



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE**

**DÉBORA MÁXIMO DAS NEVES LUNA**

**PROPRIEDADES INTERFACIAIS DE UM NOVO  
DERIVADO PIRIMIDÍNICO E SUA INTERAÇÃO COM  
MONOCAMADAS FLUTUANTES MISTAS DE LIPÍDIO-  
LIPOPOLÍMERO**

**Vitória de Santo Antão**

**2011**

**DÉBORA MÁXIMO DAS NEVES LUNA**

**PROPRIEDADES INTERFACIAIS DE UM NOVO  
DERIVADO PIRIMIDÍNICO E SUA INTERAÇÃO COM  
MONOCAMADAS FLUTUANTES MISTAS DE LIPÍDIO-  
LIPOPOLÍMERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Co-Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

**Vitória de Santo Antão**

**2011**

Catálogo na fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

- L961p Luna, Débora Máximo das Neves.  
Propriedades interfaciais de um novo derivado pirimidínico e sua interação com monocamadas flutuantes mistas de lipídio-lipopolímero / Débora Máximo das Neves Luna. Vitória de Santo Antão: O autor, 2011.  
xv, 55 folhas: il; tab.; fig.
- Orientador: César Augusto Souza de Andrade.  
Co-orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Saúde Humana e Meio Ambiente, 2011.  
Inclui bibliografia e anexos.
1. Biotecnologia. 2. Lipídeos preguiçados. 3. Monocamadas de Langmuir. 4. Derivado pirimidínico. I. Andrade, César Augusto Souza de. II. Falcão, Emerson Peter da Silva Falcão. III. Título.
- 660.6 CDD (21.ed.) **BIBCAV/UFPE-014/2011**

Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – Mestrado Acadêmico

DÉBORA MÁXIMO DAS NEVES LUNA

“AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES INTERFACIAIS DE NOVOS COMPOSTOS  
PIRIMIDÍNICOS 2,6 DISSUBSTITUÍDOS E SUA INTERAÇÃO COM FILMES BIOLÓGICOS  
MONOMOLECULARES”

DISSERTAÇÃO APROVADA em 22 de fevereiro de 2011

Banca Examinadora

*Christine Lamenha Luna Finkler*

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler

*Nereide Stela Santos Magalhães*

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

*Noemia pereira da Silva Santos*

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Aos professores, familiares e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por me guiar, proteger e permitir que toda esta pesquisa fosse concluída.

À minha família, meus pais Josival e Fátima, meu irmão Rodrigo, Tia Lenita, Tio Cavalcante, Tia Aldenice, Tia Socorro, Luciana, Denise, Carol e Thayse por me inserirem no seio familiar com muito amor e pela força em todos os momentos principalmente naqueles que mais precisei.

Ao Prof. César Augusto por ter me dado a oportunidade de tê-lo como orientador, por sua dedicação, estando sempre disponível a dar suporte em tudo o que fosse necessário ao desenvolvimento deste trabalho, sempre com muita tranquilidade e bom humor, minha gratidão e respeito.

À Profa. Noemia Pereira pelo incentivo à carreira científica, pelas orientações, apoio e amizade. À Profa. Christine pelas primeiras considerações, ao Prof. Emerson Peter pelas orientações e por compartilhar conhecimentos de uma forma irreverente e especial.

Aos amigos da turma do mestrado, em especial, à Camilla, Daniel e Felipe pela amizade, palavras, conselhos e incentivos. À Adalva e Ana pela atenção, simpatia e generosidade ímpar.

A todos que fazem parte do grupo de Polímeros Não-Convencionais (PNC) por terem me recebido muito bem e em especial ao Prof. Celso Melo por permitir minha estadia por lá, ao Prof. Clécio Santos pelas orientações, à Virgínia por todo o suporte dado e à Tarcyla pelas imagens de AFM. Aos membros do grupo de Tecnologia em Biomateriais (TecBio), Jadilson, Tallita, Jéssica, Helena, Dany, Gilcélia e Jordana pela força, trocas de conhecimento, dúvidas compartilhadas e pela amizade. À família SLC e em especial à Profa. Nereide Magalhães pelos primeiros incentivos e orientação na área científica e que certamente estão refletidos neste trabalho. Aos membros da banca por aceitarem o convite, pelas sugestões e críticas dadas.

À FACEPE e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos demais colegas e amigos que certamente contribuíram de forma direta ou indireta para o andamento e conclusão desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
1.1. Introdução .....	1
1.2. Objetivos .....	3
1.2.1. Objetivo Geral.....	3
1.2.2. Objetivos Específicos.....	3
1.3. Revisão da Literatura .....	4
1.3.1. Derivados Pirimidínicos.....	4
1.3.2. Lipossomas.....	5
1.3.3. Fosfolipídios.....	5
1.3.4. Lipídios peguados .....	6
1.3.5. Filmes de Langmuir .....	9
1.3.5.1. Filmes de Langmuir- Histórico .....	11
1.3.5.2. A cuba de Langmuir .....	13
1.3.5.3. Condições experimentais para a obtenção de filmes de Langmuir .....	14
1.3.6. Tensão superficial ( $\gamma$ ) .....	15
1.3.7. Pressão de Superfície.....	16
1.3.8. Potencial de Superfície .....	18
1.3.9. Monocamadas ionizadas .....	19
1.3.10. Filmes de Langmuir-Blodgett (LB).....	19
1.3.11 Microscopia de força atômica (AFM).....	21
<b>CAPÍTULO 2 – Propriedades interfaciais de monocamadas flutuantes compostas por um novo derivado pirimidínico e lipopolímero</b> .....	24
2.1. Resumo.....	24
2.2. Introdução .....	25
2.3. Material e Métodos.....	26
2.3.1. Material .....	26

2.3.2. Medidas de pressão e potencial de superfície .....	27
2.3.3. Medidas de microscopia de força atômica .....	27
2.4. Resultados e Discussão .....	27
2.5. Conclusões .....	38
2.6. Referências .....	40
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO A – ARTIGO .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>xxiv</b>
<b>ANEXO C – APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS .....</b>	<b>xxvi</b>
<b>ANEXO D– NORMAS DA REVISTA .....</b>	<b>xxviii</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Série 4-amino-2,6-diaril-5-ciano-pirimidínicos.....	4
Figura 1.2	Esquema representativo da constituição do lipossoma .....	5
Figura 1.3	Ilustração esquemática do lipossoma “Stealth <sup>®</sup> ” .....	7
Figura 1.4	Esquema representativo das moléculas de PEG, evidenciando as mudanças de conformação (a) pancake, (b) mushroom e (c) brush.....	9
Figura 1.5	Esquema representativo de moléculas de DSPE-PEG <sub>2000</sub> formando uma monocamada de Langmuir .....	10
Figura 1.6	Irving Langmuir e Katharine Burr Blodgett.....	12
Figura 1.7	Cuba de Langmuir e acessórios.....	13
Figura 1.8	Figura ilustrativa das forças de atração entre as moléculas na superfície e interior do líquido.....	16
Figura 1.9	Isoterma $\Pi \times A$ do DPPC.....	17
Figura 1.10	Esquema representativo da medida de potencial de superfície pelo método da placa vibrante.....	19
Figura 1.11	Deposição do filme de Langmuir em substrato sólido através da técnica de LB (a) e deposição tipo X, Y, Z (b).....	20
Figura 2.1	Estruturas químicas do APCP, DSPE-PEG <sub>2000</sub> e DPPC.....	26
Figura 2.2	Isotermas $\Pi$ -A das monocamadas de APCP puro a diferentes pHs.....	28
Figura 2.3	Isotermas $\Delta V$ -A das monocamadas de APCP puro a diferentes pHs....	29

Figura 2.4	Isotermas $\Pi$ -A do sistema binário DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> ) a diferentes concentrações relativas de PEG-fosfolipídios ( $x = \{1, 3, 6, \text{ e } 9 \text{ mol}\%\}$ ). Detalhe: Isoterma $\Pi$ -A da monocamada pura de DSPE-PEG <sub>2000</sub> .....	32
Figura 2.5	Isotermas $\Delta V$ -A do sistema binário DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> ) a diferentes concentrações relativas de PEG-fosfolipídios ( $x = \{1, 3, 6, \text{ e } 9 \text{ mol}\%\}$ ). Detalhe: Isoterma $\Delta V$ -A da monocamada pura de DSPE-PEG <sub>2000</sub> .....	33
Figura 2.6	Isotermas $\Pi$ -A do sistema ternário DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> )/APCP a diferentes concentrações relativas de APCP ( $x = \{0.5, 1.5, 3.0 \text{ e } 4.3 \text{ mol}\%\}$ ).....	34
Figura 2.7	Isotermas $\Delta V$ -A do sistema ternário DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> )/APCP a diferentes concentrações relativas de APCP ( $x = \{0.5, 1.5, 3.0 \text{ e } 4.3 \text{ mol}\%\}$ ).....	35
Figura 2.8	Varição da distância entre os sítios peguilados (D) para DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> ) em função do aumento da concentração molar de (DSPE-PEG <sub>2000</sub> ) a diferentes pressões de superfície.....	36
Figura 2.9	Varição da distância entre os sítios peguilados (D) para DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> )/APCP em função do aumento da concentração molar de (DSPE-PEG <sub>2000</sub> ) a diferentes pressões de superfície.....	37
Figura 2.10	Imagem topográfica de AFM (10 $\mu\text{m}$ ×10 $\mu\text{m}$ ) de monocamada pura de DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> ) (a) e mista de DPPC/(DSPE-PEG <sub>2000</sub> )/APCP (b) transferida em mica .....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	pH da subfase, área molecular média, potencial de superfície, momento de dipolo e diferença de potencial da dupla camada das monocamadas flutuantes de APCP.....	31
------------	--	----

## LISTA DE SÍMBOLOS

$g$	Aceleração da gravidade
$h$	Altura
$\theta$	Ângulo de contato do sensor
$A$	Área por molécula
$e$	Carga elementar
$l$	Comprimento
$k$	Constante de Boltzmann
$\varepsilon$	Constante dielétrica do meio
$\rho$	Densidade
$\Psi_0$	Diferença de potencial através da dupla camada
$D$	Diferença entre os sítios peguilados
$t$	Espessura
$c$	Força iônica
$M$	Fração molar do lipídio
$F_0$	Frequência inicial
$\alpha$	Grau de ionização
$w$	Largura
$\mu_{\perp}$	Momento dipolo perpendicular
$\text{pH}_b$	pH do volume (bulk)
$\text{pH}_i$	pH inicial
$\Delta V$	Potencial de superfície
$\Delta V_{max}$	Potencial de superfície máximo
$\Pi_c$	Pressão de colapso
$\Pi$	Pressão de superfície
$T$	Temperatura
$\gamma$	Tensão superficial
$\gamma_0$	Tensão superficial da subfase limpa

