo de acordo com a distância da interface, se encontra aderida à camada de Stern (Oliveira Jr., 1990; Andrade et al., 2005; Gaines, 1966a; Myers, 1999).

3.3.3.6 – Análises Termodinâmicas

As análises termodinâmicas dos filmes mistos são mensuradas através dos parâmetros de área em excesso (ΔA^E), energia livre em excesso (ΔG^E) e energia livre de mistura (ΔG^M) tomando como base as isotermas de pressão de superfície versus área molecular média (Π - A) (Andrade et al., 2006). Estes parâmetros são responsáveis por fornecer informações importantes, tais como a miscibilidade entre os componentes que compõe a monocamada, a força de interação entre eles e a estabilidade das monocamadas mistas.

A área em excesso (ΔA^E) é determinada pela diferença entre a área molecular média experimental dos filmes mistos (A_{12}) e a área molecular ideal (A_{id}), representada por (Gaines, 1966):

$$\Delta A^E = A_{12} - A_{id} = A_{12} - (x_1 A_1 + x_2 A_2), \quad (3)$$

onde x_1 e x_2 correspondem as frações molares dos constituintes puros, A_1 e A_2 correspondem a área molecular média dos respectivos constituintes puros.

Desta forma, se a área em excesso for zero ($\Delta A^E=0$) a monocamada mista formada será considerada ideal, ou seja, os dois componentes que compõe esta monocamada são completamente imiscíveis, e o gráfico de $A_{1,2}$ em função de x_1 a uma dada pressão superfície será uma linha reta. Assim, qualquer desvio desta linearidade indicaria comportamento não ideal e que os componentes seriam miscíveis entre si. Valores de $\Delta A^E > 0$ indicam interações fracas e $\Delta A^E < 0$ indicam interações fortes entre os componentes da mistura quando comparado com os filmes puros.

A energia de interação entre os constituintes das monocamadas mistas é determinada pela energia livre em excesso (ΔG^E), advinda da área molecular em excesso e determinada por (Chou & Chang, 2000):

$$\Delta G^E = \int \Delta A^E d\Pi, \quad (4)$$

onde Π é a pressão de superfície. Valores $\Delta G^E < 0$ indicam uma interação mútua entre as moléculas constituintes das monocamadas mistas e valores de $\Delta G^E > 0$ indicam a predominância de interações repulsivas entre as moléculas que compõe as monocamadas mistas.

Para observar a estabilidade das monocamadas, utilizam-se as medidas quantitativas de energia livre de mistura (ΔG^M), obtida por (Kodama et al., 2004; Chou & Chang, 2000)

$$\Delta G^M = \Delta G^E + \Delta G^{ID}, \quad (5)$$

$$\Delta G^{ID} = RT (x_1 \ln x_1 + x_2 \ln x_2), \quad (6)$$

onde ΔG^{ID} corresponde a energia ideal, R a constante dos gases universal e T temperatura em Kelvin. Os valores $\Delta G^M < 0$ implicam em monocamadas mistas mais estáveis que as monocamadas compostas pelos componentes individuais (indicando interações atrativas), o inverso ocorre para os valores de $\Delta G^M > 0$, indicando interações repulsivas.

Deste modo, com base nas informações obtidas a partir das análises físico-químicas de interface e análises termodinâmicas, podemos avaliar a interação entre o terpeno e fosfolipídios para obtenção de relevantes informações para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (SLC).

3.4 – Sistemas de liberação controlada de medicamentos

Os SLC são nano ou micro sistemas terapêuticos destinados, principalmente, a melhoria ou controle da liberação de um determinado fármaco ou agente terapêutico. Portanto, uma das principais e mais importante função é manter constante a liberação do fármaco (Figura 5), evitando que flutuações na liberação possam vir a ocorrer, ou seja, a liberação do fármaco no organismo deve ser estabelecida entre o nível plasmático efetivo e a máxima concentração tolerada (Aulton, 2005; Beringer, 2006).

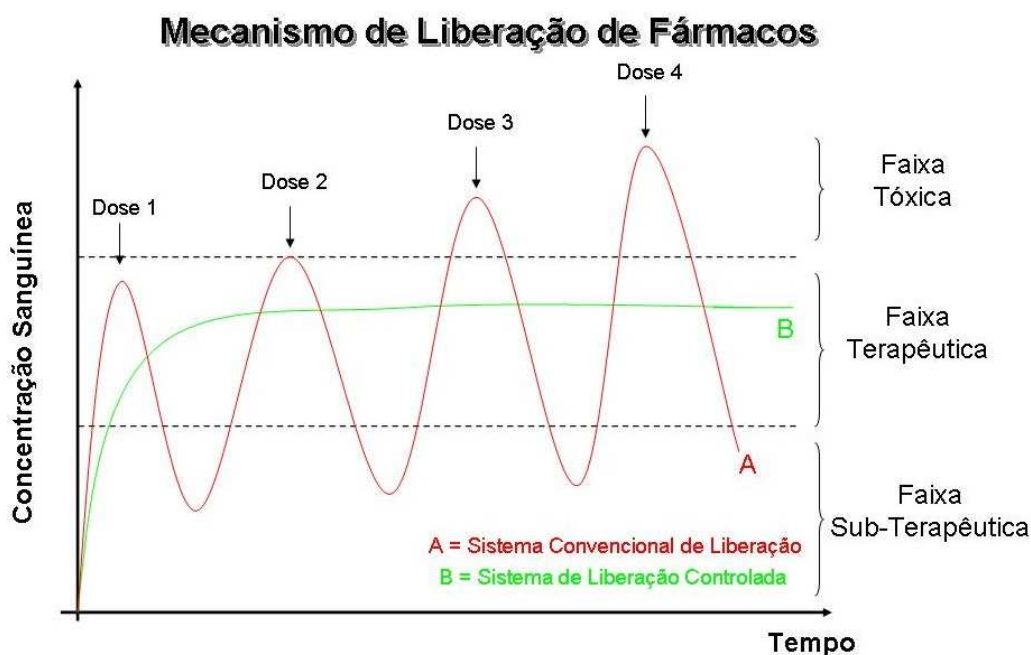


Figura 5 – Representação esquemática dos mecanismos de liberação de fármacos. A) Sistema convencional de liberação e B) Sistema de liberação controlada.

Dentre os SLC podemos destacar os lipossomas que são estruturas compostas por uma bicamada lipídica e um compartimento aquoso no seu interior, sendo obtido em escala nanométrica ou micrométrica (Figura 6). Podemos salientar que os mesmos mimetizam estruturas biológicas, mais precisamente as membranas plasmáticas (Lasic, 1989).

Em 1960, os lipossomas foram descobertos pelo pesquisador Alec Bangham e, posteriormente, em 1971 o pesquisador Gregory Gregoriadis descreveu sua importância quanto à utilização no carregamento de fármacos, quando comparado com os sistemas farmacológicos convencionais (Santos & Castanho, 2002).

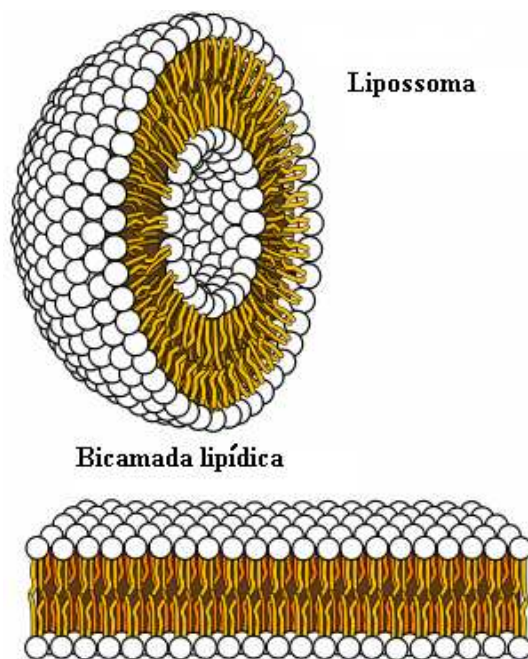


Figura 6 – Representação estrutural do lipossoma (<http://www.jornallivre.com.br/161559/o-sao-lipossomas.html>).

Portanto, o lipossoma é um produto nanotecnológico advindo da interdisciplinaridade de diversas áreas do conhecimento, tais como as áreas das ciências biológicas/saúde, química, física e engenharia (Poole & Owens, 2003). Em adição, este sistema apresenta um elevado potencial na aplicação tecnológica, principalmente, nas áreas das ciências médicas e farmacêuticas, uma vez que são bastante utilizados no carregamento de fármacos ou agentes terapêuticos, sejam eles hidrofílicos ou hidrofóbicos (Torchilin, 2007).

Os lipossomas possuem grande importância para a terapêutica porque visam o melhoramento das condições de vida de pacientes que fazem uso crônico de medicamentos através da redução das doses diárias administradas e pelo prolongamento do tempo requerido para uma nova administração (Aulton, 2005; Sinko, 2008; Beringer, 2006), uma vez que ambos os fatores estão correlacionados com a cinética de liberação, ou seja, são responsáveis por manter as concentrações do fármaco constantes perante a faixa terapêutica. Desta forma, é possível minimizar os efeitos tóxicos indesejáveis ao organismo ocasionado pelos sistemas terapêuticos convencionais (Ravi Kumar, 2000; Berkland et al., 2002). Além disso, os lipossomas visam favorecer o melhoramento na biodistribuição de fármacos (Aulton, 2005; Sinko, 2008; Beringer, 2006), principalmente para fármacos hidrofóbicos cuja etapa biofarmacêutica é importante no processo de absorção do fármaco e apresenta a característica de proteção do fármaco contra processos degradativos.

Contudo, apesar destas vantagens, os lipossomas são bastante sensíveis a alterações físicas pela ação da luz e temperatura, alterações químicas através de reações de hidrólise, óxido-redução e alterações microbiológicas (Morais et al., 2003). Estas alterações físicas, químicas e microbiológicas contribuem para a desestruturação dos domínios vesiculares, ou seja, contribuem para perda da estabilidade das formulações lipossomais.

Esta estabilidade encontra-se intimamente relacionada com algumas propriedades físico-químicas (Kirby et al., 1980; Hernández-Caselles et al., 1993; Sułkowski et al., 2005), tais como os processos de fabricação e componentes da formulação (Brasil, 2005). Mais precisamente, a estabilidade dos lipossomas dependerá da composição da bicamada lipídica e, conseqüentemente, das modificações ocorridas na superfície dos mesmos. Contudo, na superfície dos lipossomas atuam numerosas forças de interação físicas que contribuem para interação das bicamadas lipídicas e para sua estabilização, principalmente, as forças atrativas de van der Waals, forças atrativas de interação hidrofóbicas, forças repulsivas eletrostáticas, forças repulsivas devido a estabilização estérica (Jones, 1995).

Desta forma, a contribuição das forças clássicas de atração de van der Waals e de repulsão eletrostática presente em todas as partículas coloidais é observada através da teoria de estabilidade coloidal, denominada como teoria do DLVO, desenvolvida pelos pesquisadores Derjaguin-Landau Verwey-Overbeek (Park et al., 2010; Ise & Sogami, 2005; Myers, 1990). Esta teoria leva em consideração a energia de interação entre as partículas coloidais que está diretamente dependente da distância entre elas, ou seja, quanto menor a distância entre as partículas maior será a energia total do sistema em estudo. As forças estéricas repulsivas provenientes da modificação químicas da superfície dos fosfolipídios pela adição de polímeros hidrofílicos podem contribuir também para o processo de estabilização das partículas coloidais.

Portanto, as forças de interação que conferem a estabilidade aos lipossomas podem ser mensuradas através de estudos baseados no modelo de monocamadas flutuantes, denominadas de filmes de Langmuir. Neste sentido, esta dissertação permitiu a obtenção de informações físico-químicas dos componentes puros e sobre a miscibilidade dos mesmos através dos filmes mistos, resultando em dados imprescindíveis sobre a estabilidade dessas monocamadas e a energia de interação intermolecular entre estes componentes.

4) METODOLOGIA

4.1 - Materiais

A solução tampão de citrato-fosfato (pH 7.4) foi preparada com água obtida por osmose reversa num sistema de água ultrapura (NANOpure-Barnstead). A resistividade específica da água foi de 18,2 MΩ.cm (pH 5,6 em equilíbrio com o dióxido de carbono atmosférico) e o valor típico de tensão superficial foi 72,2 mN/m a 20°C. Os fosfolipídios (Figura 7), D,L- α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, C16:0), L- α -dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC, C22:0) e L- α -dioleilfosfatidilcolina (DOPC, C18:1) com pureza de 99% foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos da América). Clorofórmio e metanol foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Germany). O Diterpeno, *t*-DCTN, foi extraído e purificado das cascas da *Croton cajucara* Benth (Poersch et al., 2007) pela Prof.^a Maria Aparecida Maciel.

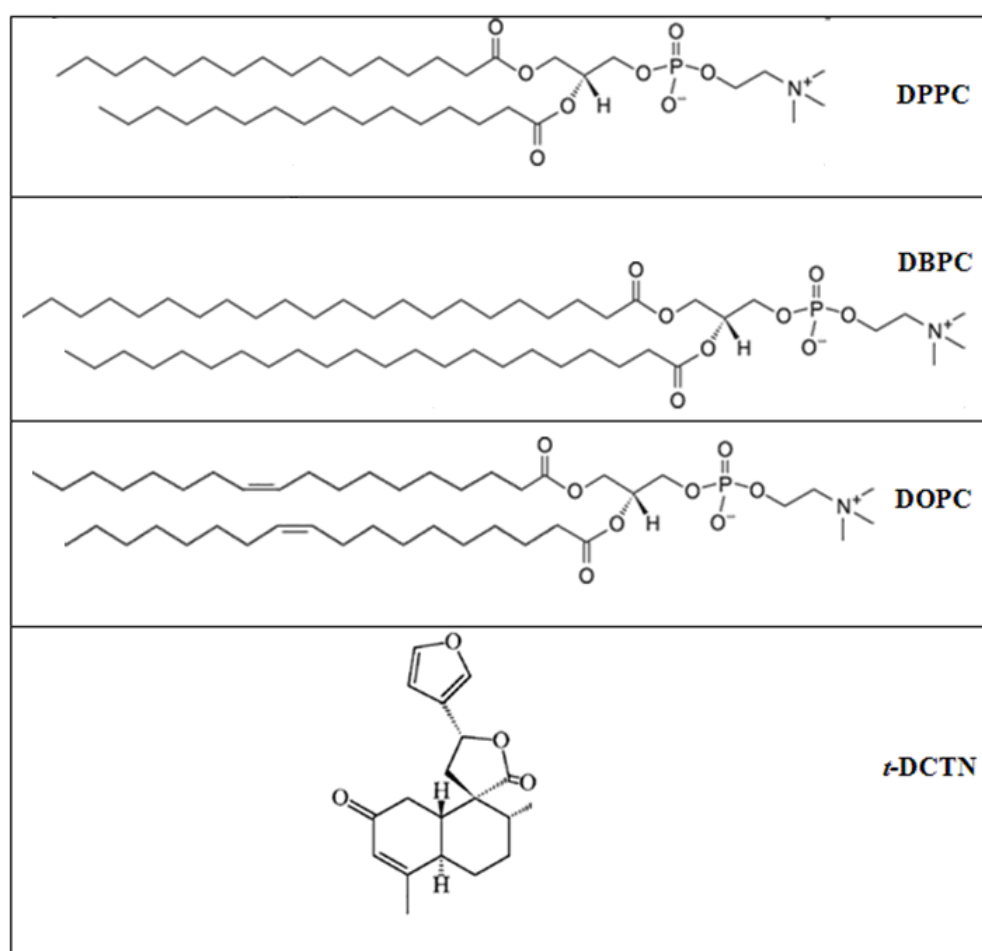


Figura 7 – Estruturas moleculares dos fosfolipídios e *trans*-Desidrocrotonina (*t*-DCTN).