## LISTA DE ABREVIATURAS

amm	Área molecular média
APCP	4-amino-2-fenil 6(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila-pirimidina
C	Colapso
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG <sub>2000</sub>	1,2 Distearoil-fosfoetanolamina
G	Fase gasosa
LB	Filmes de Langmuir-Blodgett
LC	Fase líquido-condensada
LE	Fase líquido-expandida
PEG	Polietilenoglicol
PEO	Poli(óxido de etileno)
PTFE	Politetrafluoroetileno
SFM	Sistema fagocitário mononuclear

## RESUMO

O 4-amino-2-fenil, 6(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila-pirimidina (APCP) é um novo derivado de pirimidina com baixa solubilidade em água e propriedade antiinflamatória. Neste trabalho, o comportamento interfacial do filme de 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-[poli(etileno glicol)<sub>2000</sub>], i.e., DSPE-PEG<sub>2000</sub>; 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e de um novo derivado pirimidínico (APCP), foi avaliado e posteriormente comparados com o comportamento interfacial dos sistemas binários e ternários da mistura destas moléculas em diferentes frações molares. A isoterma de pressão de superfície-área ( $\Pi$ -A) mostrou que as moléculas tanto de APCP quanto de DSPE-PEG<sub>2000</sub> e DPPC formaram filmes estáveis na interface ar-água. O sistema binário (DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>) e ternário (DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>/APCP) apresentou miscibilidade entre os componentes. A inclusão do APCP na monocamada DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub> tornou o perfil mais expandido à medida que se aumenta a concentração de APCP. Além disso, a transição de “mushroom” para “brush” existente nas moléculas de PEG torna-se dificultada na presença do APCP ocorrendo apenas a 9mol% e em pressões de superfície acima de 10mN/m. Filmes de Langmuir-Blodgett contendo o sistema binário e ternário foram transferidos sobre substratos de mica para caracterização morfológica por microscopia de força atômica (AFM). Imagens de AFM demonstraram ausência de defeitos em ambos os sistemas e distribuição heterogênea da monocamada, com a amplitude entre os picos e vales na ordem de ~4 nm para o sistema binário e ~3 nm para o sistema ternário.

**Palavras-Chave:** Monocamadas de Langmuir; derivado pirimidínico; caracterização interfacial; lipídios peguilados.

## ABSTRACT

The 4-amino-2-phenyl, 6 (p-fluoro-phenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (APCP) is a new derivative of pyrimidine with low water solubility and anti-inflammatory properties. In this work, the behavior of the interfacial film of 1,2-sn-glycero-distearoil-3-phosphoethanolamine-N-[poly (ethylene glycol) <sub>2000</sub>], i.e., DSPE-PEG<sub>2000</sub>, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) and a new pyrimidine derivative (APCP), were evaluated and then compared with the interfacial behavior of binary and ternary mixture of these molecules at different molar fractions. The isotherm of surface pressure-area (II-A) showed that molecules of APCP, DSPE-PEG<sub>2000</sub> and DPPC formed stable films at the air-water interface. The binary (DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>) and ternary system (DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>/APCP) showed miscibility between components. The inclusion of the APCP in the binary monolayer DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub> became more expanded profile as it increase the concentration of APCP. Moreover, the transition from "mushroom" to "brush" of the PEG molecules become more difficult in the presence of APCP occurring only 9 mol% and in surface pressure above 10 mN/m. Langmuir-Blodgett films containing binary and ternary system were transferred on mica substrate for the morphological characterization by atomic force microscopy (AFM). AFM images showed no defects in both systems and heterogeneous distribution of the monolayer, with the amplitude between peaks and valleys of ~4 nm for the binary system and ~3 nm for the ternary system.

**Keywords:** Langmuir monolayers; pyrimidine derivative; interface characterization; PEGylated lipids.

# CAPÍTULO 1

## 1.1. Introdução

Compostos contendo núcleo heterocíclico pirimidínico têm sido extensivamente estudados devido ao amplo espectro de atividades terapêuticas tais como ação antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral, entre outras (ANDERSON et al., 1945; MENON e PURUSHOTHAMAN, 1996; SADANANDAM; SHETTY; DIWAN, 1992; LIN et al., 2009; DENG et al., 2009; NOLL et al., 2009). Este fato tem estimulado a síntese de novos compostos deste grupo de moléculas. Recentemente, a molécula 4-amino-2-fenil, 6(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila-pirimidina (APCP) foi sintetizada por Melo e colaboradores no departamento de síntese e produtos naturais da UFPE tendo comprovada ação antiinflamatória e baixa citotoxicidade (SILVA et al., 2008).

Por outro lado, lipossomas vêm sendo estudados há mais de três décadas com o objetivo de melhorar a vetorização de uma diversidade de agentes (TORCHILIN, 2005). Como sistema de liberação controlada, os lipossomas não só possibilitam a diminuição da concentração efetiva do fármaco a ser encapsulado, como também, permite direcionamento para sítios específicos da terapêutica quando são adicionados à sua superfície ligantes com especificidade a células, tecidos ou órgãos. Dessa forma, é possível promover o aumento da ação terapêutica e diminuição da toxicidade (ALLEN et al., 1995).

Além destes fatores, o tempo de circulação dos lipossomas pode ser potencializado através da incorporação de polímeros hidrofílicos na sua superfície, são os chamados lipossomas furtivos ou Stealth<sup>®</sup>. Recentemente, diversos pesquisadores têm direcionado esforços para o estudo das cadeias de poli(óxido de etileno) (PEO) com baixo peso molecular na faixa de 1-5 KDa, também conhecidos como poli(etileno glicol) (PEG). Tais polímeros promovem um aumento da biocompatibilidade e conferem caráter furtivo, ou seja, reduzem o reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) promovendo o aumento no tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea. Desta forma, o efeito terapêutico do fármaco encapsulado pode ser potencializado.

Além disso, foi demonstrado que os benefícios conferidos pelo PEG são melhorados quando o mesmo se encontra conjugado a lipídios (ZALIPSKY, 1995), sendo comumente conhecidos por lipopolímeros. Porém, as condições ótimas para que o PEG reduza o

reconhecimento pelo SFM ainda não estão totalmente estabelecidas. Sendo assim, diversos estudos têm sido realizados objetivando o entendimento de suas propriedades (TSUKANOVA, SALESSE, 2003; VERMETTE e MEAGHER, 2003; TSUKANOVA, SALESSE, 2004; GARBUZENKO; BARENHOLZ; PRIEV, 2005; WYSZYNSKI; SOMBOONB; NAKAMOTOB, 2007).

Sabe-se que as cadeias de PEG podem apresentar mudanças conformacionais e que as mesmas dependem da densidade do polímero e influenciam no reconhecimento pelo SFM (TSUKANOVA, SALESSE, 2003; TSUKANOVA, SALESSE, 2004). Desta forma, modelos de membrana que permitam a avaliação *in vitro* destas mudanças e que elucidem o comportamento deste polímero consistem numa alternativa para a viabilidade de sua aplicação.

Por outro lado, monocamada de Langmuir consiste numa camada de lipídios ou uma mistura de lipídios na interface ar-água, sendo considerado um eficiente modelo de membrana plasmática, uma vez que, as variáveis experimentais podem ser facilmente controladas e os principais fenômenos físico-químicos existentes, caracterizados por diversas técnicas, tais como: isoterma de pressão e potencial de superfície, microscopia de força atômica, microscopia de ângulo brewster e microscopia de fluorescência.

No presente estudo, utilizamos monocamadas de Langmuir com o objetivo de compreender o comportamento interfacial de monocamadas flutuantes de um novo derivado pirimidínico (APCP) e a sua interação com monocamada flutuante mista constituída por lipídio/lipopolímero (DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>). Para tanto, o comportamento interfacial dos filmes puros de APCP, DSPE-PEG<sub>2000</sub> e DPPC foram caracterizados e, posteriormente, o sistema binário DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub> foi estudado a diferentes concentrações molares de DSPE-PEG<sub>2000</sub>. Em seguida, o comportamento do sistema ternário DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>/APCP foi caracterizado a diferentes frações molares de APCP. A técnica de Langmuir-Blodgett (LB) foi utilizada para a deposição em substrato sólido e posteriormente microscopia de força atômica foi utilizada com o objetivo de fornecer informações a respeito da morfologia da monocamada em sistemas binários e ternários. Além disso, dados experimentais foram correlacionados com dados teóricos para se estimar a conformação da molécula de PEG em ambos os sistemas.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo Geral

Estudar as propriedades físico-químicas dos filmes interfaciais formados por monocamadas puras de DPPC, DSPE-PEG<sub>2000</sub>, ACP e filmes mistos de DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub> e DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>/ACP.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a pressão e potencial de superfície vs. área por molécula dos filmes interfaciais dos componentes puros (ACP, DPPC, DSPE-PEG<sub>2000</sub>), do sistema binário (DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes concentrações molares de DSPE-PEG<sub>2000</sub> e do sistema ternário DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub>/ACP a diferentes concentrações molares de ACP;
- Determinar a dupla camada elétrica e o momento de dipolo perpendicular do filme interfacial formado por moléculas de ACP em diferentes valores de pH;
- Correlacionar dados teóricos com dados experimentais a fim de estimar a concentração molar em que há mudança de conformação *mushroom* para *brush* das moléculas de PEG tanto no sistema binário quanto no sistema ternário;
- Depositar filmes do sistema binário e ternário em substrato sólido através da técnica de Langmuir-Blodgett;
- Caracterizar estrutural e morfologicamente os filmes do sistema binário e ternário utilizando microscopia de força atômica.

## 1.3. Revisão da Literatura

### 1.3.1. Derivados Pirimidínicos

Os compostos orgânicos que contém núcleo heterocíclico pirimidínico estão associados a um amplo espectro de atividades terapêuticas. Trabalhos pioneiros relataram atividade antifúngica (ANDERSON et al., 1945), antiinflamatória (SADANANDAM; SHETTY; DIWAN, 1992) e antiparasitária (RAM et al., 1992; KANSYL et al., 1992; GANJEE et al., 1997). Além disso, são conhecidos como potenciais agentes no tratamento da arritmia cardíaca (KATAKAMI et al., 1992), hipertensão arterial (NIIYA et al., 1992) e na terapia contra o HIV-1 (WOO et al., 1991; JEONG et al., 1993). Sendo também reconhecidos por suas ações antibacteriana (MENON e PURUSHOTHAMAN, 1996), anti-hiperlipidêmica (GADAD et al., 1996), antituberculose (TRIVEDI et al., 2008) e antitumoral (LIN et al., 2009; DENG et al., 2009; NOLL et al., 2009).