4.2 – Métodos

4.2.1 - Medidas de pressão de superfície e potencial de superfície

As medidas das isotermas de pressão de superfície (Π) versus área molecular (A) das monocamadas puras e mistas contendo *t*-DCTN/Fosfolipídios (DPPC, DBPC e DOPC) foram realizadas a uma taxa de compressão de 10 mm/min numa cuba de filmes de Langmuir (KSV 5000, Finlândia), com a área total de $850,00 \pm 0,05 \text{ cm}^2$. O sistema é equipado com a placa de Wilhelmy, de modo que a pressão de superfície foi medida com uma precisão de $\pm 0,1 \text{ mN/m}$. Inicialmente, enquanto o *t*-DCTN foi dissolvido em clorofórmio a uma concentração da solução estoque igual a 6 mM, 0,1mM das soluções de *t*-DCTN, DPPC, DBPC e DOPC (todos os casos $\sim 1,7 \times 10^{15}$ moléculas/ μL) foram preparadas a uma proporção de 9:1 (v/v) de clorofórmio e metanol. Então, as soluções mistas de *t*-DCTN/fosfolipídios a diferentes taxas de frações molares do *t*-DCTN ($x = \{0,250; 0,375; 0,500; 0,675; 0,750; 0,875\}$) foram preparadas, usando adequadas alíquotas das soluções puras do diterpeno e dos fosfolipídios. Tanto no caso das monocamadas puras quanto nas mistas, 100 μL das soluções orgânicas foram espalhadas na superfície da solução tampão de citrato-fosfato (pH 7,4; 10^{-2} M de força iônica) a uma temperatura de $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Utilizando o método de placa vibrante (Terminassiansaraga, 1979) a uma frequência (ν) de 300 Hz, o potencial de superfície (ΔV) das monocamadas puras e mistas de *t*-DCTN/Fosfolipídio foi mensurado com um aparelho da KSV método de Kelvin com precisão de $\pm 10 \text{ mV}$. Os dados foram coletados utilizando o software KSV, e nas isotermas de Π - A e ΔV - A obtidas são apresentados os valores médios de três medidas independentes, sendo que todos os valores dos desvios das áreas de superfície foram menores que $\pm 1 \text{ \AA}^2$.

4.2.2 - Análises termodinâmicas

A partir das isotermas Π - A é possível realizar análises termodinâmicas (Andrade et al., 2006; Gaines, 1966), a partir do que podem ser obtidas informações sobre o excesso de área (ΔA^E), excesso de energia livre (ΔG^E) e energia livre de mistura (ΔG^M).

5) RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em todos os casos examinados, as isotermas Π -A foram registradas sob compressão lateral na interface água-ar numa solução tampão de citrato-fosfato até atingir um valor máximo de pressão lateral (Π_{max}) suportada pelos filmes de Langmuir. Nota-se que a Π_{max} não necessariamente corresponde à pressão de colapso (Π_c) dos filmes de Langmuir, uma vez que em vários casos este valor máximo é atingido, mas não há indício de ser identificada uma iminente transição de estrutura 2D para 3D da monocamada flutuante. A formação de estruturas tridimensionais, tanto pelo crescimento na subfase ou pelo dobramento e sobreposição de mais de uma monocamada flutuante é uma indicação de um colapso do filme de Langmuir (Ybert et al., 2002; Lee, 2008). Os experimentos com os sistemas binários *t*-DCTN/fosfolipídios foram realizados em pH 7,4, um valor intencionalmente escolhido para aumentar a possibilidade de aplicar os estudos, eventualmente, no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

A compressão lateral das moléculas de *t*-DCTN espalhadas na interface água-ar resulta numa isoterma do tipo fase condensada (Figura 8). A isoterma Π -A do *t*-DCTN não apresenta uma pressão de colapso até o final do ciclo de compressão, contudo apresentou uma pressão máxima igual a 15 mN/m em uma área molecular média (amm) de 0,31 nm². No perfil de compressão ΔV -A correspondente (detalhe da Figura 8), pode-se observar a existência de uma variação do potencial de superfície (ΔV) mesmo quando a monocamada está em estado relativamente expandido (por exemplo, para amm em que a pressão da superfície começa a se elevar, o potencial de superfície já atingiu valores próximos de 125 mV).

Para se obter mais informações sobre a estabilidade dos lipossomas compostos por misturas *t*-DCTN/fosfolipídios, foram realizados experimentos usando sistemas binários com diferentes frações molares dos respectivos componentes (Figura 9). Inicialmente, notou-se, em termos gerais, as isotermas Π -A do DBPC puro (amm = 0,54 nm², Π_c = 60,0 mN/m), DPPC (amm = 0,56 nm², Π_c = 57,7 mN/m) e DOPC (amm = 0,83 nm², Π_c = 42,1 mN/m) apresentados na Figura 9a-c estão em concordância com dados da literatura (Andrade et al., 2005; Gambinossi et al., 2002). Os filmes de DBPC e DPPC puros mostraram um perfil condensado, ao contrário do DOPC que exibiu uma fase líquido-expandida (LE) ou fluida sem evidência da transição de fase líquido-expandido para líquido-condensado (LE-LC) até o

ponto máximo de pressão lateral da monocamada, que neste caso corresponde a um verdadeiro colapso do filme.

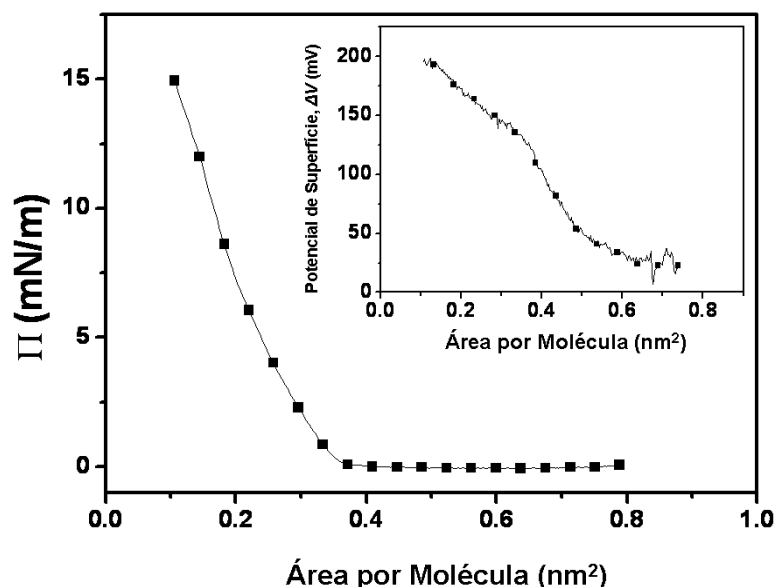


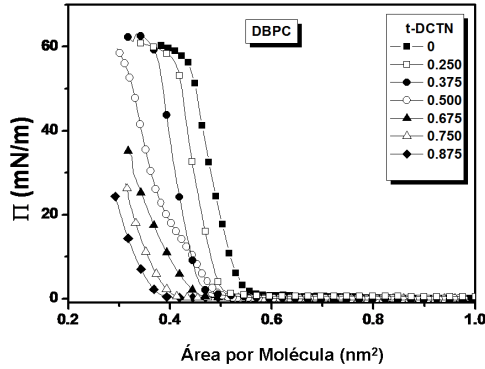
Figura 8 – Isotherma Π -A da monocamada flutuante de *t*-DCTN (Detalhe: isoterma ΔV -A).

De especial interesse para nossa discussão posterior, ficou evidente que este comportamento de transição de fase é característico das monocamadas de DPPC puro analisadas na interface água-ar (Mccolougue & Vanderlick, 1997) e os domínios morfológicos na região de coexistência de fase líquido-expandido e líquido-condensado (LC) se mostraram sensíveis à natureza dos constituintes das monocamadas em condições experimentais (Gehlert & Vollhardt, 1997). Em particular, a variedade de formas dos domínios LC em toda a região de coexistência foi, em parte, atribuída ao antagonismo entre uma tensão linear unidimensional da coexistência de fases e a repulsão eletrostática dos dipolos resultantes da orientação molecular e do empacotamento dentro dos domínios condensados (Benvegnu & Mcconnell, 1992).

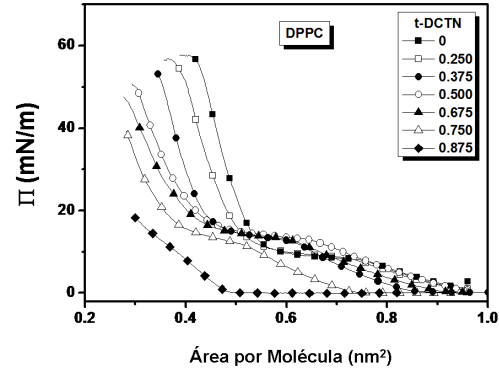
Para os sistemas binários *t*-DCTN/DBPC, pôde observar a existência de um perfil condensado para $0 < x_{t-DCTN} < 0,375$ e isothermas expandidas em $x_{t-DCTN} > 0,500$ (Figura 9a). Enquanto, as isothermas Π -A do DPPC puro apresentam uma região bem definida de transição de líquido-expandido para líquido-condensado numa amm de $0,70 \text{ nm}^2$ (Figura 9b), o aumento da fração molar de *t*-DCTN nos filmes binários contribui para um progressivo desaparecimento das nítidas características dessa transição e uma pronunciada redução dos valores da amm associada ao $\Pi_{\max}$. Na Figura 9c, mostra as isothermas Π -A de *t*-DCTN/DOPC

onde, semelhante aos dois casos anteriores, o aumento da fração molar do *t*-DCTN corresponde a uma redução do valor da Π a uma dada pressão máxima.

a)



b)



c)

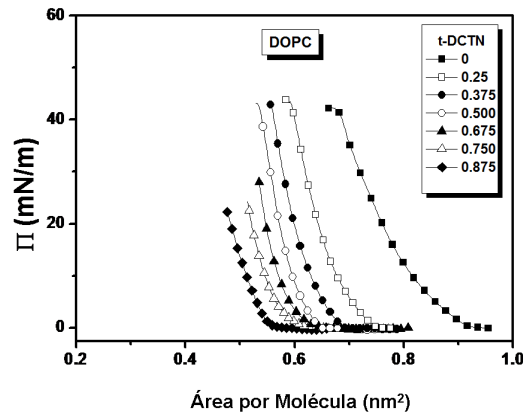


Figura 9 – Isotermas Π -A dos filmes mistos contendo *t*-DCTN/Fosfo a diferentes concentrações: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC.

Para um melhor entendimento do grau de miscibilidade dos componentes constituintes dos filmes binários, lembramos que uma isoterma de uma monocamada constituída por dois componentes imiscíveis irão apresentar duas pressões de colapso distintas (correspondente aos componentes puros) que são independentes da composição (Gaines, 1966; Terminassiansaraga, 1979; Maget-Dana, 1999; Wu & Huntsber, 1969), de acordo com a regra de fase (Terminassiansaraga, 1979), enquanto que uma única pressão de colapso, dependente da composição da mistura, será observada se os constituintes das monocamadas mistas forem miscíveis. Na Figura 9 é visto, claramente, que os valores correspondentes das pressões máximas das monocamadas mistas variam com x_{t-DCTN} .

Para melhor explorar a questão da miscibilidade do *t*-DCTN com os fosfolipídios escolhidos, estão representados os valores correspondentes do Π_{max} versus a fração molar do diterpenóide para os três sistemas binários investigados (Figura 10). Como pode ser visto, em ambos os casos do DBPC e DOPC, as propriedades interfaciais das misturas binárias parecem ser controlados pelos fosfolipídios até a fração molar de 50% de *t*-DCTN, e a mistura começa a ocorrer somente em concentrações elevadas do diterpenóide, quando a pressão de colapso varia de forma mais linear com a concentração relativa dos dois componentes. Embora um perfil similar com dois regimes também ocorre no sistema binário *t*-DCTN/DPPC, foi possível identificar a influência do diterpenóide na monocamada mesmo a baixas concentrações. Isso é consistente com a idéia atribuída a capacidade especial dos terpenos em deformar a interface lipídio-água (Turina et al., 2006), que no caso dos filmes mistos *t*-DCTN/DPPC (Figura 9b) pode ser favorecida pelas características mais expandida da matriz lipídica hospedeira.

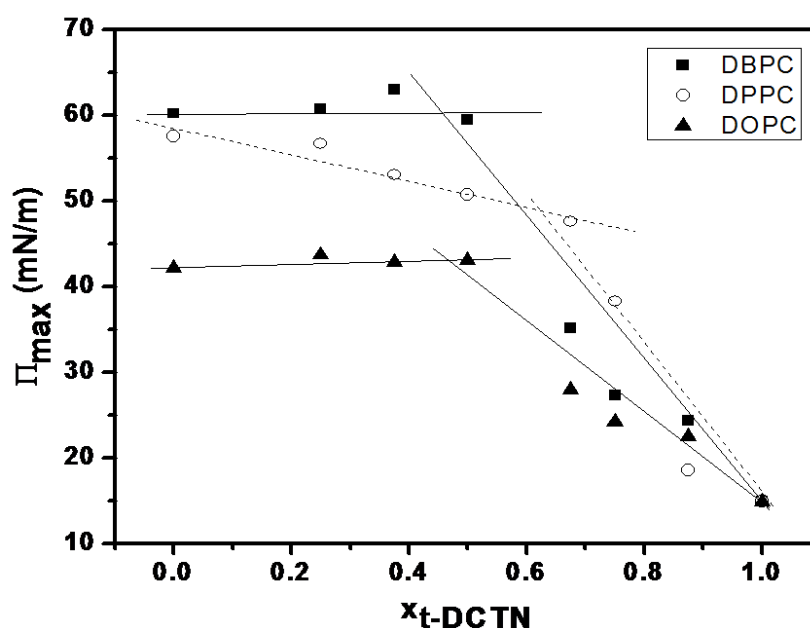


Figura 10 – Variação da Π_{max} dos sistemas binários compostos por *t*-DCTN/Fosfo versus concentração relativa do terpeno (x_{t-DCTN}).

É conhecido que o potencial de superfície de monocamadas de fosfolipídios é sensível à orientação das cadeias de hidrocarbonetos e à organização das cabeças polares na interface água-ar. Em adição, a agregação das moléculas anfifílicas resulta na formação de bolsões locais com uma polaridade muito diferente da subfase original, onde as moléculas hidrofóbicas podem ser acomodadas (Turina et al., 2006). Como um terpenóide, *t*-DCTN é um composto lipofílico, cuja interação com a parte hidrofóbica dos lipídios deve contribuir para efeitos visíveis tanto na organização estrutural anisotrópica quanto na organização dipolar das monocamadas flutuantes (Bard et al., 1988; Turina & Perillo, 2003). Na Figura 11, estão presentes as curvas das isotermas da variação de potencial de superfície das monocamadas mistas *t*-DCTN/fosfolipídios sob compressão. Para cada fosfolipídio, por comparação das diferentes isotermas de $\Delta V \times A$ obtidas com o aumento relativo da concentração do diterpeno, foi possível atribuir as mudanças observadas no perfil à existência de fases distintas de associação das duas espécies moleculares presentes na monocamada flutuante.

Geralmente, essas interações moleculares são detectadas por medidas de potencial na superfície em um estágio de compressão anterior as informações que podem ser obtidas a partir das isotermas de pressão de superfície. Por exemplo, os filmes mistos *t*-DCTN/DBPC (Figura 11a) mostram um aumento perceptível no potencial de superfície numa ΔA de $1,1 \text{ nm}^2$.