Recentemente, uma série de novos compostos 4-amino-2,6-diaril-5-ciano-pirimidínicos (Figura 1.1) foi sintetizada e sua baixa citotoxicidade e atividade antiinflamatória *in vivo* comprovadas, sendo sua atividade potencializada quando as substituições ocorrem nas posições 2 e 6 do anel pirimidínico (FALCÃO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

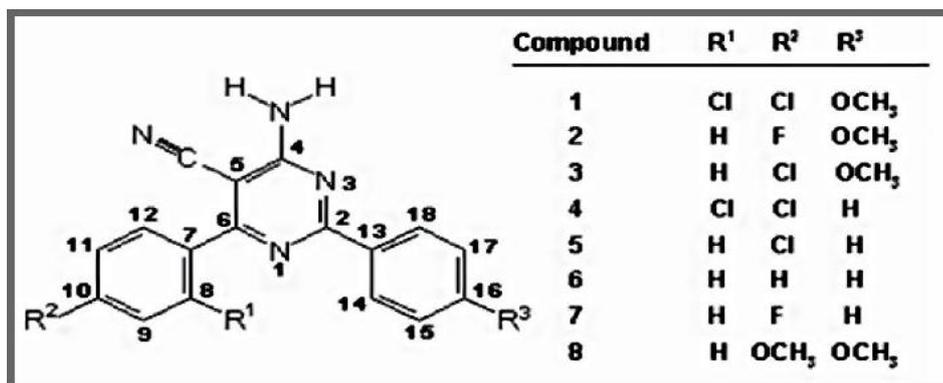


Figura 1.1- Série 4-amino-2,6-diaril-5-ciano-pirimidínicos (SILVA et al., 2008).

Porém, apesar da variedade de efeitos terapêuticos atribuída aos compostos pirimidínicos, os mesmos apresentam baixa solubilidade em solvente aquoso. Desta forma, se torna necessário para a viabilidade de sua administração a sua encapsulação em nanocarreadores de fármacos tais como os lipossomas.

### 1.3.2. Lipossomas

Lipossomas são vesículas constituídas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidios orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso (Figura 1.2) que funcionam como carreadores de fármacos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos (STORM; CROMMELIN, 1995).

Estes nanocarreadores proporcionam uma liberação controlada do princípio ativo encapsulado disponibilizando apenas uma fração terapêutica (ALLEN et al., 1995). Desta forma, o efeito biológico é potencializado e é reduzida a toxicidade local e sistêmica. Além disso, os lipossomas não apresentam toxicidade e envolvem resposta antigênica mínima, pois sua constituição assemelha-se a das membranas plasmáticas (MACHADO, GNOATTO, KLÜPP, 2007; BREWER et al., 2007).

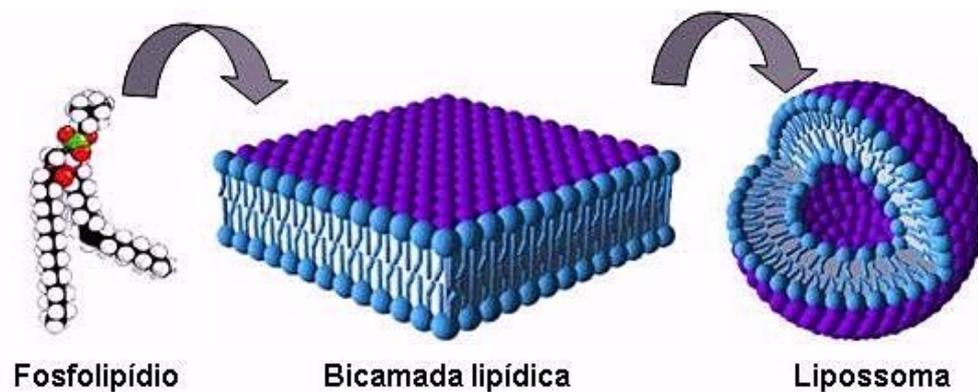


Figura 1.2 – Esquema representativo da constituição do lipossoma (LIRA, 2007).

### 1.3.3. Fosfolípidios

Fosfolípidios são moléculas que fazem parte de uma classe de compostos químicos denominados surfactante. Os surfactantes são considerados anfífilicos, pois apresentam na mesma molécula tanto partes hidrofílica quanto hidrofóbica, e apresentam a capacidade de modificar a tensão de superfície na interface onde estão inseridos, sendo também conhecidos por tensoativos.

A porção hidrofóbica dos tensoativos consiste numa cadeia de hidrocarbonetos variando de 8–18 átomos (normalmente linear) e a porção hidrofílica consiste no grupo cabeça, polar (ou iônico).

A depender do grupo hidrofílico, os tensoativos podem ser classificados da seguinte forma:

- Não-iônicos - quando não apresentam carga;
- Catiônicos - quando apresentam carga positiva;
- Aniônicos - quando apresentam carga negativa;
- Zwitteriônicos ou anfóteros quando apresentam dualidade de cargas, ou seja, tanto carga positiva quanto negativa.

A depender do pH do meio os tensoativos zwitteriônicos podem se comportar como aniônicos ou catiônicos (MANIASSO, 2001). Sendo que todos estes tipos de tensoativos tendem a se auto-organizar na presença de um solvente em agregados de diferentes morfologias a depender de sua constituição, concentração, temperatura do meio entre outros fatores, a fim de atingir estabilidade termodinâmica (FORMARIZ et al., 2005).

Atualmente, além da utilização de fosfolípidios na constituição da membrana lipossomal, especial atenção tem sido dada a misturas de fosfolípidios e lipopolímeros em virtude do aumento da estabilidade e da biocompatibilidade ocasionada por estes (BAEKMARK, et al., 1997; KIM, et al., 2004).

#### **1.3.4. Lipídios peguilados**

Lipídios peguilados ou lipopolímeros são lipídios (geralmente fosfolípidios) que apresentam os grupos polares ligados covalentemente a polímeros de variados tamanhos, estrutura molecular, funcionalidade e hidrofiliçidade. Uma das classes mais conhecidas de lipopolímeros são os fosfolípidios ligados ao polietilenoglicol (PEG), ou seja, lipídios peguilados. A massa molecular das cadeias de PEG geralmente se encontra na faixa de 1-5 KDa (BAEKMARK, et al., 1999; KIM, et al., 2004; TSUKANOVA; SALESSE, 2004; BERMAN; COHEN; REGEV, 2002; GEORGIEV et al., 2007).

Lipídios peguilados ao constituir a membrana externa lipossomal conferem repulsão estérica, impedimento da adsorção de lipoproteínas não-específicas e opsoninas, com isso a estabilidade torna-se aumentada. Tais sistemas se tornam invisíveis ao SFM, o qual é considerado a resposta primária do organismo frente a corpos estranhos (MALZERT et al., 2001; TSUKANOVA; SALESSE, 2004; MARTINA et al., 2007; TANWIR; TSOUKANOVA, 2008; DADASHZADEH; VALI; REZAIE, 2008; KUHL, et al., 1994; BIANCO-PELED et al., 2001).

Dessa maneira, prolonga-se o tempo de circulação sanguínea destes lipossomas comumente conhecidos como lipossomas “stealth<sup>®</sup>” ou lipossomas furtivos (Figura 1.3). Além disso, pode-se ligar o PEG a outros tipos de moléculas com propriedades sítios-específicas com o objetivo de direcionar o carreador para tecidos alvo da terapêutica (KIM et al., 2004; DU; CHANDAROY; HUI, 1997; GEORGIEV et al., 2007; BERMAN; COHEN; REGEV, 2002).

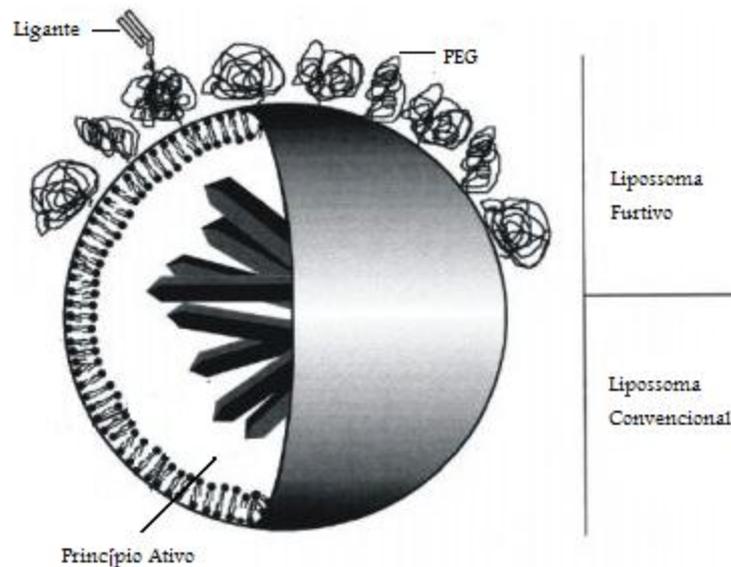


Figura 1.3 - Ilustração do lipossoma “Stealth<sup>®</sup>” ([www.cve.saude.sp.gov.br](http://www.cve.saude.sp.gov.br)).

Além de aumentar a estabilidade das formulações lipossomais, as moléculas de PEG conferem biocompatibilidade e, desta forma, elas têm sido utilizadas não somente em estruturas membranosas, como também, apresentam aplicabilidade em uma variedade de biomateriais que interagem com o organismo como, por exemplo, implantes e biossensores uma vez que são inertes e não-tóxicos, e portanto, não provocam reação imune (TANWIR; TSOUKANOVA, 2008; BERMAN et al., 2002; KUHL et al., 1998).

Porém, apesar do PEG, na superfície do lipossoma, reduzir fortemente as forças de atração e promover um aumento das forças repulsivas, nem sempre é plenamente eficiente na repulsão estérica de proteínas. Este fato tem estimulado uma série de pesquisas visando à elucidação da relação existente entre a massa molecular, conformação das cadeias de PEG e densidade das mesmas com as propriedades estéricas (TANWIR; TSOUKANOVA, 2008; GARBUZENKO; BARENHOLZ; PRIEV, 2005; KENWORTHY et al., 1995).

Atualmente, é conhecido que a estabilização conferida pelo PEG se deve principalmente à barreira estérica e também à carga negativa nas proximidades da molécula do lipopolímero que resulta na diminuição da adsorção não-específica e da permeabilidade de moléculas contendo cargas (TSUKANOVA; SALESSE, 2003).