Há especial interesse na súbita elevação do potencial de superfície em relação aos primeiros estágios de compressão dos filmes do DPPC e, especialmente, para os filmes mistos do DOPC. Neste último caso, mesmo a frações molares de *t*-DCTN relativamente baixas ocorre um notável aumento no potencial de superfície devido ao assentamento de moléculas de terpeno nos bolsões disponíveis na distribuição das cadeias hidrocarbonadas insaturados do fosfolipídio. Mesmo a baixas pressões laterais, a organização mesoscópica dos lipídios no regime de coexistência G/LE, se assemelha à formação de um análogo bidimensional de espuma fluida/gás (Losche et al., 1983), o qual é alterado pela progressiva condensação lateral das moléculas *t*-DCTN. Em escala molecular, a organização dos grupos polares dos lipídios e/ou a sua associação com as moléculas de água na fase LE também é significativamente alterada pela adsorção do fármaco na interface.

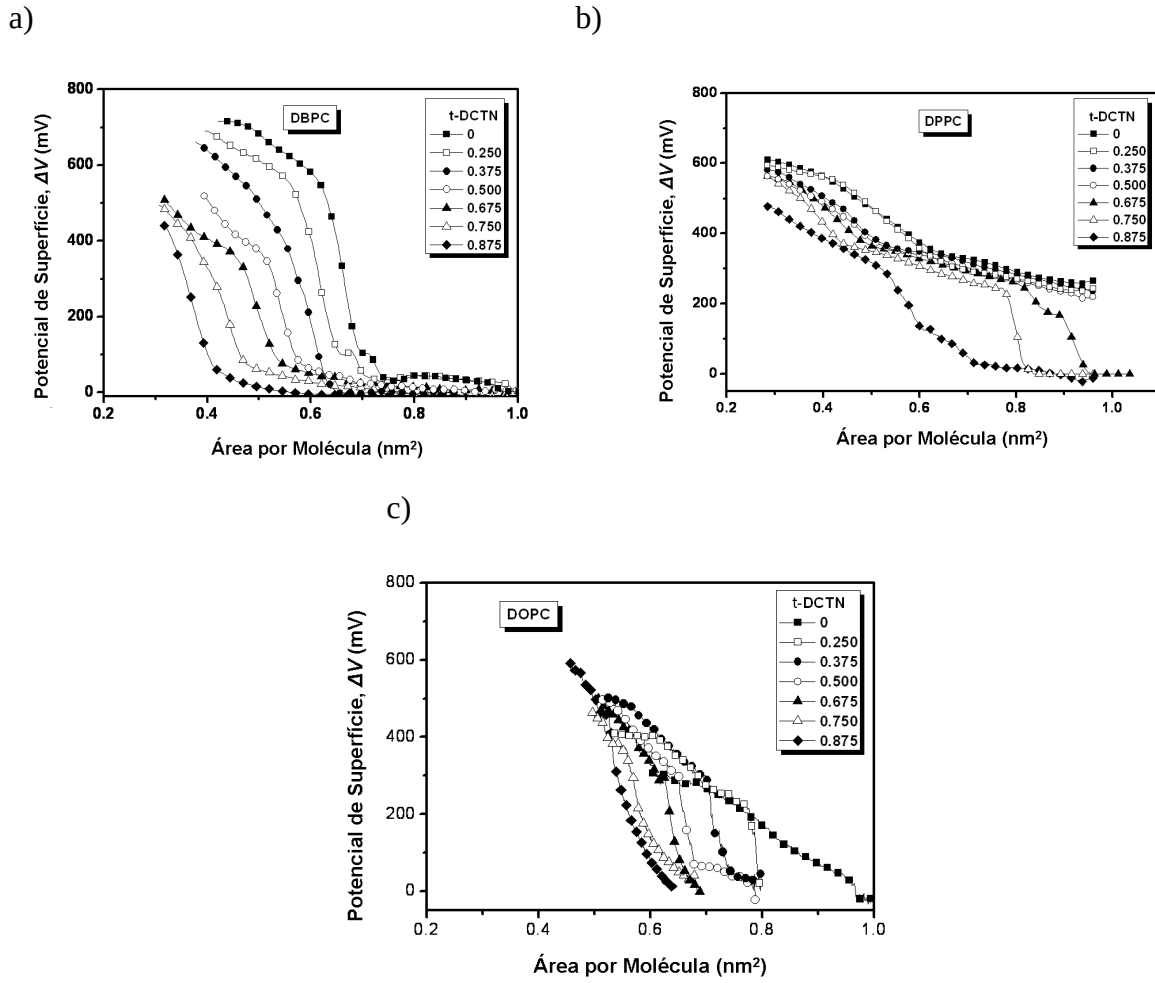


Figura 11 – Isotermas ΔV -A dos filmes mistos compostos por *t*-DCTN/Fosfo a diferentes concentrações relativas: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC.

Verificou-se um decréscimo do ΔV_{max} , ou seja, o valor máximo da medida do potencial de superfície (numa amm correspondente ao Π_{max}), com o aumento da fração molar de *t*-DCTN nas monocamadas mistas do sistema *t*-DCTN/DBPC. Um comportamento similar também foi observado para os filmes de *t*-DCTN/DPPC (Figura 11b), para os quais ocorre uma redução de ΔV_{max} de 610 mV ($x_{t-DCTN} = 0,250$) para 478 mV ($x_{t-DCTN} = 0,875$). Inversamente, nas monocamadas mistas *t*-DCTN/DPPC e *t*-DCTN/DOPC foram observados apenas poucas alterações no ΔV_{max} . Mais informações quantitativas podem ser obtidas a partir das isotermas de ΔV -A ao focarmos nos resultados do momento de dipolo por molécula, $\mu_{\perp}$,

obtidas das medidas do potencial de superfície segundo o modelo de Helmholtz (Hidalgo et al., 2004), na qual as moléculas são consideradas como um conjunto de dipolos, de modo que

$$\mu_{\perp} = \Delta V A \epsilon_0, \quad (7)$$

onde ϵ_0 é a permissividade do vácuo e a constante dielétrica efetiva assumida foi 1 para as monocamadas (uma discussão a respeito do valor das constantes dielétricas para monocamadas de Langmuir pode ser encontrada em Oliveira et al., 1992). Para um filme de Langmuir puro, a uma dada pressão de compressão os valores de ΔV (e, portanto, de $\mu_{\perp}$) refletem a atual orientação dos dipolos moleculares nas monocamadas lipídicas, como resultado da sua mútua interação lateral e da influência da subfase. Quando um fármaco é incorporado na monocamada lipídica flutuante, vários fatores podem contribuir para uma mudança nos valores de ΔV e $\mu_{\perp}$, e pode-se esperar que ambas as mudanças na conformação das moléculas lipídicas disposta na monocamada e a eventual reorganização da hidratação de moléculas de água devem afetar no valor medido do potencial de superfície. Tal modificação pode ser devido à inserção de moléculas lipofílicas em domínios hidrofóbicos, como resultado da auto-agregação das moléculas anfifílicas na monocamada flutuante.

Hidalgo e colaboradores (2004) já haviam salientado que a incorporação dos fármacos em monocamadas de fosfolipídios poderia afetar o $\mu_{\perp}$ não somente pela redução da carga de superfície efetiva das monocamadas de fosfolipídios, como também alterar a componente normal do momento dipolo da monocamada pela participação direta da polaridade do fármaco e modificando a contribuição dipolar das moléculas de fosfolipídios, devido à sua reorientação causada pela interação de espécies recém-introduzidas. Considerando a estrutura molecular da *t*-DCTN, deve-se esperar que as duas primeiras contribuições sejam insignificantes. A Figura 12 mostra uma forma conveniente para representar como os valores medido de $\mu_{\perp}$ nos filmes mistos variam de acordo com a compressão, representando as mudanças do $\mu_{\perp}/\mu_{\perp 0}$, onde $\mu_{\perp}$ e $\mu_{\perp 0}$ são os momentos de dipolo perpendicular aparente por molécula de monocamadas de fosfolipídios misto e puro, respectivamente. Em cada caso, os dados na Figura 12 foram tomados a uma amm que corresponde a uma pressão lateral de 15 mN/m, que é o valor da Π_{max} para o filme puro de *t*-DCTN. Portanto, o efeito mais importante da incorporação de *t*-DCTN está na alteração da componente vertical do momento de dipolo do único fosfolipídio insaturado (DOPC).

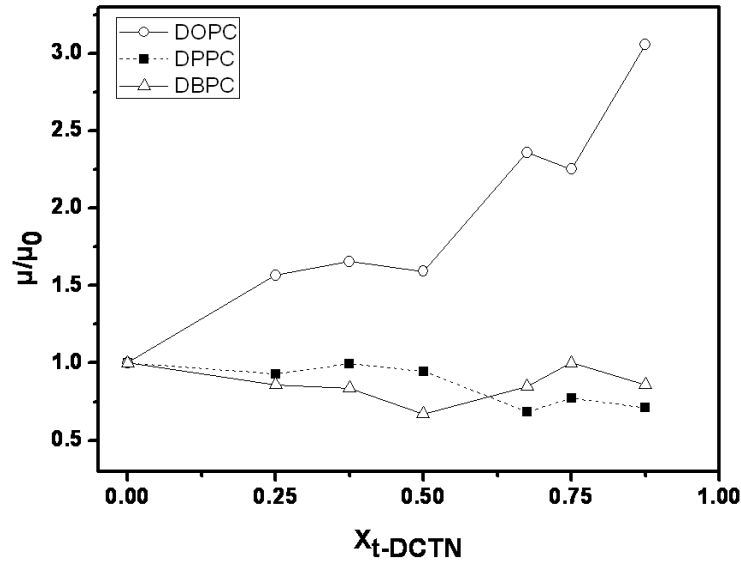


Figura 12 – Variação normalizada do momento de dipolo médio dos sistemas binário *t*-DCTN/Fosfo em filmes de Langmuir com a variação da fração molar do terpeno *t*-DCTN (x_{t-DCTN}). Para as monocamadas de fosfolipídios puros, x_{tDCTN} correspondem a 0,0.

Para uma melhor análise do comportamento físico-químico dos filmes mistos *t*-DCTN/fosfolipídio, foram utilizadas as isotermas *Π*-*A* correspondentes para determinação dos parâmetros termodinâmicos relevantes, tais como a área em excesso (ΔA^E), excesso de energia livre (ΔG^E) e energia livre de mistura (ΔG^M). O comportamento interfacial das monocamadas mistas *t*-DCTN/fosfolipídios pode ser analisado com base na regra da aditividade de área (Rosilio et al., 1996), através da equação

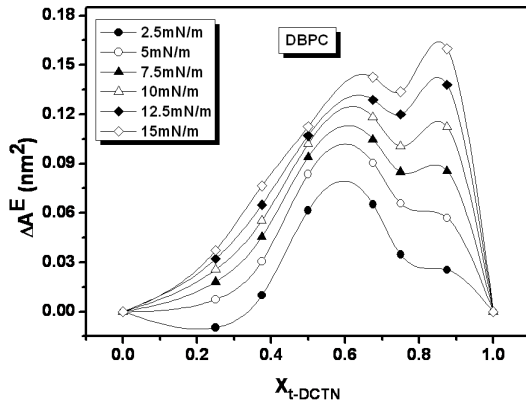
$$\Delta A^E = A_{12} - x_1 A_1 - x_2 A_2, \quad (8)$$

que relaciona a área molecular e concentração relativa de cada componente da mistura a uma dada pressão, onde A_1 e A_2 significa a área molecular de cada sistema de espécies puras 1 e 2, respectivamente, $A_{1,2}$ é a am observada para a sua mistura, e x_1 e x_2 correspondem às frações molares dos compostos 1 e 2, respectivamente. Desta forma, se uma monocamada mista ideal é formada (isto é, os dois componentes são completamente imiscíveis), a área em excesso será zero e o gráfico de $A_{1,2}$ em função de x_1 a uma dada pressão superfície será uma linha reta. Assim, qualquer desvio desta linearidade indicaria comportamento não ideal e que os componentes são miscíveis entre si.

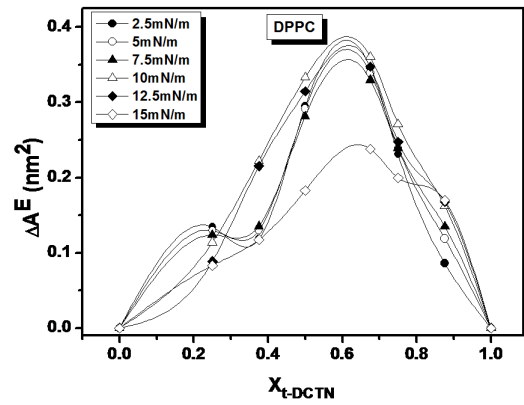
Uma vez que as relações não-lineares entre a área molecular e a fração molar foram observadas para as monocamadas mistas examinadas, os fosfolipídios e o *t*-DCTN foram

considerados miscíveis, formando monocamadas não-ideais na interface (Figura 13). Em cada caso, a área em excesso em função da composição apresentou desvios positivos que aumentaram em função dos valores de fração molar do *t*-DCTN, especialmente para altas pressões de superfície. Desta forma, para estes sistemas binários constituídos por *t*-DCTN/fosfolipídios, os valores de ΔA^E foram positivos para o DBPC, DPPC e DOPC com máximo nas seguintes x_{t-DCTN} de 0,875, 0,675 e 0,875, respectivamente, a elevadas pressões de superfície. O fato de que o desvio observado é principalmente positivo sugere que as interações entre os fosfolipídios e o *t*-DCTN foram mais fracas do que as forças existentes entre as moléculas dos filmes puros e que, portanto, os filmes mistos apresentam um grau de desordem relativamente elevado.

a)



b)



c)

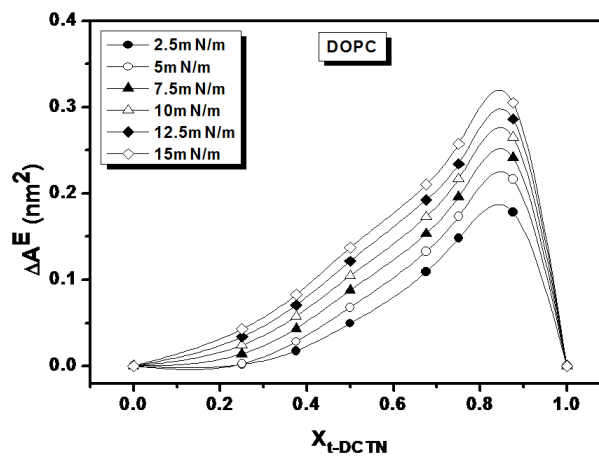


Figura 13 – Representação da área em excesso (ΔA^E) dos filmes mistos de Langmuir compostos por *t*-DCTN/Fosfo em função da fração molar do *t*-DCTN: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC.

Ambos os desvios da aditividade das áreas observadas na Figura 13 e as variações de Π em função da composição das monocamadas observadas na Figura 9 representam a miscibilidade dos fosfolipídios e *t*-DCTN na interface água-ar. Além disso, a magnitude das interações entre os fosfolipídios e o *t*-DCTN na interface modificam-se de acordo com variações da pressão de superfície (Figura 13). De fato, no caso de DOPC (Figura 13c) alguns valores de ΔA^E foram ligeiramente negativos a baixas pressões de superfície para $x_{t-DCTN} = 0,250$. Dessa forma, a valores menores de fração molar de *t*-DCTN há um efeito de condensação causado pelas forças intermoleculares atrativas resulta da acomodação geométrica forçada. Além disso, esses desvios negativos de ΔA^E não são vistos em elevadas pressões de superfície, uma situação nas quais as moléculas de fosfolipídios insaturados são forçadas a ocuparem volumes menores. Aparentemente, a acomodação do *t*-DCTN entre a dupla cadeia de fosfolipídios a elevadas pressões de superfície (especialmente para elevadas frações molares de *t*-DCTN) perturba o empacotamento das moléculas de fosfolipídios resultando em desvios positivos de ΔA^E .