Em adição, os lipopolímeros apresentam a tendência de se organizar em agregados micelares e, sendo assim, apenas concentrações limitadas podem ser incorporadas na membrana dos lipossomas (LEAL, et al., 2008). Esta concentração está relacionada à conformação assumida por estas moléculas de polímero como ilustrado na Figura 1.4. Na conformação panqueca (*pancake*) o polímero apresenta-se na interface, assumindo uma estrutura bidimensional (2D), com o aumento da concentração a interação entre as cadeias aumenta e o polímero assume a conformação em cogumelo (*mushroom*) com uma estrutura tridimensional (3D) no volume (subfase). Com o contínuo aumento na concentração ocorre uma nova mudança desta vez para a conformação escova (*brush*) em 3D (MAJEWSKI et al., 1997).

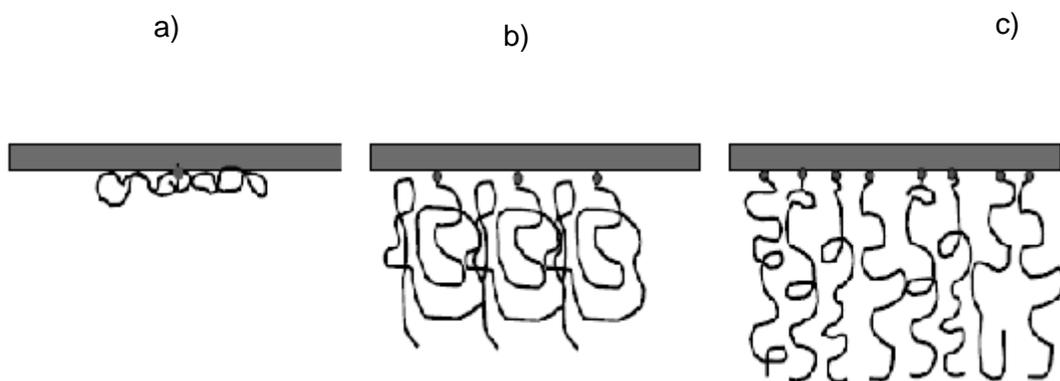


Figura 1.4 - Esquema representativo das moléculas de PEG, evidenciando as mudanças de conformação (a) *pancake*, (b) *mushroom* e (c) *brush*. Adaptada de VERMETTE; MEAGHER, 2003.

Segundo de Gennes (1997) a determinação do regime assumido pelas cadeias de PEG depende da distância entre os sítios peguilados ( $D$ ). O regime *brush* situa-se em  $D < R_F$ , e o regime *mushroom* em  $D > R_F$ . A distância ente os sítios peguilados, por sua vez, pode ser determinada pela seguinte equação:

$$D = (A/M)^{1/2} \quad \text{Eq.1}$$

onde,  $M$  é a fração molar do lipídio peguado e  $A$  é a área por molécula de lipídio na monocamada flutuante (WYSZYNSKI; SOMBOONB; NAKAMOTOB, 2007). Sabe-se que o  $R_F$  do DSPE-PEG<sub>2000</sub> corresponde a 35 Å (LEAL, et al., 2008).

Alguns trabalhos citam que a repulsão estérica conferida pelo PEG ocorre na conformação em brush, ou seja, em altas concentrações destas moléculas (TSUKANOVA; SALESSE, 2004; JEBRAIL et al., 2008). Sendo que a concentração de 1-10 mol% de lipopolímero em alternância com outros lipídios é considerada ótima para a estabilização dos lipossomas (BIANCO-PELED et al., 2001; LEAL, et al., 2008).

Em adição, para que as cadeias de PEG possam repelir biomoléculas de maneira eficaz elas devem recobrir a superfície dos lipossomas de maneira contínua e uniforme. Entretanto, nas últimas décadas tornou-se cada vez mais claro que lipopolímeros não se distribuem uniformemente sobre a matriz de fosfolipídios, mas se agrupam como agregados (domínios) com dezenas a centenas de nanômetros de diâmetro. Este fato pode causar lacunas ou intervalos facilitando o reconhecimento por biomoléculas (TANWIR; TSOUKANOVA, 2008).

Dessa forma, se faz imprescindível o estudo da interação existente entre os fosfolipídios, lipopolímeros e fármacos a serem encapsulados para o entendimento de várias funções biológicas. Para tanto, diversos modelos de membrana são utilizados tais como: camadas flutuantes de Langmuir, micelas, vesículas unilamelares e multilamelares.

### **1.3.5. Filmes de Langmuir**

Quando moléculas surfactantes são dissolvidas em um solvente orgânico volátil e dispersas sobre a superfície da água, ocorre evaporação do solvente e na medida em que ocorre o aumento da concentração de lipídio por área as moléculas de água tendem a superar esta situação energeticamente desfavorável orientando-se ao redor das moléculas apolares de maneira a maximizar entre si as interações por pontes de hidrogênio. Esta interação hidrofóbica da água em conjunto com as interações inter-cadeias fazem com que, com o aumento da densidade, o grupo hidrofílico do fosfolipídio permaneça em contato com a água e o grupo hidrofóbico em direção ao ar como ilustrado na Figura 1.5 (OLIVEIRA JÚNIOR, 1992).

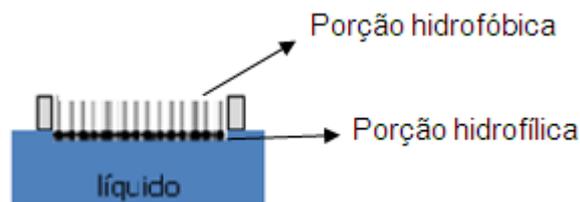


Figura 1.5 – Esquema representativo de moléculas de fosfolipídios formando uma monocamada de Langmuir. Adaptada de RUBINGER et al., 2006.

O filme interfacial resultante tem a espessura de uma molécula e é comumente chamado de camada monomolecular ou simplesmente monocamada. A denominação de monocamada de Langmuir foi dada em homenagem ao cientista Irving Langmuir, cujo trabalho pioneiro foi fundamental para a consolidação desta área de pesquisa (FERREIRA et al., 2005).

Filmes de Langmuir são, portanto, filmes monomoleculares produzidos espalhando-se uma pequena quantidade de um material constituído em geral de moléculas surfactantes sobre a superfície limpa de um líquido (subfase), geralmente água ultrapura. Filmes Langmuir-Blodgett (LB) são obtidos a partir da transferência de um filme molecular de Langmuir, camada por camada, a partir da subfase aquosa para um substrato sólido onde cada camada tem a espessura de uma única molécula (OLIVEIRA JÚNIOR, 1992).

As monocamadas de Langmuir constituídas por fosfolipídios têm sido utilizadas como um modelo simples de membrana celular o que possibilita a simulação dos fenômenos biológicos. A vantagem deste modelo reside principalmente na facilidade com que as variáveis experimentais podem ser manipuladas o que inclui área da superfície e espessura da monocamada (FERREIRA et al., 2005; LEBLANC, 2006).

Existe também, a possibilidade de estudar, em nível molecular, a interação da monocamada com fármacos e enzimas. Ao se introduzir uma substância biologicamente ativa nas monocamadas é possível alterar determinadas características tais como densidade de arranjo dos fosfolipídios, ordenação das moléculas formadoras do filme e propriedades elétricas da monocamada devido a interações específicas com fosfolipídios. A partir da análise dessas mudanças é possível entender a localização e orientação destes compostos na monocamada. Além disso, mecanismos moleculares responsáveis pela ação farmacológica também são mediados por interação com a membrana (BORISSEVITCH et al., 1996; LEBLANC, 2006).

O estudo com monocamadas apresenta a vantagem de permitir a utilização de variáveis específicas como, por exemplo, pressão lateral e área por molécula, as quais não são viáveis no estudo de bicamadas ou vesículas. Além disso, técnicas de caracterização *in situ* muitas vezes são utilizadas na verificação da estrutura, propriedades espectroscópicas e morfológicas. Tais técnicas são utilizadas juntamente com os métodos tradicionais de análises de monocamadas, que são as medidas de pressão e potencial de superfície (a ser discutido nos subitens 1.3.10 e 1.3.11) (DU et al., 1997; FERREIRA et al., 2005; TANWIR; TSOUKANOVA, 2008).

### 1.3.5.1. Filmes de Langmuir- Histórico

As aplicações relacionadas ao fenômeno de formação de filmes sobre a água remontam ao século 18 a.C., com os babilônios, através de práticas de adivinhação pelo espalhamento de óleo sobre a água (BONARDI, 1995). Além disso, tinha-se o conhecimento de que o óleo possuía o “poder” de acalmar as ondas de superfície, sendo utilizado sobre a superfície da água para acalmar mares bravios, porém este efeito estava naquela época mais relacionado à santidade do óleo do que ao fenômeno em si (PAVINATTO, 2006).

Outro tipo de aplicação é expresso na arte de fazer figuras encostando-se uma folha de papel na superfície da água contendo um corante à base de proteínas e outras moléculas orgânicas, técnica esta conhecida como *sumi-nagashi* (OLIVEIRA JÚNIOR; TAYLOR, 1990).

Em 1774, ocorreu a primeira tentativa de colocar o assunto em bases científicas com o cientista Benjamin Franklin. Porém, Investigações mais modernas desses filmes se sucederam com Agnes Pockels (1890), que construiu um protótipo de equipamento para analisar filmes interfaciais e desenvolveu várias das técnicas que são utilizadas atualmente. Contudo, foi Lord John William Rayleigh, baseado nos experimentos de Agnes Pockels, quem primeiro propôs que uma gota de óleo se espalharia sobre a superfície da água até atingir a espessura de uma única molécula, desde que a superfície da água fosse suficientemente extensa (CONSTANTINO, 1995). Lord Rayleigh e colaboradores baseados nos experimentos de Agnes Pockels publicaram na revista *Nature* o primeiro trabalho. Tais filmes pouco tempo depois teriam sua estrutura monomolecular comprovada (PAVINATTO, 2006).

Em 1917 o estudo deste fenômeno foi impulsionado por Irving Langmuir (1881-1957), prêmio nobel de química (Figura 1.6) em 1932 por suas contribuições à química de superfície (ROBERTS, 1990). Langmuir, durante sua estada como pesquisador nos laboratórios da General Electric (Schenectady, New York - US), desenvolveu diversas

técnicas para o estudo da físico-química de monocamadas sobre superfícies aquosas, reunindo dados experimentais e teóricos além de descrever importantes características e propriedades dos filmes monomoleculares (LANGMUIR, 1917; 1920).