Esta idéia é corroborada pela observação de que, na presença do *t*-DCTN, o início da transição de fase de líquido-expandido e líquido-condensado (LE-LC) nas monocamadas de DPPC é atrasada até pressões de superfície mais elevadas serem alcançadas; também, os componentes puros expandidos sofrem uma condensação ainda maior por causa desta mudança de fase. Na monocamada mista, a interação entre os componentes e a estabilidade termodinâmica relativa aos filmes dos componentes puros podem ser investigados a partir da avaliação da energia livre em excesso das misturas, ΔG^E , ou energia livre de mistura, ΔG^M (Pagano & Gershfeld, 1972). Para um processo de mistura onde duas monocamadas puras formam uma monocamada mista a uma dada pressão de superfície e sob temperatura constante, a expressão ΔG^E é dada como (Andrade et al., 2006)

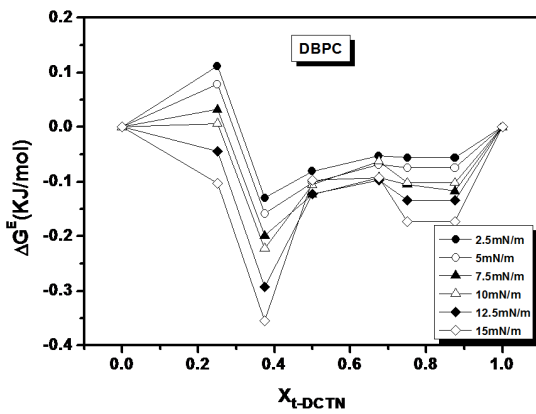
$$\Delta G^E = \int_0^{\Pi} \Delta A^E d\Pi, \quad (9)$$

onde Π é a pressão de superfície. Valores negativos de ΔG^E (Eq. 9) indicam uma atração mútua entre os componentes das monocamadas mistas, enquanto que os valores positivos caracterizam a existência de repulsão.

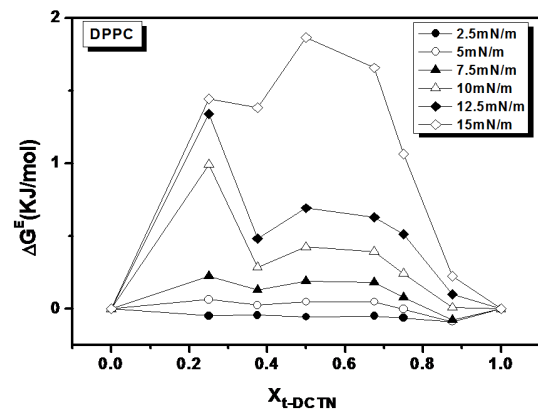
Na Figura 14 são observados valores positivos de ΔG^E para o sistema *t*-DCTN/DBPC a baixos valores de x_{t-DCTN} . Para o sistema *t*-DCTN/DPPC, valores positivos são visualizados

em toda a faixa de concentrações de *t*-DCTN (exceto para os casos de *t*-DCTN/DPPC a $\Pi=2,5$ mN/m), o que indica que as forças de interação entre os constituintes dos filmes mistos são menos atrativas do que aqueles presentes nos filmes individuais (Chou & Chang, 2000). Inversamente, observaram-se as interações moleculares atrativas existentes entre os dois componentes dos filmes mistos de *t*-DCTN/DBPC e *t*-DCTN/DOPC. Além disso, os valores de ΔG^E tornaram-se mais negativos quando as pressões da superfície lateral foram aumentadas, o que implica que o grau de interação molecular foi reforçado com o rearranjo das moléculas na interface. Valores mínimos de ΔG^E de -0,354 e -0,275 foram identificados para os filmes mistos *t*-DCTN/DBPC e *t*-DCTN/DOPC, a $x_{t-DCTN} = 0,375$ e 0,500, ou seja, uma fração molar que deve corresponder à composição mais estável dos filmes mistos de *t*-DCTN/fosfolipídios.

a)



b)



c)

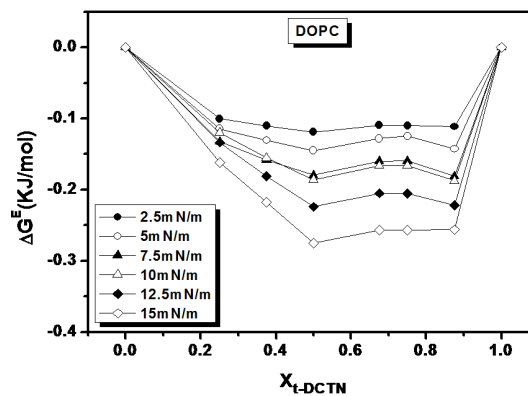


Figura 14 – Energia livre em excesso (ΔG^E) em função da fração molar de *t*-DCTN: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC.

Em adição, também é conhecido (Kodama et al., 2004; Andrade et al., 2006) que

$$\Delta G^M = \Delta G^E + \Delta G^{ID}, \quad (10)$$

$$e \Delta G^{ID} = RT(x_1 \ln x_1 + x_2 \ln x_2), \quad (11)$$

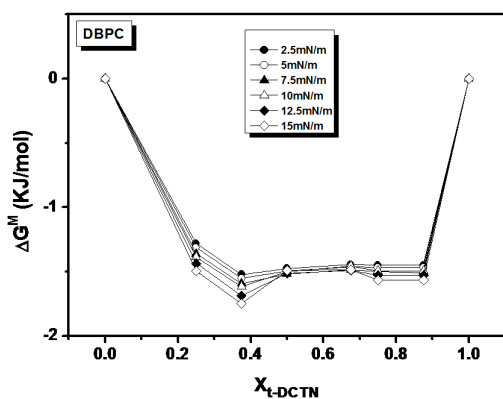
onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. A Eq. 10 fornece informações sobre a interação e estabilidade das misturas dos componentes, ou seja, na ausência de qualquer interação específica entre os componentes temos ΔG igual a zero. Desvios do comportamento ideal resultam em $\Delta G^M < 0$ (interações atrativas) e $\Delta G^M > 0$ (interações repulsivas). Assim, um sinal negativo é a prova de que uma interação particular é energeticamente favorecida quando comparado a uma mistura ideal, onde não existem interações intermoleculares.

Análises termodinâmicas de ΔG^M dos fosfolipídios puros, t -DCTN e os sistemas binários são mostrados na Figura 15. Para os sistemas binários t -DCTN/DBPC e t -DCTN/DOPC, a máxima estabilidade foi obtida para valores de $x_{t-DCTN} = 0,375$ e $0,500$, respectivamente, a uma pressão de superfície de 15 mN/m com valores máximos de $\Delta G^M = -1,7 \text{ kJ/mol}$. Inversamente, foram observados valores positivos em altas pressões para o sistema t -DCTN/DPPC. Baseado na análise de ΔG^M , a estabilidade dos sistemas binários t -DCTN/fosfolipídios parece depender da interação hidrofóbica do t -DCTN com as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios. As diferenças entre os valores de ΔG^M das monocamadas mistas podem ser correlacionados com a estrutura e comprimento das longas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios. O DOPC é um fosfolipídio com cadeia hidrocarbonada insaturada que apresenta uma isoterma Π -A com um perfil expandido. No caso do DOPC, quando misturado ao t -DCTN, os valores calculados de ΔA^E e de ΔG^E foram relativamente pequenos quando comparados com as misturas do t -DCTN com os outros dois fosfolipídios. Como mencionado previamente, foi encontrado um valor especialmente baixo para o ΔG^E a $x_{t-DCTN} = 0,500$. Podemos salientar que os valores de ΔG^M mostraram que o DOPC e o t -DCTN possuem boa miscibilidade.

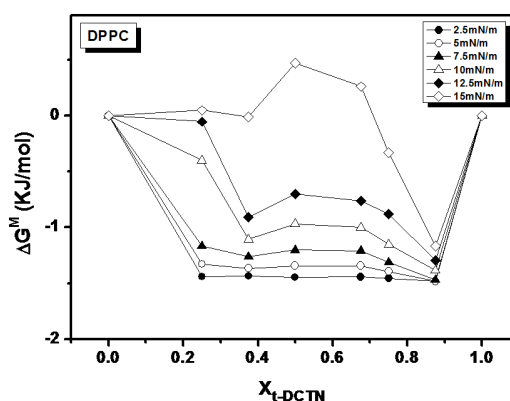
A mistura de t -DCTN/DPPC foi o único sistema binário em que uma interação desfavorável foi observada. Todos os cálculos foram feitos na faixa de pressão de superfície abaixo ou perto da transição de LE-LC do DPPC, uma região da isoterma onde o estado físico da monocamada não foi bem definido e, portanto, onde a presença de moléculas t -DCTN foi mais susceptível a causar perturbação da organização espacial da monocamada (Bard et al.,

1988) e de sua estrutura dipolar (Turina & Perillo, 2003). No entanto, a $\Pi=15$ mN/m, a transição estrutural da monocamada de DPPC finaliza e a segregação de domínios isolados de DPPC e *t*-DCTN aparentemente começam a ocorrer. Previamente, alguns autores (Turina et al., 2006), estudando a solubilidade de terpenos encontraram um comportamento de auto-agregação desta classe de moléculas. Além disso, uma auto-associação de fármacos hidrofóbicos pode ser explicada como estruturas empilhadas, crescendo através de um mecanismo de associação de forma contínua (Mukerjee, 1974) ou estruturas tubulares em três dimensões (Caetano et al., 2002).

a)



b)



c)

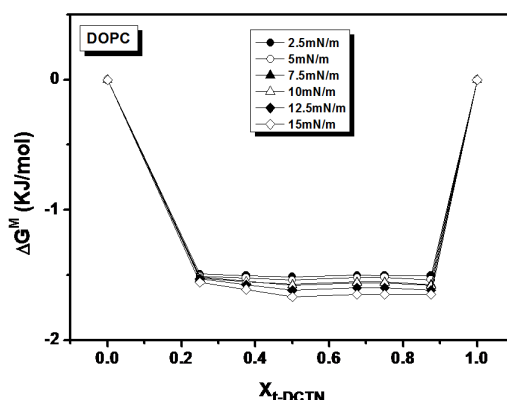


Figura 15 – Energia livre de mistura (ΔG^M) dos filmes mistos de Langmuir contendo *t*-DCTN/Fosfo em função da fração molar de *t*-DCTN: (a) Fosfo=DBPC, (b) Fosfo=DPPC e (c) Fosfo=DOPC.

A partir dos valores de ΔG^E , é evidente que mistura de *t*-DCTN/DOPC foi aquela mais favorável, uma vez que estes valores foram negativos para todas as frações molares de *t*-DCTN. A pressão de superfície compensou os desvios positivos na área molecular, sendo confirmado pelos valores de ΔG^M . No caso do *t*-DCTN/DOPC, devido à natureza da insaturação das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios, os filmes mistos resultantes foram mais fluidos, resultando numa melhor reorganização das moléculas *t*-DCTN nestas monocamadas flutuantes. Portanto, este sistema binário foi o que apresentou uma elevada estabilidade, associado aos valores mais negativos de ΔG^M . A expansão das monocamadas, tal como se observa nos valores de ΔA^E , especialmente, para elevadas frações molares de *t*-DCTN, sugeriram que as moléculas de *t*-DCTN não misturam idealmente com os fosfolipídios, ou seja, os componentes das misturas binárias são miscíveis entre si, porém exibem uma tendência de interagirem entre si e formarem grupos isolados ou aglomerados.

6) CONCLUSÃO

- Os componentes puros das monocamadas mistas de *t*-DCTN/fosfolipídios apresentaram maior ordem na orientação das moléculas na interface para valores intermediários de fração molar do *t*-DCTN.
- Há um efeito de condensação quando a *t*-DCTN está presente nas monocamadas de fosfolipídios.
- As isotermas de pressão de superfície (Π - A) para todos os sistemas binários demonstraram miscibilidade entre os componentes dos filmes mistos.
- Os grupos polares dos fosfolipídios não afetaram significativamente o empacotamento das cadeias hidrocarbonadas quando misturados com o *t*-DCTN e os efeitos hidrofóbicos prevaleceram sobre as forças atrativas associado à presença de grupos polares.
- As análises termodinâmicas confirmam a existência de miscibilidade devido a presença de desvios negativos em relação ao comportamento ideal.
- Os parâmetros de área em excesso (ΔA^E) indicaram a existência de interações intermoleculares fracas entre os componentes mistos quando comparado com os puros devido à desvios positivos.
- A energia livre em excesso (ΔG^E) e de mistura (ΔG^M) indicaram que as interações formadas são do tipo atrativas e que as monocamadas mistas foram estáveis devido aos seus valores negativos.
- Dentre os sistemas analisados, o sistema binário composto por *t*-DCTN/DOPC foi o que demonstrou maior estabilidade das monocamadas na interface por apresentarem desvios negativos mais significativos de energia livre de mistura (ΔG^M).

7) PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho é a obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos (lipossomas) levando em consideração as análises físico-químicas dos filmes mistos entre os fosfolipídios e o diterpeno *trans*-Desidrocrotonina (*t*-DCTN).

No entanto, deverá ser realizada a análise dos valores de cargas de superfície dos lipossomas através de medidas de potencial zeta e análise do diâmetro médio por espalhamento de luz para caracterizar os lipossomas contendo o fitofármaco. Tais análises devem ser corroboradas por uma análise morfológica feita através do uso das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Em adição, pretendemos realizar testes de atividade antiinflamatória através do edema de pata utilizando o fármaco (*t*-DCTN) livre e encapsulado nos lipossomas.

REFERÊNCIAS

ALLEN, T. M; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: Entering the mainstream, **Science**, v. 303, n.5665, p.1818-1822, 2004.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M.M.G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 20, p.101-105, 2005.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, n.2-3, p.261-274. 2003.

ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MELO, C. P. Thermodynamic characterization of the prevailing molecular interactions in mixed floating monolayers of phospholipids and usnic acid, **Journal of Colloids and Interface Science**, v. 298, p.145-153, 2006.

ANDRADE, C. A. S.; BASZKIN, A.; SANTOS-MAGALHAES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. P. Mixed monolayers of Bauhinia monandra and Concanavalin A lectins with phospholipids, part II, **Journal Colloid and Interface Science**, v. 289, p.379-385, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, p.677, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Data SUS - Financiamento da Atenção à Saúde no Brasil. Disponível em:
<<http://www.datasus.gov.br/cns/11Conferencia/relatorio/FINANCIAMENTO%20DA%20ATENCAO.htm>>. Acesso em: 29/11/2009.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>>. Acesso em: 05/05/2010.

BARD, M.; ALBRECHT, M.R.; GUPTA, N.; GUYNN, C.J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*, **Lipids**, v. 23, p.534-538, 1988.

BENVEGNO, D.J.; MCCONNELL, H.M. Line Tension between Liquid Domains in Lipid Monolayers, **Journal Physical Chemistry**, v. 96, p.6820-6824, 1992.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1059, 2004.

BERINGER, P. **Remington, the science and practice of pharmacy**. 21st ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, p.2393, 2006.

BERKLAND, C.; KING, M.; COX, A.; KIM, K.; PACK, D. W. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. **Journal of Controlled Release**, v.82, n.1, p.137-147, 2002.

CAETANO, W.; GELAMO, E.L.; TABAK, M.; ITRI, R. Chlorpromazine and sodium dodecyl sulfate mixed micelles investigated by small angle X-ray scattering, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 248, p.149-157, 2002.

CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 752, 2000.

CARVALHO, J. C. T.; SILVA, M. F. C.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v.62, n.5, p.402-404, 1996.

CHATTORAJ, D.K.; BIRDI, K.S. **Adsorption and the Gibbs Surface Excess**, Plenum Press, New York, 1984.

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

DERRICK, M. E. Agnes Pockels, 1862-1935. **Journal of Chemical Education**, v.59, n.12, p.1030-1031, 1982.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v.68, n.5, p.1432-1441, 2006.

FANG, K.; ZOU G.; HE, P.; SHENG, X.; LU, C. Thermodynamic characterization of mixed monolayers of phosphatidylcholine and arachidic acid on different subphases. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.224, n.1-3, p.53-63, 2003.

FARIAS, R. A. F.; RAO, V. S. N.; VIANA, G. S. B.; SILVEIRA, E. R.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v.63, n.6, p.558-560, 1997.

FERNÁNDEZ-BOTELLO, A.; COMELLES, F.; ALSINA, M. A.; CEA, P.; REIG, F. A monolayer study on interactions of docetaxel with model lipid membranes **Journal Physical Chemistry B**, v. 112, n.44, p. 13834-13841, 2008.

FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA, O. N. Characterization techniques to investigate molecular-level interactions in Langmuir and Langmuir-Blodgett. **Química Nova**, v.28, n.3, p.502-510. 2005.

Folha de São Paulo. Em crise, filantrópicos culpam governo por sucateamento de hospitais. 2003. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u77190.shtml>>. Acesso em: 29/11/2009.

GADELHA, C. A. G. O complexo industrial da saúde e a necessidade de um enfoque dinâmico na economia da saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.8, n.2, p.521-535, 2003.

GADELHA, C. A. G. Desenvolvimento, Complexo industrial da Saúde e Política Industrial **Revista de Saúde Pública**, v. 40 (N Esp), p.11-23, 2006.

GAMBINOSI, F.; MECHEI, B.; CAMINATI, G.; NOCENTINI, M.; PUGGELLI, M.; GABRIELLI, G. Antibiotic interaction with phospholipid monolayers, **Materials Science and Engineering C**, v. 22, p.283-288, 2002.

GAINES, G.L. **Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces**. New York, Interscience Publishers. xiv, p. 386, 1966a.

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

GEHLERT, U.; VOLLHARDT, D. Nonequilibrium structures in 1-monopalmitoyl-rac-glycerol monolayers, **Langmuir**, v.13, p.277-282, 1997.

GOBERNADO-MITRE, M. I.; AROCA, R.; DESAJA, J. A. Surface Pressure-Area Isotherms of Copper Tetra-tert-butylphthalocyanine **Langmuir**, v. 11, n.2, p.547-550, 1995.

GOODWIN, J. W. **Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers – An Introduction**, Ed. John Wiley & Sons Ltd, p.289, 2004.

GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J. E. S.; PAMPLONA, S. R.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v.65, n.8, p.687-689, 1999.

GZYL-MALCHER, B.; HANDZLIK, J.; NOWAK-STĘPNIEWSKA, A. Interactions of phenytoin with lipids in mixed Langmuir monolayer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 321, n.1-3, p.52-59, 2008.

HAĆ-WYDRO, K.; KAPUSTA, J.; JAGODA, A.; WYDRO, P.; DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P. The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene

antifungal antibiotic: A Langmuir monolayer study, **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 150, n.2, p.125-135, 2007.

HERNÁNDEZ-CASELLES, T.; VILLALÁIN, J.; GÓMES-FERNÁNDEZ, J. C. Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 120, p. 119-126, 1993.

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

HIEMENZ, P. C. **Principles of colloids and surface chemistry**, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 1986.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Medica** v. 65, p.325-330, 1999.

HUGHES, A. V.; HOWSE, J. R.; DABKOWSKA, A.; JONES, R. A. L.; LAWRENSE, M. J.; ROSER, S. J. Floating lipid bilayer deposited on chemically grafted phosphatidylcholine surfaces, **Langmuir**, v. 24, p. 1989-1999, 2008.

ISE, N.; SOGAMI, I. S., **Structure Formation In Solution: Ionic Polymers and Colloidal Particles**. New York, Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2005.

JASPER, J. J.; HOUSEMAN, B. L. The interfacial surface pressure of soluble alcohol monolayers at the water-octane interface, **Journal of Physical Chemistry**, v. 67 (7), p.1548–1551, 1963.

JONES, M. N. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterization, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 54, p.93-128, 1995.

KIRBY, C.; CLARKE, J.; GREGORIADIS, G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*, **Biochemistry Journal**, v. 186, p.591-598, 1980.

KODAMA, M.; SHIBATA, O.; NAKAMURA, S.; LEE, S.; SUGIHARA, G. A monolayer study on three binary mixed systems of dipalmitoyl phosphatidyl choline with cholesterol, cholestanol and stigmaterol, **Colloids and Surfaces B**, v. 33, p.211-226, 2004.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes, **Trends in Biotechnology**, v.16, n.7, p.307-321, 1998.

LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation, **Biochemical Journal**, v. 256, p.1-11, 1988.

LASIC, D.D. Liposomes, **Recherche**, v. 20, n° 212, p.904-913, 1989.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, p.1202, 2006.

LEE, K.Y.C. Collapse mechanisms of Langmuir monolayers, **Annual Reviews Physical Chemistry**, v. 59, p.771-791, 2008.

LOSCHÉ, M.; SACKMANN, E.; MOHWALD, H. A fluorescence microscopic study concerning the phase-diagram of phospholipids, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 87, p.848-852, 1983.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; COLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.1, p.41-55, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; DA SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*, **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p.823-828, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R. NMR and structure review of some natural furoclerodanes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.41, n.4, p.278-282, 2003.

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

MCCONLOGUE, C.W.; VANDERLICK, T.K. A close look at domain formation in DPPC monolayers, **Langmuir**, v.13, p.7158-7164, 1997.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C. M. S.; DELVINO, F. M.; SILVA, V. D. M.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, A. C. Estabilidade e Avaliação Sensorial de Lipossomas Contendo Hidrolisados de Caseína, **Brazilian journal of food tecnology**, v.6, nº 2, p.213-220, 2003.

MUKERJEE, P. Micellar properties of drugs: micellar and nonmicellar patterns of self-association of hydrophobic solutes of different molecular structures—monomer fraction, availability, and misuses of micellar hypothesis, **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 63, p.972-981, 1974.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**, 2^a Ed. John Wiley & Sons Ltd, p.519, 1999.

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

OLIVEIRA JR., O. N. **Electrical Properties of Langmuir Monolayers and Deposited Langmuir-Blodgett Films**. Bangor, Gwynedd, United Kingdom: University of Wales, 1990. 138 p. Tese (Doutorado) – School of Electronic Engineering Science, University of Wales, Bangor, Gwynedd, 1990.

PAGANO, R.E.; GERSHFELD, N.L. Physical chemistry of lipid films at the air-water interface. II. Binary lipid mixtures. The principles governing miscibility of lipids in surfaces, **Journal Physical Chemistry**, v. 76, p.1238-1243, 1972.

PARK, Y.; HUANG, R.; CORTI, D. S.; FRANCES, E. I. Colloidal dispersion stability of unilamellar DPPC vesicles in aqueous electrolyte solutions and comparisons to predictions of the DLVO theory, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 342, n.2, p.300-310, 2010.

PERES, M. T., DELLE MONACHE, F., CRUZ, A. B., PIZZOLATTI, M. G. AND YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.56, n.3, p.223-226, 1997.

PIOVESAN, G. PD&I – Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. Disponível em: <http://www.protec.org.br/arquivos/eventos/download/Giuliana_Piovesan_Alves.pdf>. Acesso em: 20/01/2010.

POERSCH, A.; DOS SANTOS, F. V.; MACIEL, M. A. M; DE CAMARA, J. K.; DE CASTRO DANTAS, T. N.; DE SYLLOS COLUS, I. M. Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. **Mutation Research**, v.629, n.1, p.14-23, 2007.

POOLE, C. P. Jr.; OWENS, F. J. **Introduction to nanotechnology**, Ed. John Wiley & Sons, Inc., p. 400, 2003.

QUEIROZ, S.; CARVALHO, R. de Q. Empresas multinacionais e inovação tecnológica no Brasil. **São Paulo Perspectiva.**, v.19, n.2, p. 51-59, 2005.

QUINN, P. J.; WOLF, C. The liquid-ordered phase in membranes, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p.33–46, 2009.

RAVI KUMAR, M. N. V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.2, p.234-58, 2000.

ROBERTS, G. G. **Langmuir-Blodgett films**. New York: Plenum Press. xiv, p.425, 1990.

RODRIGUEZ, J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Human & Experimental Toxicology**, v.23, n.9, p.455-461, 2004.

RODRIGUEZ, J. A.; HAUN M. Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. **Planta Medica**, v.65, n.6, p.522-526. 1999.

ROMAO, R. I.; GONCALVES DA SILVA, A. M. Phase behaviour and morphology of binary mixtures of DPPC with stearonitrile, stearic acid, and octadecanol at the air-water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.131, n.1, p.27-39, 2004.

ROSILIO, V.; ALBRECHT, G.; OKUMURA, Y.; SUNAMOTO, J.; BASZKIN, A. Surface properties and miscibility of monolayers of dimyristoylphosphatidylcholine and poly(ethylene oxide) lipids at the water/air interface, **Langmuir**, v. 12, p.2544-2550, 1996.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1181-1185, 2002.

SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.3, n.6, p.452-456, 2001.

SINKO, P. J. **Martin - Físico-Farmácia e Ciências Farmacêuticas** - 5ª Ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 809, 2008.

SUŁKOWSKI, W.W.; PENTAK, D.; NOWAK, K.; SUŁKOWSKA, A. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability, **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p.737–747, 2005.

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C.R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery, **Peptides**, v. 31, n.1, p.184-193, 2010.

TERMINASSIANSARAGA, L. Cooperativity of an acid phospholipid reaction with basic hydrophobic polyelectrolytes or with the apoprotein proteolipid from myelin, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 70, p.245-264, 1979.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.2, p.145-160, 2005.

TORCHILIN, V. P. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 9, n. 2, 2007.

TURINA, A.D.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning, **Biophysical Chemistry**, v. 122, p.101-113, 2006.

TURINA, A.V.; PERILLO, M.A. Monoterpenes affect chlorodiazepoxide-micelle interaction through micellar dipole potential modifications, **Biochimistry Biophysical Acta**, v. 1616, p. 112-120, 2003.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

WU, S.; HUNTSBER, J. R. Intermolecular interaction in some mixed polymer monolayers at air water interface, **Journal Colloid and Interface Science**, v. 29, p.138-147, 1969.

YBERT, C.; LU, W.X.; MOLLER, G.; KNOBLER, C.M. Collapse of a monolayer by three mechanisms, **Journal Physical Chemistry B**, v.106, p.2004-2008, 2002.

APÊNDICE

Artigo Científico publicado no periódico:
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

Thermodynamic investigation of mixed monolayers of *trans*-dehydrocrotonin and phospholipids

Jadilson M. Nascimento Filho^a, Celso P. de Melo^b, Nereide S. Santos-Magalhães^{a,c},
Véronique Rosilio^d, Maria A.M. Maciel^e, Cesar A.S. Andrade^{a,f,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^d Univ Paris-Sud, UMR 8612 CNRS, Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

^e Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^f Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2009

Received in revised form 6 January 2010

Accepted 11 January 2010

Available online 18 January 2010

Keywords:

Langmuir films

Trans-dehydrocrotonin

Phospholipids

Thermodynamics

ABSTRACT

The thermodynamic behavior of mixed floating monolayers of zwitterionic phospholipids and *trans*-dehydrocrotonin (*t*-DCTN) at different molar fractions (x) of the diterpene has been investigated by measuring the surface pressure and surface potential Langmuir isotherms. Excess Gibbs energies of mixing have been calculated for different compositions of the floating monolayer at varying surface pressure values. Spreading of pure *t*-DCTN molecules at the air–water interface resulted in a compressed-type isotherm. For the *t*-DCTN/DBPC and *t*-DCTN/DOPC binary systems, the maximum stability was obtained at $x_{t-DCTN} = 0.375$ and 0.500 at a surface pressure of 15 mN/m , with a minimum ΔG^M value equal to -1.7 kJ/mol . The analyses of the obtained thermodynamic parameters such as excess areas, excess free energies and free energy of mixing confirmed the miscibility of the phospholipids and *t*-DCTN in the binary systems. In these mixed monolayers, the phospholipid molecules seemed to exhibit higher long-range orientation order for intermediary values of *t*-DCTN molar fractions. As a whole, the above observations suggest that the *t*-DCTN molecules exert a condensing effect on the monolayers when mixed with the phospholipids.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trans-dehydrocrotonin (*t*-DCTN) is a terpenoid molecule (19-nor-diterpene) extracted from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), a native plant from the Amazon region known as cajucara or sacaca [1,2]. Among other applications of this plant, teas prepared from the *C. cajucara* leaves and stem-bark have been commonly used in popular medicine due to its therapeutic actions as hypoglycemic [3] and hypophospholipidemic [4], and its potential as an antitumoral [5], antimutagenic [6] and anti-inflammatory agent [7].

It has been established, however, that chronic patients treated with *C. cajucara* bark tea suffered some toxic effects [8], with a low bioavailability of *t*-DCTN found in their biological fluids [9,10], a fact attributed to the highly hydrophobic characteristics of the *t*-

DCTN molecule. Therefore, the study of the interfacial properties of this diterpene and the determination of its physical–chemical characteristics appear as timely complementary information in the evaluation of the encapsulation of *t*-DCTN in drug delivery systems, such as liposomes. As carrier systems for controlled drug release, when applied in the optimization of administration of drugs liposomes can lead to a beneficial improvement in both the bioavailability and toxicity reduction of the corresponding active agents [11].

In this paper, we have carried out Langmuir isotherm measurements to examine the molecular interactions that prevail in mixed floating films of phospholipids (such as those typically used as liposome constituents) at different molar fractions of the *t*-DCTN molecule. Initially, the qualitative aspects of the interactions between zwitterionic phospholipids (PLD) and the chosen diterpene were derived by comparing the surface pressure (Π – A) and surface potential versus area (ΔV – A) isotherm curves [12] corresponding to pure and mixed monolayers. Since thermodynamic studies have been shown to be convenient tools for investigation of interfacial properties of floating monolayers and to assess the miscibility of its constituents [13], we have calculated

* Corresponding author at: Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, s/n, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil. Tel.: +55 81 3523 3351; fax: +55 81 3523 3351.

E-mail address: csrandrade@gmail.com (C.A.S. Andrade).

excess areas (ΔA^E), excess free energies (ΔG^E) and free energy of mixing (ΔG^M) as a manner of evaluating the prevalent interactions [14,15] in the mixed *t*-DCTN/phospholipid monolayers. The behavior of floating monolayers of many of such (hydrophobic molecules)/phospholipid mixtures has been previously investigated [16,17] as a function of the mixing ratios of their constituents.

2. Methodology

2.1. Materials

Buffer solutions of citrate (sodium citrate)–phosphate (pH 7.4) were prepared with water obtained by osmosis from an ultrapure water system (NANOpure-Barnstead). The specific resistivity of the water was $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ (pH 5.6 in equilibrium with atmospheric carbon dioxide) and the typical 20°C value of its surface tension was 72.2 mN/m . The phospholipids (Fig. 1) D,L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, C16:0), L- α -dibehenoylphosphatidylcholine (DBPC, C22:0) and L- α -dioleoylphosphatidylcholine (DOPC, C18:1) with 99% purity were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Louis, United States of America). Chloroform and methanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The diterpene used was *trans*-dehydrocrotonin (*t*-DCTN) (Fig. 1), which was extracted and purified from the bark of *C. cajucara* [18] by one of the authors (MAMM).