Langmuir prestou contribuições nas mais diversas áreas do conhecimento. Ao ser convidado a desenvolver pesquisas na General Electric (GE) foi considerado o primeiro cientista da história moderna a receber infra-estrutura e recursos para a pesquisa livre. Desta forma, pôde desenvolver a pesquisa em áreas de interesse próprio e beneficiou a GE com várias invenções, como por exemplo, bomba de vácuo, lâmpada incandescente e o arco elétrico de hidrogênio. Além disso, Langmuir foi o primeiro a trabalhar com plasma (estado de agregação de gás ionizado que possui propriedades elétricas e magnéticas incomuns) e o primeiro a usar o termo plasma para descrever esses gases. Langmuir contribuiu ainda com a tecnologia desenvolvida durante as duas grandes guerras mundiais no desenvolvimento dos mais variados aparatos, incluindo sonares, entre outros (GUGLIOTTI, 2001).

Mas foi na pesquisa no campo da química de superfície que garantiu o reconhecimento máximo na sua carreira. A demonstração de que monocamadas de ácidos graxos sobre a superfície da água poderiam ser comprimidas e adquirir organização controlada conduziu, posteriormente, à possibilidade de medir tamanhos moleculares de vírus e toxinas (GUGLIOTTI, 2001; PATERNO; MATTOSO; OLIVEIRA JÚNIOR, 2001).



Figura 1.6 - Irving Langmuir e Katharine Burr Blodgett ([www.fis.unipr.it](http://www.fis.unipr.it)).

A partir de 1930 houve um aperfeiçoamento da técnica de filmes de Langmuir por Katharine Burr Blodgett (1898-1979) (Figura 1.6), assistente de Irving Langmuir. Monocamadas de ácidos graxos passaram a ser transferidas para substratos sólidos a partir da superfície aquosa, permitindo a deposição sucessiva de monocamadas sobre um mesmo

substrato sólido. Estas contribuições foram um marco na área de estudos de filmes interfaciais e em homenagem aos dois cientistas tais filmes foram denominados de filmes Langmuir-Blodgett (LB) (CONSTANTINO, 1995; BONARDI, 1995).

Na década de 1960 foram lançadas novas perspectivas para a área através da publicação de Kuhn e Möbius (ROBERTS, 1990) demonstrando a utilização de monocamadas para construção de superestruturas moleculares. Desde então, a técnica tem sido cada vez mais reconhecida como uma das mais importantes na obtenção de estruturas moleculares altamente organizadas.

### 1.3.5.2. A cuba de Langmuir

Na fabricação de filmes interfaciais utiliza-se a cuba de Langmuir, que é composta por: um reservatório para a subfase, barreiras móveis para a compressão do filme, tensiômetro para determinar a pressão de superfície, eletrodo de referência situado no poço da cuba, onde acima da superfície da subfase, se faz presente um sensor de potencial para medida do potencial de superfície e um motor eletromecânico empregado na deposição do filme sobre um substrato sólido. Todo o sistema é controlado através de um computador associado ao equipamento. Devido à necessidade de isolamento com relação à vibração, a cuba é montada em uma mesa antivibratória, especialmente construída para este fim (Figura 1.7).

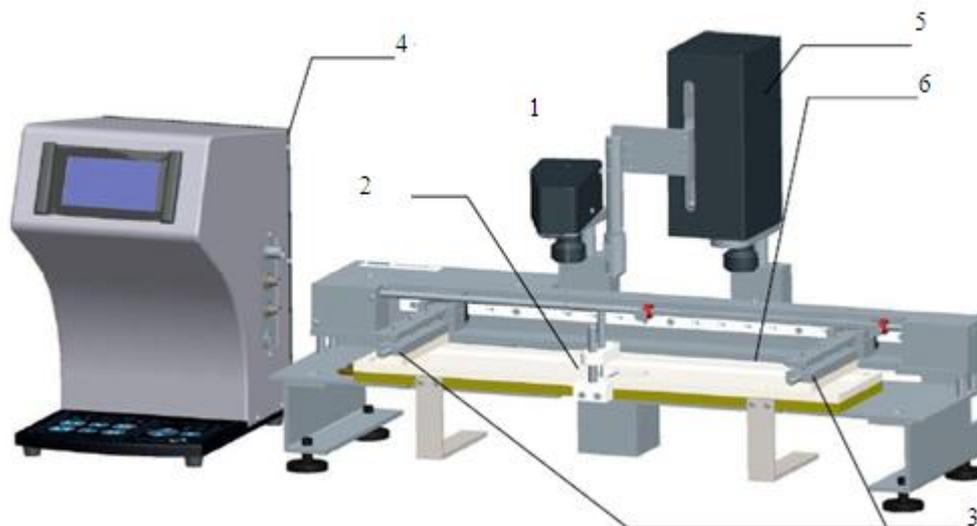


Figura 1.7- Cuba de Langmuir e acessórios (1 - tensiômetro, 2 - cuba, 3 - barreira, 4 - interface, 5 - motor eletromecânico e 6 - eletrodo de referência) ([www.ksv.ltd.com](http://www.ksv.ltd.com)).

A cuba de Langmuir apresenta normalmente a forma retangular e é constituída por um material hidrofóbico, como o Teflon<sup>®</sup> (politetrafluoroetileno - PTFE) onde é colocada a subfase líquida ultrapura. A importância do Teflon reside no fato de que, por ser inerte, não reage quimicamente com a solução espalhada nem com a subfase o que possibilita o trabalho com solventes orgânicos e resiste à maioria das substâncias químicas. Além disso, facilita a limpeza, não permite a existência de micro irregularidades em sua superfície, onde poderiam se acumular impurezas, comprometendo a qualidade da subfase e dos filmes formados (ZANIQUELLI, BUENO, HOMEM, 1993; CONSTANTINO, 1995).

As barreiras podem ser confeccionadas tanto em material hidrofílico como hidrofóbico. Em adição, a compressão das moléculas através de barreiras móveis pode ser simétrica ou assimétrica. Simétrica quando existem duas barreiras que se movem em sentido contrário, sendo em direção ao centro da cuba na compressão do filme ou em direção às laterais na expansão do mesmo. A compressão assimétrica ou unilateral ocorre quando existe apenas uma barreira que se movimenta tanto em direção ao centro da cuba quando em direção às laterais. À medida que ocorre a compressão as moléculas vão se rearranjando na superfície e as medidas de potencial de superfície e pressão de superfície vs. área por molécula vão sendo mensurados formando um gráfico comumente conhecido por isoterma de pressão de superfície e de potencial de superfície respectivamente (BONARDI, 1995).

#### **1.3.5.3. Condições experimentais para a obtenção de filmes de Langmuir**

Para a formação de um filme de Langmuir, um pequeno volume da solução do composto (disperso em solvente volátil e imiscível com a água) é espalhado sobre a superfície da subfase de modo a obter uma monocamada formada apenas por moléculas do material em estudo e sem a presença das moléculas de solvente. Tais moléculas podem se mover livremente no espaço bidimensional correspondente à subfase, formando uma monocamada expandida. Esta monocamada pode, então, ser comprimida por meio de uma barreira deslizante sobre a superfície de forma que o filme pode atingir o grau máximo de ordenação estrutural formando uma monocamada condensada (PATERNO; MATTOSO; OLIVEIRA JÚNIOR, 2001; PAVINATTO, 2006).

A produção de filmes de Langmuir estáveis e, conseqüentemente, filmes de LB de boa qualidade requer a sistematização rigorosa dos procedimentos de limpeza da cuba para a posterior realização dos procedimentos usuais de fabricação, caracterização e deposição das monocamadas e dos parâmetros experimentais (FERREIRA et al., 2005).

As condições mínimas necessárias para se obter resultados reprodutíveis com filmes de Langmuir, incluem: i) uso de material e solventes puros; ii) conhecimento do correto peso molecular do material da monocamada; iii) seleção do solvente; iv) prévia filtração cuidadosa, para reter materiais não dissolvidos; v) limpeza regular da cuba e das barreiras; vi) uso de água ultrapura para a subfase; e, vii) ambiente de trabalho limpo, sem vibração e controle da temperatura da subfase (GAINES, 1966).

Além disso, se faz necessário que a obtenção do filme seja realizada numa sala com alto grau de limpeza. Existem trabalhos que remetem na utilização de sala limpa fechada e acondicionada, com um sistema de ventilação e purificação de ar o qual mantém a pressão positiva no interior da sala evitando, assim, a entrada de partículas em suspensão do exterior. A entrada de pessoas na sala limpa deve ser precedida por uma série de medidas a fim de se minimizar o grau de contaminação. Além destas medidas preventivas, para evitar a contaminação por partículas que sejam aderidas nas roupas de uso diário, são utilizadas vestimentas especiais (aventais, máscaras e botas) e luvas de látex descartáveis, sendo a troca de roupas realizada em uma ante-sala que tem ligação com a sala principal (BONARDI, 1995; CONSTANTINO, 1995).

À medida que ocorre a formação da monocamada na superfície da subfase uma variedade de caracterizações pode ser realizada. As caracterizações mais clássicas consistem nas medidas de pressão de superfície vs. área por molécula (II-A) e potencial de superfície vs. área por molécula ( $\Delta V$ -A). As medidas de pressão de superfície vs. área por molécula levam em consideração a mudança que ocorre na tensão superficial na medida em que ocorre a compressão das moléculas presentes na superfície.

### **1.3.6. Tensão superficial ( $\gamma$ )**

As moléculas presentes no interior do líquido apresentam forças de atração em todas as direções ficando então equilibradas, enquanto isso, moléculas presentes na superfície do mesmo têm suas forças de atração formando uma resultante no sentido do interior do mesmo (Figura 1.8). A tensão superficial surge como resultado do desequilíbrio entre as forças que agem sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da subfase.

A presença de um segundo componente neste sistema pode tanto aumentar quanto diminuir a tensão superficial de uma fase aquosa. São diversos os métodos que podem ser empregados para a determinação da tensão superficial e estes são classificados em estáticos, dinâmicos e de desprendimento (ou separação). Dentre os métodos estáticos

destacam-se o da ascensão capilar, placa de Wilhelmy e anel de DuNoüy. (BEHRING, et al., 2004). O método da placa de Wilhelmy foi utilizado neste estudo e será discutido em detalhes no subitem seguinte.