2.2. Surface pressure and surface potential measurements

The measurements of surface pressure (Π) versus molecular area (A) isotherms of pure and mixed *t*-DCTN/phospholipid monolayers were performed at a compression rate of 10.0 mm/min in an autorecording Langmuir-type film trough (KSV 5000, Finland), with a total area of $850.00 \pm 0.05 \text{ cm}^2$. The system was equipped with a Wilhelmy plate, and the surface pressure was measured with an

accuracy of $\pm 0.1 \text{ mN/m}$. Initially, while *t*-DCTN was dissolved in chloroform to result in a 6 mM stock solution, 0.1 mM solutions of *t*-DCTN, DPPC, DBPC and DOPC (i.e. $\sim 1.7 \times 10^{15}$ molecules/ μL in all cases) were prepared in a 9:1 (v/v) mixture of chloroform and methanol. Then mixed solutions of *t*-DCTN/phospholipid with different molar ratio ($x = \{0.250, 0.375, 0.500, 0.675, 0.750 \text{ and } 0.875\}$) of *t*-DCTN were prepared using adequate aliquots of pure solutions of the diterpene and the phospholipids. Both for the case of pure and mixed monolayers, $100 \mu\text{L}$ of the organic solution were carefully spread at the surface of a buffer citrate–phosphate bulk solution (pH 7.4; 10^{-2} M ionic strength) at a temperature of $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Using the vibrating plate method [17] ($\nu = 300 \text{ Hz}$), the surface potential (ΔV) of pure and mixed *t*-DCTN/phospholipid monolayers was measured with a KSV Kelvin apparatus with the probe electrode located at approximately 2–3 mm above the water surface, and the surface potential was determined with an accuracy of $\pm 10 \text{ mV}$. Data were collected using the KSV software, and while Π and ΔV isotherms are presented by taking the average value of at least three independent measurements, all deviations of the surface area values were smaller than $\pm 1 \text{ \AA}^2$.

3. Results and discussion

In all cases examined, the surface pressure–area isotherms were recorded during the lateral compression of the air interface of a buffer citrate–phosphate bulk solution until a maximum value Π_{max} of the lateral pressure supported by the Langmuir films was attained. Note that Π_{max} does not necessarily correspond to a collapse pressure of the Langmuir film, since in several instances this maximum value is reached but no hint of an imminent 2D–3D transition in the structure of the floating monolayer can be identified. The formation of three-dimensional structures, either by growth into the subphase, or by folding of double layers atop the floating monolayer, is a hallmark of a “true” collapsed Langmuir film

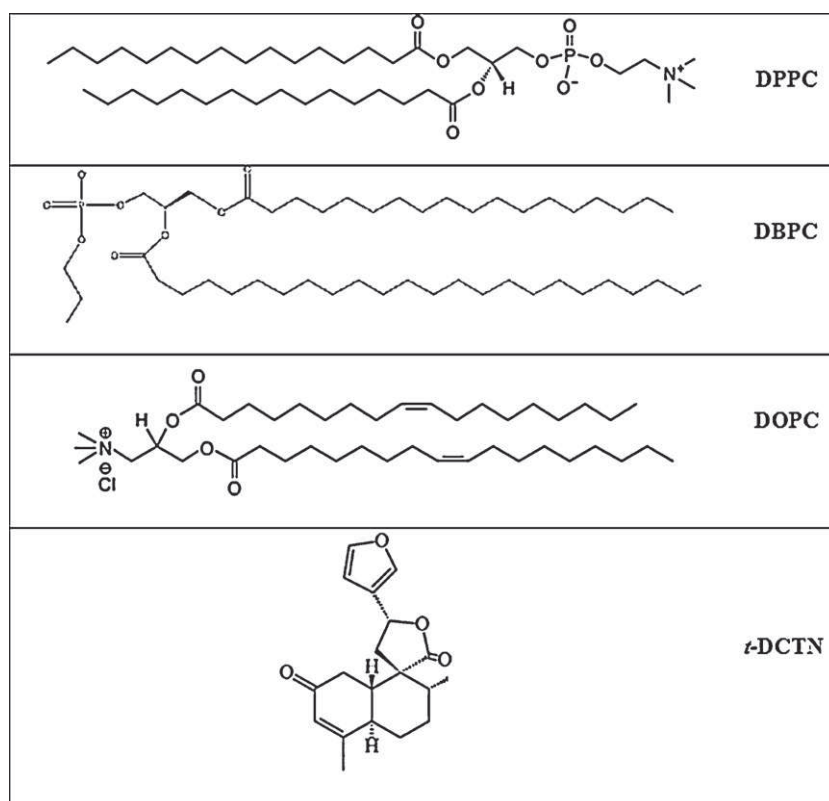


Fig. 1. Molecular structure of phospholipids used in this work and of *t*-DCTN.

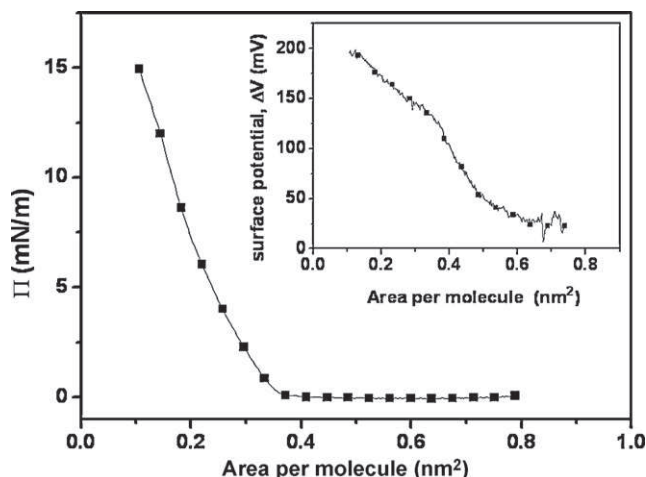


Fig. 2. Pure *t*-DCTN floating monolayer: Π - A isotherm (inset: ΔV - A isotherm).

[19,20]. Experiments with the *t*-DCTN/phospholipid binary systems were performed at pH 7.4, a value intentionally chosen to enlarge the possibility of using the knowledge eventually acquired in the development of new drug delivery systems.

The lateral compression of pure *t*-DCTN molecules spread at air–water interface follows a compressed-type isotherm (Fig. 2) but no true collapse pressure is observed at the end of the compression cycle, where a mean molecular area (*mma*) of 0.31 nm² was attained at the maximum pressure equal to 15 mN/m. In the corresponding ΔV - A compression profile (inset of Fig. 2), one can see that a noticeable surface potential can be measured even when the monolayer is at a relatively expanded state (e.g., at the *mma* for which the surface pressure begins to lift-off, the surface potential has already reached values close to 125 mV). As usual, the value of the *mma* at a given surface pressure is obtained by the intersection of the tangent line to the isotherm curve with the horizontal axis.

To obtain further information about the stability of liposomes composed by *t*-DCTN/phospholipid mixtures, we performed experiments using binary systems with different molar fractions of the components (Fig. 3). First, we note that in general terms the Π - A isotherms of pure DBPC (*mma* = 0.54 nm², Π_c = 60.0 mN/m), DPPC (*mma* = 0.56 nm², Π_c = 57.7 mN/m) and DOPC (*mma* = 0.83 nm², Π_c = 42.1 mN/m) also shown in Fig. 3a–c are in close agreement with those of the literature [21,22]. The pure DBPC and DPPC films showed a condensed profile, contrarily to DOPC which exhibited a fluid or liquid-expanded (LE) phase with no evidence of a liquid-expanded–liquid-condensed (LE–LC) phase transition up to the point of maximum lateral pressure of the monolayer, which in this case corresponds to a true collapse of the film. Of special interest to our later discussion, this very interesting phase behavior of the pure DPPC monolayers at the air–water interface has been previously examined [23] and the morphology of the domains in the coexistence region of the liquid-expanded and liquid-condensed (LC) phases was found to be very sensitive to the monolayer constituents and actual experimental conditions [24]. In particular, the variety of shapes of LC domains throughout the coexistence region was at least in part attributed to the competition between the one-dimensional line tension of the coexisting phases and the electrostatic repulsion of the dipoles arising from the molecular orientation and packing inside the condensed domain [25].

For *t*-DCTN/DBPC binary systems, we can observe (Fig. 3a) the existence of a condensed profile for $0 < x_{t-DCTN} < 0.375$ and of an expanded isotherm at $x_{t-DCTN} > 0.500$. While the Π - A isotherms of pure DPPC (Fig. 3b) present a well defined region of transition of expanded liquid to condensed liquid at a *mma* of ca. 0.70 nm², the increase of the *t*-DCTN molar fraction in the binary films of this lipid

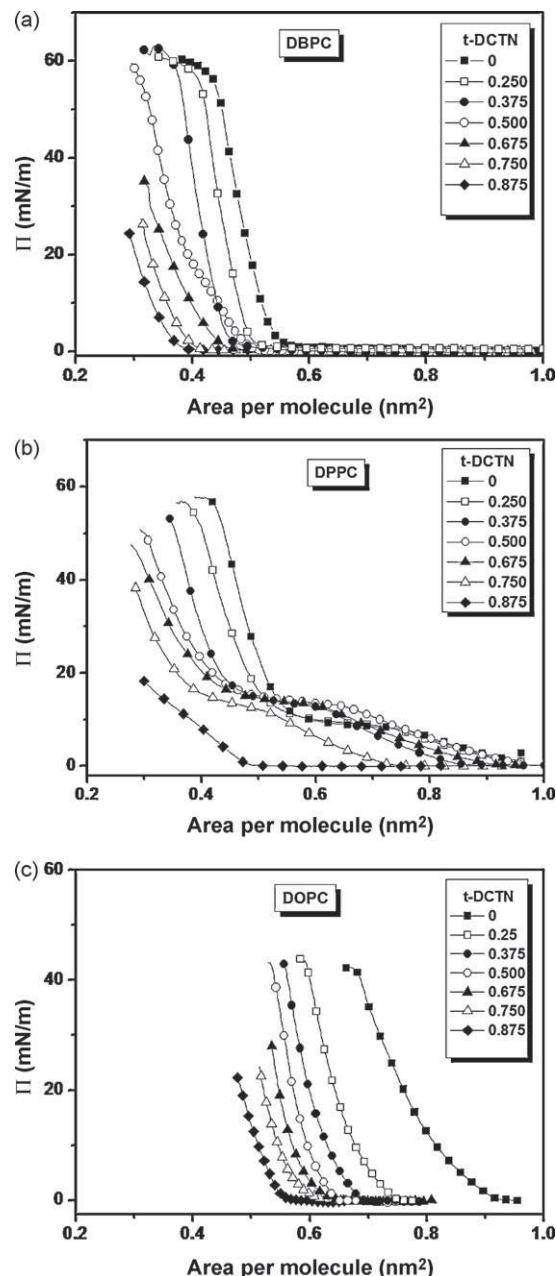


Fig. 3. Π - A isotherms of *t*-DCTN/PLD mixed Langmuir at different relative concentrations: (a) PLD = DBPC, (b) PLD = DPPC and (c) PLD = DOPC.

contribute to a gradual disappearance of the sharp characteristics of this transition and to a more pronounced reduction of the values of the *mma* associated to Π_{max} . In Fig. 3c we show the *t*-DCTN/DOPC Π - A isotherm, where in a manner similar to the two previous cases the increase in the *t*-DCTN molar fraction corresponds to a reduction of the *mma* value at the maximum pressure.

One could better understand the degree of miscibility of the two components of the binary floating films by recalling that while the isotherm of a monolayer consisting of two immiscible components will show two distinct collapse pressures (corresponding to those of the pure components) that are independent of the composition [16,17,26,27], according to the phase rule [17] single collapse pressures which are dependent on the mixture composition will be observed if the mixed monolayer constituents are miscible. It is clearly seen from Fig. 3 that the values of the maximum pressures of the corresponding mixed monolayers varied with x_{t-DCTN} .

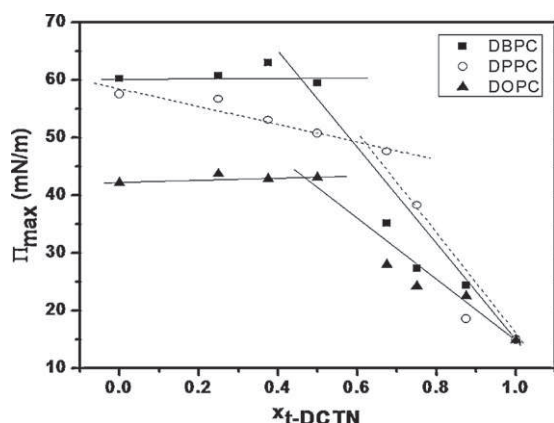


Fig. 4. Variation of Π_{max} of binary t -DCTN/phospholipid Langmuir films with the relative terpene concentration x_{t-DCTN} .

To better explore the question of the miscibility of the t -DCTN with the chosen phospholipids, we have plotted in Fig. 4 the corresponding values of the Π_{max} versus the diterpenoid molar fraction for the three binary systems investigated. As it can be seen, both in the DBPC and DOPC cases, up to a t -DCTN molar fraction of 50% the interfacial properties of the binary mixtures seem to be controlled by the phospholipids, and only for a larger concentration of the diterpenoid mixing begins to occur, as the collapse pressure varies in a more linear manner with the relative concentration of the two components. As for the t -DCTN/DPPC binary system, although a similar two-regime profile can be identified, the influence of the diterpenoid is manifest even at low concentrations. This is consistent with the idea of attributing a particular ability of terpenes in deforming the lipid-water interface [28], that in the case of t -DCTN/DPPC mixed films (as shown in Fig. 3b) can be favored by the more expanded characteristics of the lipid host matrix.

It is well known that the surface potential of phospholipid monolayers is sensitive to the orientation of the hydrocarbon chains and to the organization of the polar head groups at the interface. Also the aggregation of amphiphilic molecules results in the formation of local pockets with a polarity markedly different from that of the original subphase, where hydrophobic molecules can be accommodated [28]. As a terpenoid, t -DCTN is a lipophilic compound whose interaction with the hydrophobic part of the lipids must contribute to noticeable effects both on the structural anisotropy and dipolar organization of the floating monolayers [29,30]. In Fig. 5 we present the isotherm curves of variation of the surface potential as the mixed t -DCTN/phospholipid monolayers are compressed. For each phospholipid, by comparing the different $\Delta V \times A$ obtained as the relative concentration of the diterpene is increased, we can attribute the observed changes in the profile to existence of distinct stages of association of the two molecular species present in the floating monolayer. As usual, these molecular interactions are detected by surface potential measurements at a much earlier compression stage than the information that could be derived from pressure isotherms. For instance, the t -DCTN/DBPC mixed films (Fig. 5a) show a perceptible increase in the surface potential already for a mma close to 1.1 nm^2 .