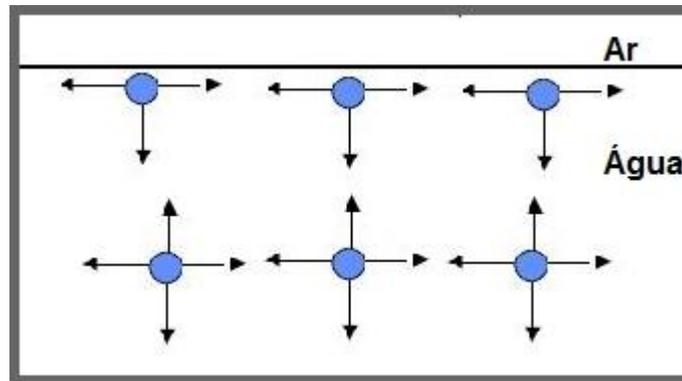


Figura 1.8 – Figura ilustrativa das forças de atração entre as moléculas na superfície e interior do líquido. Adaptada de BORGES et al., 2005.

### 1.3.7. Pressão de Superfície

A pressão de superfície ( $\Pi$ ) resulta da diferença entre a tensão superficial de um líquido puro, geralmente água ( $\gamma_0 = 72,8 \text{ m.Nm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e a tensão superficial deste líquido na presença de surfactantes ( $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ ). Sua mensuração pode ser realizada pelo método da placa de Wilhelmy, um sensor que capta a diferença de tensão de superfície, interceptando a interface ar-água e encontra-se suspenso pelo braço de uma balança eletrônica. Os dados da diferença de tensão de superfície são então convertidos em pressão de superfície à medida que as barreiras vão se movimentando promovendo uma redução da área compreendida entre elas.

As forças que agem sobre a placa de Wilhelmy são a gravidade e a tensão superficial, ambas no sentido do ar para a água, e o empuxo, no sentido contrário. Para uma placa com dimensões  $l \times w \times t$  (respectivamente comprimento, largura e espessura), densidade  $\rho$ , imersa na água até uma profundidade  $h$  tem-se a seguinte equação para a força resultante ( $F$ ) sobre a placa:

$$F = \rho g l w t - \rho' g h w t + 2\gamma(t + w)\cos\theta \quad \text{Eq. 2}$$

onde,  $\gamma$  é a tensão superficial do líquido,  $\theta$  é o ângulo de contato do sensor sólido e  $g$  é a aceleração da gravidade. O procedimento inicial é procurar um material que fique totalmente

perpendicular ao líquido da subfase ( $\theta = 0$ ) e na seqüência acompanha-se a mudança de F a partir de um sensor estacionário. A mudança na força  $\Delta F$  é então relacionada com a mudança de tensão superficial  $\Delta\gamma$  por:

$$\Delta\gamma = \Delta F/2(t + w) \quad \text{Eq. 3}$$

Se o sensor for tão fino que  $t \ll w$ , então  $\Delta F/2w$ , ou seja, a força sentida pela placa é diretamente proporcional à diferença das tensões superficiais ( $\Delta\gamma$ ) em outros termos, à pressão de superfície (ZANIQUELLI; BUENO; HOMEM, 1993).

As isotermas de pressão de superfície por área por molécula ( $\Pi$ -A) são consideradas o mais importante indicador das propriedades das monocamadas de um material. Estas isotermas consistem num gráfico da variação de pressão de superfície em função da área da interface disponível para cada molécula (Figura 1.9). Com a adsorção de moléculas na superfície da água diminui a tensão superficial e a pressão de superfície deve ser sempre positiva à medida que a área disponível na cuba diminui. Na isoterma podemos observar as diferenças de fases ocorridas na monocamada de acordo com a compressão. No estado gasoso as moléculas se apresentam dispersas e à medida que são comprimidas a interação aumenta atingindo a fase líquido-expandida. Na fase líquido-condensada as moléculas encontram-se altamente organizadas e compactadas na interface. O colapso indica que a monocamada atingiu o alto grau de organização e a partir desta fase a monocamada passa a se desestruturar (BONARDI, 1995).

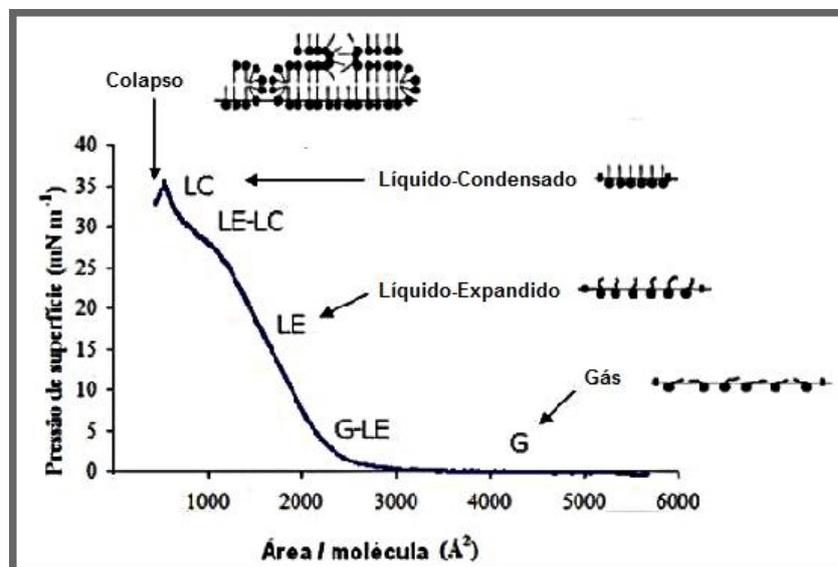


Figura 1.9 - Isoterma  $\Pi$ -A do DPPC (GUIMARÃES, 2009).

Através das isotermas  $\Pi$ - $A$  são obtidas informações a respeito do empacotamento das moléculas, da formação da monocamada, área por molécula, estabilidade da monocamada mista, bem como interação na monocamada mista e presença de fases distintas na monocamada durante o processo de compressão. As medidas das isotermas possibilitam, ainda, o conhecimento da pressão máxima de um filme fino compacto e organizado, sendo utilizado posteriormente na técnica de LB na transferência deste filme para substratos sólidos.

### 1.3.8. Potencial de Superfície

Nas medidas de potencial de superfície ( $\Delta V$ ), parte-se da constatação de que a superfície da água se apresenta naturalmente polarizada devido ao fato de que nesta região os átomos de oxigênio presentes na subfase se orientam em direção ao ar. Dessa forma existe uma diferença de potencial (DDP) na interface e esta DDP é modificada na presença de uma monocamada a depender do momento de dipolo médio das moléculas constituintes e também da reorientação e polarização destas moléculas. Sendo assim,  $\Delta V$  é dado pela DDP entre a superfície e a subfase com a interface contendo o tensoativo ( $\Delta V_2$ ), subtraída da DDP entre a superfície e a subfase com a interface na ausência do tensoativo ( $\Delta V_1$ ), ou seja,  $\Delta V = \Delta V_2 - \Delta V_1$ .

O  $\Delta V$  pode ser medido por uma variedade de métodos e dentre eles o método Kelvin ou da placa vibrante, no qual a interface funciona como um capacitor de placas paralelas, com a subfase sendo uma destas placas ( $p_1$ ) e a outra placa situa-se paralelamente à monocamada acima da superfície ( $p_2$ ). A vibração desta segunda placa causa variação na capacitância gerando uma corrente elétrica ( $i$ ) que flui por uma resistência de carga ( $R$ ). A voltagem neste resistor é amplificada e medida por um detector ( $D$ ), sendo a fonte ( $F$ ) conectada ao eletrodo de referência (ER) ajustada para que se tenha uma corrente elétrica nula, e então o campo elétrico entre as placas (subfase e placa metálica –  $p_1$  e  $p_2$ ) torna-se nulo indicando que o potencial em  $p_1$  é igual ao potencial da superfície limpa  $p_2$ . Este valor  $V_{ref}$  é tomado como referência para as medidas posteriores do potencial de superfície na presença da monocamada quando está sendo comprimida (SCHIMIDT, 2008). A principal vantagem desse método é trabalhar com uma alta impedância de entrada e baixa corrente na saída o que permite medir sinais muito pequenos.

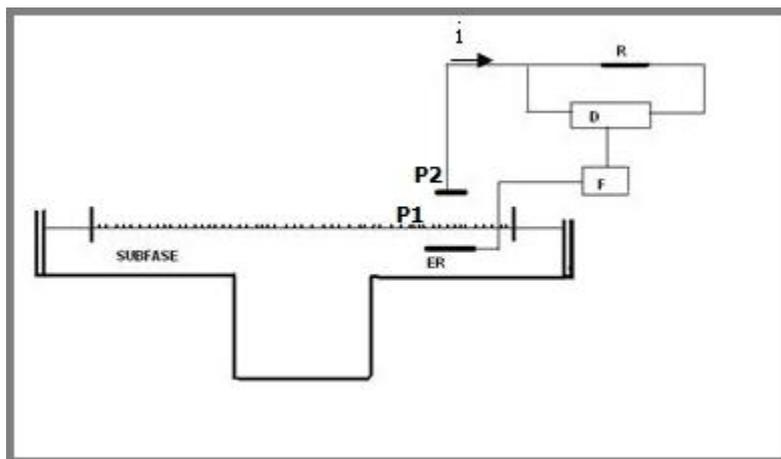


Figura 1.10 - Representação esquemática da medida de potencial de superfície pelo método da placa vibrante (BONARDI, 1995).

### 1.3.9. Monocamadas ionizadas

Determinadas substâncias, quando em monocamadas, são ionizadas a depender do meio em que estão inseridas. Os compostos pirimidínicos em particular, quando em meio ácido tornam-se protonados, sendo muito comum a sua protonação também em soluções aquosas (XU et al., 2007). A monocamada resultante apresenta-se ionizada e a carga da superfície influencia a distribuição dos íons em sua proximidade (VOYUTSKY, 1978). Uma monocamada ionizada além de apresentar forças intermoleculares agindo entre as moléculas do filme e entre estas e a subfase, como ocorre na presença de uma monocamada não-ionizada, apresentam também a particularidade da existência de forças eletrostáticas (repulsivas ou atrativas) e de contra-íons de sinais opostos presentes na solução com o objetivo de neutralizar o meio (GAINES, 1966). O resultado dessa distribuição é o estabelecimento de uma dupla camada elétrica, consistindo de uma camada de íons presentes na monocamada e outra de contra-íons. Esse sistema como um todo contribui para a diferença de potencial através da interface (BONARDI, 1995).

### 1.3.10. Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)

Nesta técnica, os filmes de Langmuir são transferidos para um substrato sólido, através da imersão e retirada do substrato, verticalmente a subfase. A repetição dos processos de imersão e retirada permite a deposição de multicamadas altamente

organizadas e com espessura extremamente fina e controlada (no caso de moléculas ideais chegando a uma molécula de espessura por camada). Vale ressaltar que podemos obter três tipos de filmes de LB a depender da forma de deposição, denominados filmes X, Y, Z (Figura 1.11). O tipo Y implica na deposição de uma camada a cada imersão e retirada do substrato. No tipo Z as camadas são depositadas somente nas retiradas do substrato, enquanto que no tipo X as camadas são depositadas somente nas imersões do substrato (OLIVEIRA JÚNIOR, 1992).

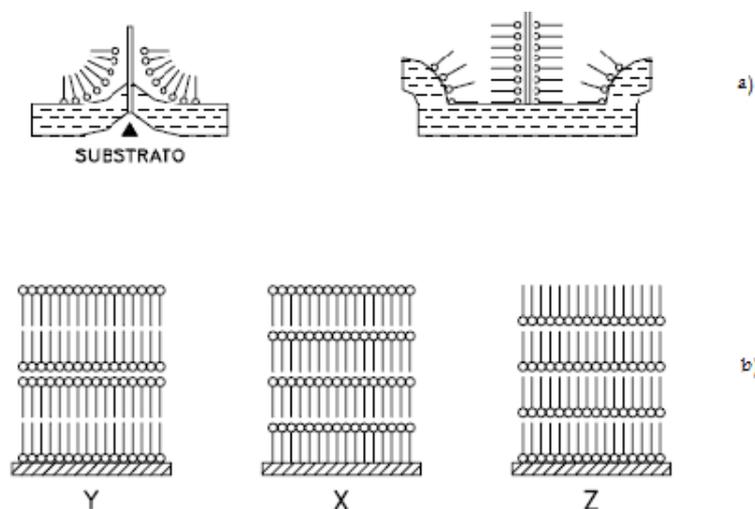


Figura 1.11 – Deposição do filme de Langmuir em substrato sólido através da técnica de LB(a) e deposição tipo X, Y, Z (b). Adaptado de OLIVEIRA JÚNIOR, 1992.

Os filmes de LB surgiram como uma considerável promessa em numerosas aplicações tecnológicas, tais como eletrônica molecular, filmes orgânicos piezoelétricos, óptica não-linear, armazenamento de informação óptica, etc. O desafio para os químicos de superfície, físicos e engenheiros é a utilização da engenharia molecular para manipular a arquitetura dos filmes de forma que forneça as propriedades físicas e químicas desejadas (GAINES, 1966).

Além disso, a técnica de LB se destaca em relação às outras técnicas de preparação de filmes orgânicos por permitir a obtenção de amostras com alto grau de ordem intrínseca na escala molecular. Por esse motivo, essa técnica pode ser utilizada com o intuito de estabelecer uma relação entre a organização estrutural e as propriedades físicas (resistividade, espectros óptico linear e não-linear) de filmes orgânicos finos (TENÓRIO, 2002).

Em adição ao alto grau de ordenamento estrutural, elevado controle da espessura do filme (controlada na ordem de angstroms) juntamente com a uniformidade da superfície, é possível obter propriedades bastante distintas daquelas observadas para o mesmo material em outras formas tais como filmes mais espessos ou pastilhas. Propiciando a possibilidade de planejamento das propriedades finais dos filmes obtidos como, por exemplo, a incorporação de cromóforos apropriados, grupos funcionais e variação da espessura das camadas (PATERNO, MATTOSO, OLIVEIRA JÚNIOR Jr, 2001).

A partir da técnica de LB existe uma variedade de aplicações nas mais diversas áreas como, por exemplo, no desenvolvimento de sensores (SINGHAL et al., 2002; WYSZYNSKI; SOMBOONB; NAKAMOTOB, 2007), uma vez que a utilização de filmes ultrafinos potencializa a transdução do sinal (menor tempo de resposta) além de otimizar o custo uma vez que, se utiliza uma pequena quantidade de moléculas.

A técnica de LB também possibilita a simulação da membrana plasmática, permitindo o estudo da interação de proteínas com monocamadas lipídicas (DU, CHANDAROY, HUI, 1997; DHRUV et al., 2006; DOMÈNECH et al., 2007). Além disso, esta técnica permite o estudo da estrutura molecular e da conformação da superfície destes materiais automontados, o que está intimamente relacionado à sua função biológica e estabilização. Desta forma, pode-se entender a conformação e transição de fase de moléculas biológicas puras e estudar o comportamento destas moléculas em monocamadas mistas, além de facilitar o acesso de ligantes específicos importantes para o reconhecimento molecular (BIANCO-PELED et al., 2001; IVANOVA et al., 2002; TSUKANOVA, SALESSE, 2003; BORDEN et al., 2004; KIM et al., 2004; VOLLHARDT, 2005; GEORGIEV, et al., 2007; TURNER et al., 2007; CHEN et al., 2008).

### **1.3.11. Microscopia de força atômica (AFM)**

Na década de 80 houve o início do desenvolvimento de um grupo de técnicas microscópicas que recebeu a denominação de microscopias de varredura de sonda (scanning probe microscopy - SPM). Atualmente, há diversos tipos de microscópios por sonda, tais como: tunelamento (Scanning Tunneling Microscope - STM), campo próximo (Scanning Near-Field Optical Microscope - SNOM), força atômica (Atomic Force Microscopy – AFM) entre outros (PAIVA, 2003).

O AFM foi desenvolvido por Binning; Quate; Gerber (1986) após a observação de que a ponta do “cantilever” do STM exerce forças sobre a superfície da amostra na mesma ordem das forças interatômicas. Ao combinar este equipamento com um perfilômetro

(aparelho usado para medir rugosidade em escalas microscópicas) foi desenvolvido o AFM. Desta forma, o AFM usa interação entre as forças sonda-amostra para traçar o mapa da superfície e permite a produção de imagens de superfícies não condutoras e condutoras (HOWLAND; BENATAR, 1996).

Após a transferência de uma monocamada de Langmuir para substratos sólidos podemos caracterizar os filmes monomoleculares através do AFM. Esta técnica se baseia na varredura da superfície estudada por meio de sondas de dimensões muito reduzidas alguns micra de comprimento (100 a 200  $\mu\text{m}$ ) e, geralmente, com menos de 20 nm de diâmetro e integrada num “cantilever” flexível. O AFM faz a varredura a distâncias muito pequenas (da ordem de alguns angstroms) proporcionando uma alta resolução na visualização de superfícies em nível atômico.

Para alcançar resolução atômica, a ponta termina num conjunto de átomos e a força de atração ou repulsão entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o “cantilever” se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação a qual é dada pela lei de Hooke:

$$F = -Kx \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo,  $F$  a força de atração,  $k$  a constante elástica da ponta que depende de sua geometria e do material de que é constituída e  $x$  o deslocamento do *cantilever*, pela deflexão provocada pela interação. À medida que a ponta varre a amostra os diferentes tipos de oscilações encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude e, desta forma, vai haver diferentes deflexões e estas diferenças são refletidas por um laser e captadas no detector de quatro quadrantes que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do braço e então estas informações são armazenadas e processadas por um computador que as traduzem em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (FREIRE-NORDI; TACIRO, 2004; MENGUI, 2006 ).

O AFM pode ainda apresentar algumas vantagens em relação ao STM nas análises de materiais biológicos, pois existe a possibilidade de trabalhar tanto em meio líquido quanto em ar permitindo a obtenção de imagens do material em seu meio funcional. Além disso, existe a possibilidade de ser utilizado em baixas temperaturas para a observação de estruturas biológicas congeladas e de se realizar medidas diretas de altura e rugosidade (HODGES, 2002; GÜNTHERODT, WIESENDANGER, 1995; MORRIS et al., 2001).

Apesar da gama de benefícios atribuídos à técnica do AFM, a sua utilização em filmes monomoleculares fornece informações complementares às outras técnicas de caracterização, não devendo, portanto, apresentar conclusões de forma independente.

O próximo capítulo apresenta de maneira detalhada a metodologia das técnicas apresentadas, bem como, os resultados e discussão obtidos nesta pesquisa.

## CAPÍTULO 2 – Propriedades interfaciais de monocamadas flutuantes compostas por um novo derivado pirimidínico e lipopolímero

D.M.N. Luna<sup>a</sup>, E.P.S. Falcão<sup>a</sup>, S.J. Melo<sup>b</sup>, C.A.S. Andrade<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

### 2.1. Resumo

4-amino-2-fenil, 6(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila-pirimidina (APCP) é um novo derivado de pirimidina com baixa solubilidade em água e propriedade antiinflamatória. Neste estudo, os comportamentos interfaciais dos filmes monomoleculares de polietileno glicol enxertado em fosfolipídio (DSPE-PEG<sub>2000</sub>), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), APCP e a mistura destas moléculas foram caracterizados. A isoterma de pressão de superfície-área (II-A) mostrou que as moléculas de APCP e DSPE-PEG<sub>2000</sub> foram estáveis na interface ar-água e poderiam ser inseridos na monocamada flutuante de DPPC. A introdução do APCP na monocamada binária de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) causou um aumento global no potencial de superfície. Análise da variação da distância entre os sítios peguilados e que está associada com uma modificação da conformação de “mushroom” para “brush” foi observado tanto nas monocamadas de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) quanto de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP. Além disso, filmes de Langmuir-Blodgett (LB) contendo filmes das moléculas em estudos, foram transferidos em mica para avaliar sua interação, por imagens de AFM as quais apresentaram forma e tamanho irregular, sendo randomicamente distribuídos.

Palavras-chave: Monocamadas de *Langmuir*; *pirimidinas*; *caracterização interfacial*; *lipídios peguilados*.

---

\*Autor para correspondência: Phone/Fax: +(55) 81 3523.3351; e-mail: csrandrade@gmail.com

## 2.2. Introdução

Compostos que apresentam heterocíclicos pirimidínicos têm sido extensivamente estudados devido às propriedades farmacológicas e biológicas, tais como: atividades antifúngica [1], antiviral [2], antimicrobiana [3], antitumoral e antiinflamatória [4]. Além disso, o anel pirimidínico está presente na estrutura química de vários produtos farmacêuticos como medicamentos antihipertensivo [5], ansiolítico [6], antimicrobiano e antitumoral [7]. A molécula 4-amino-2-fenil,6(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila-pirimidina (APCP) consiste em um novo derivado pirimidínico com propriedades antiinflamatórias comprovadas [4,8].