Of special interest is the sudden upraise of the surface potential at relative early stages of compression in the DPPC – and specially DOPC – mixed films. In the latter case, even at low relative molar fraction of t -DCTN a noticeable increase in the surface potential occurs due to the nesting of the terpene molecule into the available pockets in the distribution of the unsaturated hydrocarbon chains of the phospholipid. Even at low lateral pressures, the mesoscopic organization of the lipid in the G/LE coexistence regime, which resembles the formation of a two-dimensional analog of a fluid/gas

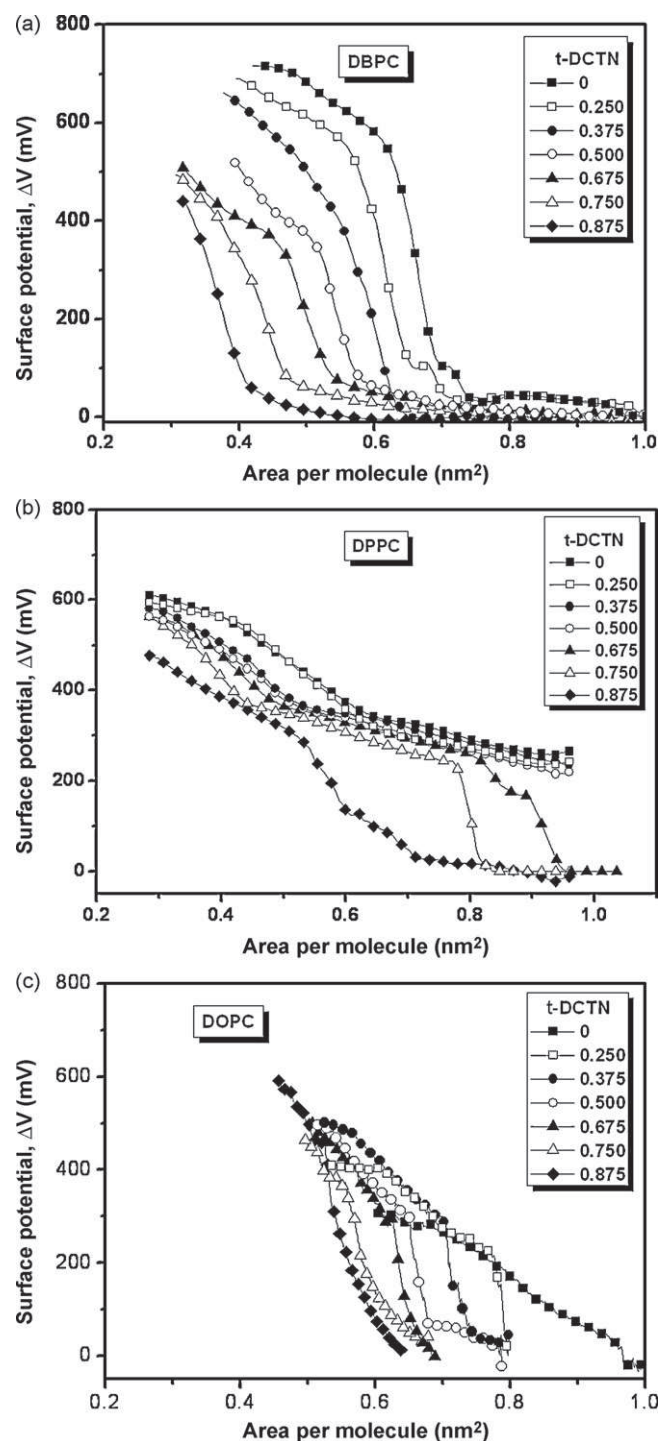


Fig. 5. ΔV -A isotherms of t -DCTN/PLD mixed Langmuir at different relative concentrations: (a) PLD = DBPC, (b) PLD = DPPC and (c) PLD = DOPC.

foam [31], is altered by the progressive lateral condensation of the t -DCTN molecules. On a molecular scale, the organization of the lipid head groups and/or their association with water molecules in the LE phase is also significantly changed by adsorption of the drug.

We note that a large decrease in ΔV_{max} , the maximum value of the potential measured (at a mma corresponding to Π_{max}), with increasing molar fraction of t -DCTN in the t -DCTN/DBPC mixed monolayer was observed. A similar behavior is also seen for the t -DCTN/DPPC mixed films (Fig. 5b), for which ΔV_{max} decreases from 610 mV ($x_{t-DCTN} = 0.250$) to 478 mV ($x_{t-DCTN} = 0.875$). Conversely,

for *t*-DCTN/DPPC and *t*-DCTN/DOPC mixed monolayers only slight changes in ΔV_{max} were observed. More quantitative information can be gathered from the ΔV - A isotherms by focusing on the results of the surface potential moment per molecule, $\mu_{\perp}$, which may be obtained from the measured surface potential by assuming the Helmholtz model [32] in which the molecules are considered as an array of dipoles, so that

$$\mu_{\perp} = \Delta V A \epsilon_0, \quad (1)$$

where ϵ_0 is the vacuum permittivity and the monolayer was assumed to have an effective dielectric constant of 1 (a discussion concerning the value of dielectric constants for Langmuir monolayers can be found in Ref. [33]). For a pure Langmuir film, at a given compression pressure the ΔV (and hence the $\mu_{\perp}$) values reflect the current orientation of the molecular dipoles in the lipid monolayer as a result of their mutual lateral interaction and of the influence of the subphase. When a drug is incorporated in the floating lipid monolayer, several factors can contribute to a change in the value of ΔV and $\mu_{\perp}$, and intuitively one can expect that both changes in the conformation of the lipid molecules disposed on the monolayer and the eventual reorganization of the hydrating water molecules should affect the measured value of the surface potential, as it should also be the case of lipophilic molecules being nested in hydrophobic domains as a result of the self-aggregation of amphiphilic molecules in the floating monolayer.

Hidalgo et al. [32] had already stressed that the incorporation of drugs on phospholipids monolayers could affect $\mu_{\perp}$ not only by reducing the effective surface charge of the phospholipid monolayer and by changing the normal component of the monolayer dipole moment by the direct contribution from the polarity of drug itself, but also by altering the dipole contribution from the phospholipid molecules due to their reorientation caused by the binding of the newly introduced species. Considering the molecular structure of *t*-DCTN, one must expect the first two contributions to be negligible. In Fig. 6, we show a convenient manner to represent how the measured value of $\mu_{\perp}$ in the mixed films varies with compression, by representing the change of $\mu_{\perp}/\mu_{\perp 0}$, where $\mu_{\perp}$ and $\mu_{\perp 0}$ are the apparent perpendicular dipole moments per molecule for the mixed and pure phospholipid monolayers, respectively. In each case, the data in Fig. 6 were taken at a *mma* that correspond to a lateral pressure of 15 mN/m, which is the value of Π_{max} for the pure *t*-DCTN film. Therefore, the most important effect from the incorporation of *t*-DCTN is in altering the vertical component of the dipole moment of the single unsaturated phospholipid (DOPC).

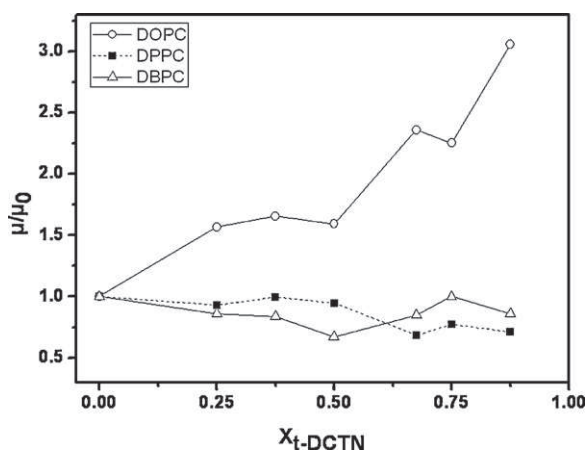


Fig. 6. Normalized variation of the average dipole moment of binary *t*-DCTN/phospholipid Langmuir films with the relative terpene concentration x_{t-DCTN} . Data for $x_{t-DCTN} = 0.0$ correspond to the pure phospholipid monolayers.

To better analyze the physical–chemical behavior of the *t*-DCTN/phospholipid mixed films, we have used the corresponding Π - A isotherms to determine relevant thermodynamic parameters, such as excess areas (ΔA^E), excess free energies (ΔG^E) and free energy of mixing (ΔG^M). The interfacial behavior of *t*-DCTN/phospholipid mixed monolayers can be analyzed based on additivity relationship [34]

$$\Delta A^E = A_{1,2} - x_1 A_1 - x_2 A_2 \quad (2)$$

between the molecular area and the relative concentration of each mixture component at a given pressure, where A_1 and A_2 denote the mean molecular area of each pure system of species 1 and 2, respectively, $A_{1,2}$ is the observed *mma* for their mixture, and x_1 and x_2 correspond to the molar fractions of the compounds 1 and 2, respectively. In this manner, if an ideal mixed monolayer is formed (i.e., the two components are completely immiscible) the excess area will be zero and a plot of $A_{1,2}$ as a function of x_1 at a given surface pressure would be a straight line. Any deviations from the straight line would merely indicate miscibility and nonideality.

Since nonlinear relationships between the molecular area and the molar fraction were found for the mixed monolayers examined, the phospholipids considered and *t*-DCTN were miscible and must form non-ideal monolayers at the interface (Fig. 7). In each case, the excess area as a function of composition has shown positive deviations that increase with the value of the *t*-DCTN molar fraction considered, especially for higher surface pressures. In fact, for these *t*-DCTN/phospholipid binary systems, the values of ΔA^E were positive for DBPC, DPPC and DOPC with the maxima appearing at higher surface pressures at x_{t-DCTN} of 0.875, 0.675 and 0.875, respectively. The fact that the observed deviation is mainly positive suggests that the interactions between phospholipids and *t*-DCTN were weaker than those prevailing between the molecules in the pure films and that, therefore, the mixed films exhibit a relatively higher degree of disorder.

Both the deviations from the simple additivity of the areas observed in Fig. 7 and the variations of the collapse pressure with composition observed in Fig. 3 would account for the miscibility of phospholipids and *t*-DCTN at the air/water interface. Moreover, the magnitude of interactions between phospholipids and *t*-DCTN at the interface seem to change with variations on the surface pressure, as one can see in Fig. 7. In fact, in the case of DOPC (Fig. 7c) some values of ΔA^E were slightly negative at lower surface pressures for $x_{t-DCTN} = 0.250$. Thus, at lower *t*-DCTN molar ratios a condensing effect caused by attractive intermolecular forces resulting from the forced geometric accommodation may arise in the mixed monolayer. Furthermore, this negative deviation in ΔA^E is not seen at higher surface pressures, a situation in which the unsaturated phospholipid molecules are forced to occupy a lower volume. Apparently, the accommodation of *t*-DCTN between the phospholipid double chains at higher surface pressures (especially at higher *t*-DCTN molar fractions) disturbs the packing of the phospholipid molecules, resulting in positive deviations in ΔA^E .

This idea is corroborated by the observation that in the presence of *t*-DCTN the onset of the liquid-expanded–liquid condensed (LE–LC) phase transition in DPPC monolayer is delayed until higher surface pressures are attained; also, the pure expanded component undergoes an even greater condensation because of this phase change. In a mixed monolayer, both the interaction between the components and the thermodynamic stability relative to the floating films of the pure components can be investigated from the evaluation of excess free energy of mixing, ΔG^E , or free energy of mixing, ΔG^M [35]. For a mixing process where two pure monolayers form a mixed monolayer at a constant surface pressure and

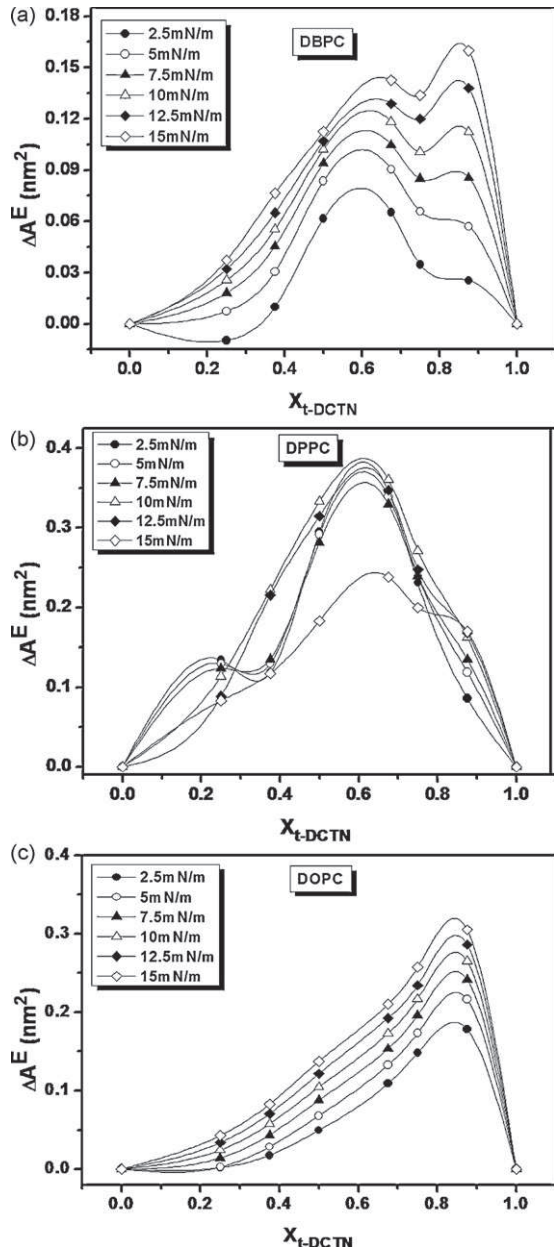


Fig. 7. ΔA^E of t -DCTN/PLD mixed Langmuir films as a function of t -DCTN molar fraction: (a) PLD = DBPC, (b) PLD = DPPC and (c) PLD = DOPC.

temperature, the expression for ΔG^E is given as [15]

$$\Delta G^E = \int_0^\Pi \Delta A^E d\Pi, \quad (3)$$

where Π is the surface pressure. Negative values of ΔG^E (Eq. (3)) indicate an attraction between the components of the mixed monolayer, while positive values characterize the existence of repulsion.

In Fig. 8 we observe positive values of ΔG^E for the t -DCTN/DBPC system at low x_{t-DCTN} , and for t -DCTN/DPPC, in the entire range of t -DCTN concentrations (except for the t -DCTN/DPPC case at $\Pi = 2.5$ mN/m), which would indicate that the interaction forces between the constituents of mixed films are less attractive than those present in single components films [36]. Conversely, attractive molecular interactions existed between the two components in the t -DCTN/DBPC and t -DCTN/DOPC mixed films. Furthermore, the values of ΔG^E became more negative when the lateral surface pressure was increased, and this implies that the extent of the

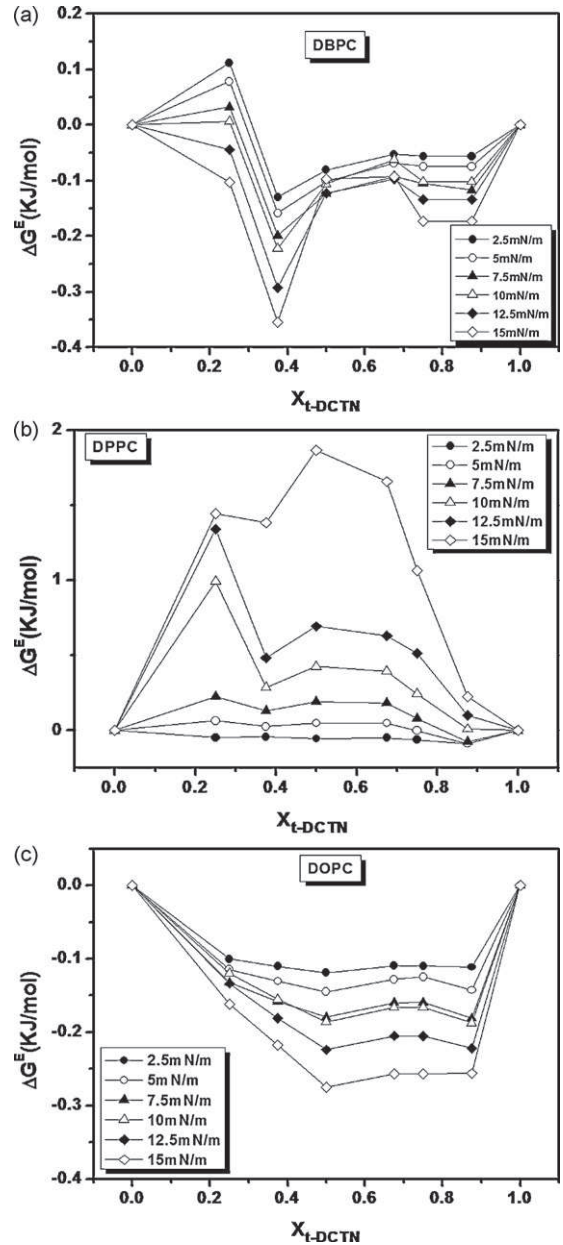


Fig. 8. ΔG^E as a function of t -DCTN molar fraction: (a) PLD = DBPC, (b) PLD = DPPC and (c) PLD = DOPC.

molecular interaction was enhanced with the rearrangement of the molecules at the interface. A minimum ΔG^E value of -0.354 and -0.275 was identified for t -DCTN/DBPC and t -DCTN/DOPC mixed films, at $x_{t-DCTN} = 0.375$ and 0.500 , a molar fraction that should correspond to the composition of the most stable t -DCTN/phospholipid mixed film.

It is also known [14,15] that

$$\Delta G^M = \Delta G^E + \Delta G^{ID}, \quad (4)$$

and

$$\Delta G^{ID} = RT(x_1 \ln x_1 + x_2 \ln x_2), \quad (5)$$

where R is the universal gas constant and T is absolute temperature. Eq. (4) provides information on the interaction and stability of the mixture of components, i.e., in the absence of any specific interaction between components, ΔG equals zero. Deviations from an ideal behavior result in $\Delta G^M < 0$ (attractive interactions) and in $\Delta G^M > 0$ (repulsive interactions). So a negative sign is the evidence that a

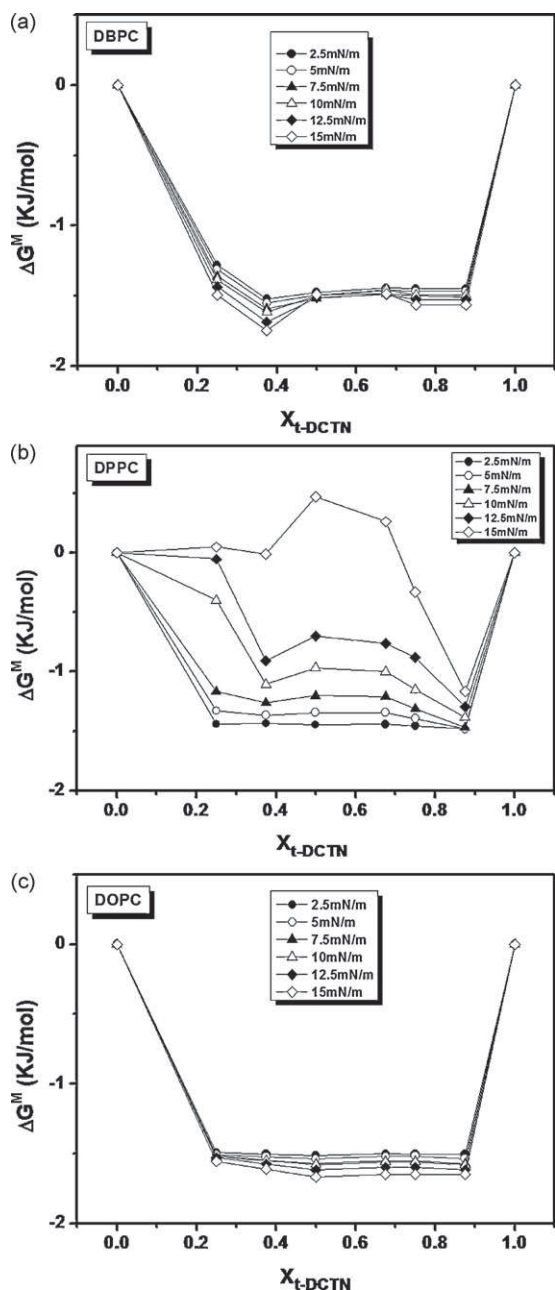


Fig. 9. ΔG^M of *t*-DCTN/PLD mixed Langmuir films as a function of *t*-DCTN molar fraction: (a) PLD = DBPC, (b) PLD = DPPC and (c) PLD = DOPC.

particular interaction is energetically favored when compared to an ideal mixture, where no intermolecular interactions exist.

Thermodynamics analyses of the free energy mixing for pure phospholipids, *t*-DCTN and binary systems are shown in Fig. 9. For the *t*-DCTN/DBPC and *t*-DCTN/DOPC binary systems, the maximum stability was obtained at $x_{t-DCTN} = 0.375$ and 0.500, respectively, at a surface pressure of 15 mN/m, with a maximum value of ΔG^M approximately of -1.7 kJ/mol. Conversely for *t*-DCTN/DPPC, positive values were observed at high pressures. Based on this ΔG^M analysis, the stability of the *t*-DCTN/phospholipid binary systems seem to depend upon the interaction of the hydrophobic *t*-DCTN with the phospholipid hydrocarbon chains. The differences between the values of ΔG^M of the mixed monolayers can be correlated to the structure and length of the phospholipid hydrocarbon chains. DOPC, a phospholipid with unsaturated hydrocarbon chains, presented a Π - A isotherm with a expanded

profile. When it was mixed to *t*-DCTN, the calculated ΔA^E and ΔG^E values were relatively small, when compared to *t*-DCTN mixtures with the two other phospholipids. As already mentioned, there was one particularly low value for ΔG^E at $x_{t-DCTN} = 0.500$. ΔG^M values showed that all in all, DOPC and *t*-DCTN mixed well. The *t*-DCTN/DPPC mixture was the only one for which an unfavorable interaction was observed. It should be noted that all calculations were made in the surface pressure range below or close to the DPPC LE-LC transition, in a region of the isotherm where the physical state of the monolayer was not well defined and, hence, where the presence of the DCTN molecules was most likely to disturb the spatial organization of the monolayer system [29] and its dipolar structure [30]. At 15 mN/m, however, the structural transition of the DPPC monolayer was over and segregation of isolated DPPC and *t*-DCTN domains apparently begins to occur. Previously, some authors [28] studying the solubility of terpenes found a self-aggregate behavior of this class of molecules. In addition, a self-association of hydrophobic drugs can be explained as piled structures growing through a mechanism of continued association [37] or tubular three-dimensional structures [38].

It was obvious from the ΔG^E values that the *t*-DCTN/DOPC mixture was the most favorable since they were negative at all DCTN molar fractions. The surface pressure compensated the positive deviation in molecular area. The ΔG^M values of course confirmed it. In the case of *t*-DCTN/DOPC, due to the unsaturated nature of the hydrocarbon chain of the phospholipid, the resulting mixed films were more fluid, resulting in a better reorganization of the *t*-DCTN molecules in these floating monolayers. Therefore, it was this binary system that presented the higher stability, associated to more negative values of ΔG^M . The expansion of the monolayers as deduced from the ΔA^E values at high *t*-DCTN molar fractions especially, suggested that *t*-DCTN molecules did not mix ideally with the phospholipids and that they exhibit a tendency to interact among themselves to form isolated clusters.

4. Conclusions

The thermodynamic analysis indicated the existence of a good miscibility of the components in the evaluated *t*-DCTN/phospholipid binary systems, with negative deviations from the ideal behavior. As a general rule, we observed that the polar group of the phospholipids did not significantly affect the hydrocarbon chain packing when in mixtures with *t*-DCTN, and that hydrophobic effects prevailed over the attractive forces associated to the presence of the polar groups. Conversely, the pure components in the *t*-DCTN/phospholipid mixed monolayers exhibited higher orientational order at intermediate values of the *t*-DCTN molar fraction. These observations suggest that there is a condensing effect when *t*-DCTN mixed with phospholipids. Such results could be useful in analyzing how phospholipid bilayers in aqueous solutions could form vesicular domains with *t*-DCTN molecules inserted in the hydrophobic regions of the phospholipids. The present work contributes to a better understanding of the relative stability of more complex mixtures as those related to site-specific drug delivery systems where *t*-DCTN is incorporated into liposomes.

Acknowledgements

The authors are grateful for the partial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). J. M. Nascimento Filho would like to thank FACEPE for an MSc scholarship.

References

- [1] M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, S.N. Brabo, M.N. Da Silva, Terpenoids from *Croton cajucara*, *Phytochemistry* 49 (1998) 823–828.

- [2] M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, S.N. Brabo, A.C. Arruda, Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados das cascas do caule de *Croton cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará., Revista Cultivos Rural, série Ciências exatas e da terra 18/20 (1998) 17–34.
- [3] R.A. Farias, V.S. Rao, G.S. Viana, E.R. Silveira, M.A. Maciel, A.C. Pinto, Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*, Planta Med. 63 (1997) 558–560.
- [4] R.M. Silva, F.A. Santos, V.S. Rao, M.A. Maciel, A.C. Pinto, Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats, Diabetes Obes. Metab. 3 (2001) 452–456.
- [5] P.S. Melo, G.Z. Justo, N. Duran, M. Haun, Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives, Eur. J. Pharmacol. 487 (2004) 47–54.
- [6] F.V. Santos, S.F.P. Mesquita, M.J.S.S. Faria, A. Poersch, M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, H.K. Morimoto, I.M.S. Colus, Absence of mutagenicity in somatic and germ cells of mice submitted to subchronic treatment with an extract of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), Genet. Mol. Biol. 29 (2006) 159–165.
- [7] J.C.T. Carvalho, M.F.C. Silva, M.A.M. Maciel, A.D. Pinto, D.S. Nunes, R.M. Lima, J.K. Bastos, S.J. Sarti, Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*, Planta Med. 62 (1996) 402–404.
- [8] M.A.M. Maciel, J.K.P.C. Cortez, F.E.S. Gomes, O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos, Revista Fitos 2 (2006) 54–73.
- [9] C. Berkland, M. King, A. Cox, K. Kim, D.W. Pack, Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate, J. Control. Release 82 (2002) 137–147.
- [10] M.N. Ravi Kumar, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, J. Pharm. Pharm. Sci. 3 (2000) 234–258.
- [11] B.D. Ratner, Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems, J. Control. Release 78 (2002) 211–218.
- [12] A. Wiecek, P. Dynarowicz-Latka, J. Minones, O. Conde, M. Casas, Interactions between an anticancer drug – edelfosine – and cholesterol in Langmuir monolayers, Thin Solid Films 516 (2008) 8829–8833.
- [13] S. Koppenol, H. Yu, G. Zografi, Mixing of saturated and unsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylglycerols in monolayers at the air/water interface, J. Colloid Interface Sci. 189 (1997) 158–166.
- [14] M. Kodama, O. Shibata, S. Nakamura, S. Lee, G. Sugihara, A monolayer study on three binary mixed systems of dipalmitoyl phosphatidyl choline with cholesterol, cholestanol and stigmaterol, Colloids Surf. B 33 (2004) 211–226.
- [15] C.A.S. Andrade, N.S. Santos-Magalhaes, C.P. de Melo, Thermodynamic characterization of the prevailing molecular interactions in mixed floating monolayers of phospholipids and usnic acid, J. Colloid Interface Sci. 298 (2006) 145–153.
- [16] G.L. Gaines, Thermodynamic relationships for mixed insoluble monolayers, J. Colloid Interface Sci. 21 (1966) 315–319.
- [17] L. Terminassiansaraga, Cooperativity of an acid phospholipid reaction with basic hydrophobic polyelectrolytes or with the apoprotein proteolipid from myelin, J. Colloid Interface Sci. 70 (1979) 245–264.
- [18] A. Poersch, F.V. dos Santos, M.A.M. Maciel, J.K.P. da Camara, T.N.D. Dantas, I.M.D. Colus, Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro, Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 629 (2007) 14–23.
- [19] C. Ybert, W.X. Lu, G. Moller, C.M. Knobler, Collapse of a monolayer by three mechanisms, J. Phys. Chem. B 106 (2002) 2004–2008.
- [20] K.Y.C. Lee, Collapse mechanisms of Langmuir monolayers, Annu. Rev. Phys. Chem. 59 (2008) 771–791.
- [21] C.A.S. Andrade, A. Baszkin, N.S. Santos-Magalhaes, L.C.B.B. Coelho, C.P. de Melo, Mixed monolayers of Bauhinia monandra and Concanavalin A lectins with phospholipids, part II, J. Colloid Interface Sci. 289 (2005) 379–385.
- [22] F. Gambinossi, B. Mecheri, G. Caminati, M. Nocentini, M. Puggelli, G. Gabrielli, Antibiotic interaction with phospholipid monolayers, Mater. Sci. Eng. C 22 (2002) 283–288.
- [23] C.W. McConlogue, T.K. Vanderlick, A close look at domain formation in DPPC monolayers, Langmuir 13 (1997) 7158–7164.
- [24] U. Gehlert, D. Vollhardt, Nonequilibrium structures in 1-monopalmitoyl-rac-glycerol monolayers, Langmuir 13 (1997) 277–282.
- [25] D.J. Benvegnu, H.M. McConnell, Line tension between liquid domains in lipid monolayers, J. Phys. Chem. 96 (1992) 6820–6824.
- [26] R. Maget-Dana, The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes, Biochim. Biophys. Acta 1462 (1999) 109–140.
- [27] S. Wu, J.R. Huntsber, Intermolecular interaction in some mixed polymer monolayers at air–water interface, J. Colloid Interface Sci. 29 (1969) 138–147.
- [28] A.D. Turina, M.V. Nolan, J.A. Zygodlo, M.A. Perillo, Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning, Biophys. Chem. 122 (2006) 101–113.
- [29] M. Bard, M.R. Albrecht, N. Gupta, C.J. Guynn, W. Stillwell, Geraniol interferes with membrane functions in strains of Candida and Saccharomyces, Lipids 23 (1988) 534–538.
- [30] A.V. Turina, M.A. Perillo, Monoterpenes affect chlorodiazepoxide-micelle interaction through micellar dipole potential modifications, Biochim. Biophys. Acta 1616 (2003) 112–120.
- [31] M. Losche, E. Sackmann, H. Mohwald, A fluorescence microscopic study concerning the phase-diagram of phospholipids, Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Phys. Chem. Chem. Phys. 87 (1983) 848–852.
- [32] A.A. Hidalgo, W. Caetano, M. Tabak, O.N. Oliveira, Interaction of two phenothiazine derivatives with phospholipid monolayers, Biophys. Chem. 109 (2004) 85–104.
- [33] O.N. Oliveira, D.M. Taylor, H. Morgan, Modeling the surface-potential area dependence of a stearic-acid monolayer, Thin Solid Films 210 (1992) 76–78.
- [34] V. Rosilio, G. Albrecht, Y. Okumura, J. Sunamoto, A. Baszkin, Surface properties and miscibility of monolayers of dimyristoylphosphatidylcholine and poly(ethylene oxide) lipids at the water/air interface, Langmuir 12 (1996) 2544–2550.
- [35] R.E. Pagano, N.L. Gershfeld, Physical chemistry of lipid films at the air–water interface. II. Binary lipid mixtures. The principles governing miscibility of lipids in surfaces, J. Phys. Chem. 76 (1972) 1238–1243.
- [36] T.H. Chou, C.H. Chang, Thermodynamic behavior and relaxation processes of mixed DPPC/cholesterol monolayers at the air/water interface, Colloids Surf. B 17 (2000) 71–79.
- [37] P. Mukerjee, Micellar properties of drugs: micellar and nonmicellar patterns of self-association of hydrophobic solutes of different molecular structures—monomer fraction, availability, and misuses of micellar hypothesis, J. Pharm. Sci. 63 (1974) 972–981.
- [38] W. Caetano, E.L. Gelamo, M. Tabak, R. Itri, Chlorpromazine and sodium dodecyl sulfate mixed micelles investigated by small angle X-ray scattering, J. Colloid Interface Sci. 248 (2002) 149–157.