Recentemente, diversos pesquisadores também tem dado especial atenção na aplicabilidade de moléculas contendo poli(óxido de etileno) (PEO) com baixo peso molecular (PM) na faixa de 1-5 KDa, também conhecidos por poli(etileno glicol) (PEG) [9-11]. PEG possui diversas aplicações biomédicas uma vez que promovem melhoria da biocompatibilidade e isto ocorre devido a redução na adsorção de proteínas, e conseqüentemente do reconhecimento destas moléculas pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) que é geralmente reconhecido como a resposta primária do organismo para os corpos estranhos [12].

A propriedade de reduzir a adsorção de proteínas possibilita sua utilização como modificadores de superfície em materiais que necessitam ser biocompatíveis e possibilita o aumento do tempo de circulação de nanocarreadores na vetorização de fármacos [12]. Conjugados PEG-lipídios ainda podem ser utilizados para mimetizar a estrutura de uma membrana celular em monocamadas, bicamadas e lipossomas [12-14]. A concentração de lipopolímero e o PM da unidade de PEG podem ainda ser modulados para otimizar o tempo de circulação de lipossomas, sabe-se que pelo menos 2mol% de fosfolipídio peguilado (2 KDa) é suficiente para prolongar o tempo de circulação nestes nanossistemas [15].

Diversos estudos têm sido realizados objetivando o entendimento das propriedades dos lipídios peguilados [16]. No entanto, a conformação das cadeias de PEG e seu PM parecem ser os fatores determinantes na potencialização do seu efeito terapêutico [18].

Neste estudo foi realizada a caracterização interfacial de moléculas lipídio-PEG inseridas na monocamada de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina-APCP na interface ar-água, através das técnicas de Langmuir. Além disso, foi realizada a deposição das monocamadas em substrato sólido, para em seguida, caracterizar a morfologia das mesmas

## 2.3. Material e Métodos

### 2.3.1. Material

O derivado pirimidínico utilizado nesta pesquisa foi sintetizado por Melo e colaboradores [4,8]. Fosfolípido contendo poli(etileno glicol) com PM de 2KDa (1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-[poli(etileno glicol)2000], i.e., DSPE-PEG<sub>2000</sub>) e 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) foram obtidos da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL) e Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA), respectivamente, e utilizados sem purificação adicional.

Soluções estoques de DPPC e DSPE-PEG<sub>2000</sub> foram preparadas na concentração de 0,1-0,6 mg/mL pela dissolução em clorofórmio/metanol (9:1, v/v). Além disso, soluções contendo a mistura destes componentes foram preparadas nas razões molares (*x*) de 1, 3, 6, e 9 mol% do DSPE-PEG<sub>2000</sub>. Posteriormente, a cada mistura do componente binário, foi adicionado o derivado pirimidínico (APCP) 1mg/ml em clorofórmio/metanol (9:1, v/v) estando a final na concentração de (*x* = {0,5, 1,5, 3,0 e 4,3 mol%}). Soluções tampão de citrato-fosfato (pH 2,2; 4,8; 6,8 e 7,4) foram preparadas com água ultrapura (Millipore-Synergy<sup>®</sup>) com resistividade de 18mΩ.cm a 20 °C. As estruturas químicas do APCP, DSPE-PEG<sub>2000</sub> e DPPC são apresentadas na Figura 2.1.

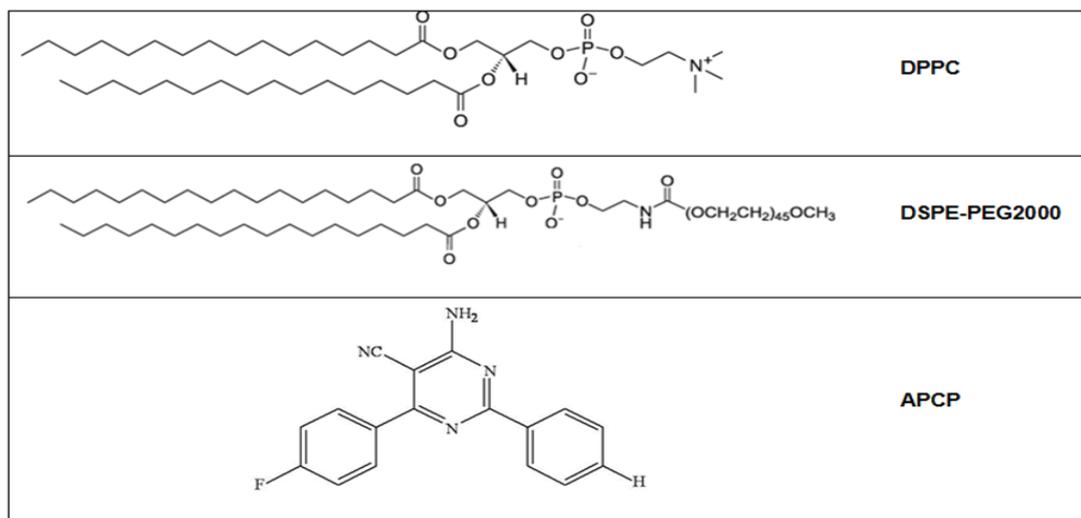


Figura 2.1. Estruturas químicas do APCP, DSPE-PEG<sub>2000</sub> e DPPC.

### 2.3.2. Medidas de pressão e potencial de superfície

As isotermas de pressão de superfície ( $\Pi$ ) versus área molecular ( $A$ ) das monocamadas puras e sistemas mistos de fosfolipídios/APCP foram realizadas em compressão simétrica numa taxa de 10,0 mm/min numa minicuba do tipo Langmuir (KSV Instruments, Finlândia- Software Layer Builder<sup>®</sup>), com uma área total de 273 cm<sup>2</sup>. O sistema foi equipado com uma placa de Wilhelmy e a pressão de superfície foi mensurada com uma acurácia de  $\pm 0,1$  mN/m. Soluções puras e mistas foram espalhadas na interface água-ar através de gotejamento utilizando uma microseringa (Hamilton Company, Reno, NV). A área por molécula média ( $a_{mm}$ ) foi obtida da tangente à isoterma de pressão de superfície.

Através do método da placa vibrante ( $\nu=300$  Hz), o potencial de superfície ( $\Delta V$ ) das monocamadas puras e fosfolipídio/APCP foi medido com um acessório KSV Kelvin com o eletrodo de prova localizado a aproximadamente 2-3 mm acima da superfície da água, e o  $\Delta V$  foi determinado com uma acurácia de  $\pm 10$  mV. Os dados foram coletados utilizando o programa da KSV, enquanto que as isotermas  $\Pi$  e  $\Delta V$  foram apresentadas como uma média de, ao menos, três medidas independentes. Todos os desvios de área de superfície foram menores do que  $\pm 1 \text{ \AA}^2$ .

### 2.3.3. Medidas de microscopia de força atômica

As medidas de microscopia de força atômica (MFA) foram realizadas em um microscópio comercial PicoSPM II (Molecular Imaging, USA). *Cantilevers* com uma ponta de silício (NanoWorld Innovative Technologies, NCHR,  $F_0=320$  KHz, constante nominal de mola  $=42 \text{ N.m}^{-1}$ ) no modo não-contato e em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Para eliminar artefatos, as imagens foram obtidas de, ao menos, três áreas macroscopicamente separadas de cada amostra. A técnica de LB foi empregada para transferir as monocamadas de Langmuir para um substrato sólido. Mica clivada foi utilizada como substrato para deposição. Todas as monocamadas foram depositadas no modo *upstroke* e a velocidade de deposição foi de 1 mm/min. As taxas de transferência ficaram próximas de  $1,0 \pm 0,01$  para todas as deposições.

## 2.4. Resultados e Discussão

Em todos os casos examinados, as isotermas de pressão-área foram obtidas durante a compressão lateral na interface entre o ar e uma solução de tampão citrato-fosfato até o

valor da pressão máxima ( $\Pi_{max}$ ) lateral suportada pelos filmes de Langmuir. Vale ressaltar que o  $\Pi_{max}$  não necessariamente corresponde a pressão de colapso do filme de Langmuir, uma vez que em vários casos o valor máximo alcançado não é uma indicação de uma iminente transição 2D-3D na estrutura de uma monocamada flutuante. A formação de estruturas tridimensionais, pelo crescimento na subfase ou pelo dobramento das camadas, é uma indicação de um filme autenticamente colapsado [19,20].

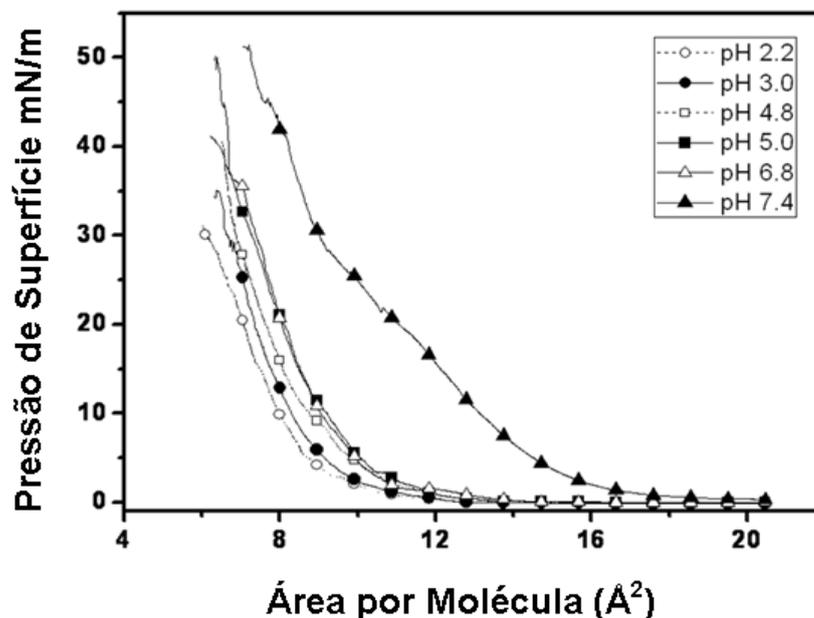


Figura 2.2. Isothermas  $\Pi$ - $A$  das monocamadas de APCP puro a diferentes pH,  $T=18^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 2.2 mostra que a isoterma  $\Pi$ - $A$  do APCP puro numa solução tampão citrato-fosfato numa faixa de pH 2,2 a 7,4. As moléculas de APCP exibem isoterma expandida para toda a faixa de pH analisada. A partir das isoterma analisadas nós observamos que para o pH 7,4 uma transição de gás para líquido-expandida (G/LE) a  $\sim 14 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  ( $\Pi=6 \text{ mN/m}$ ) ocorreu, e, subsequentemente, uma transição líquido-expandida para líquido-condensada (LE/LC) a  $\sim 10 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  ( $\Pi=26 \text{ mN/m}$ ). Em adição, neste pH o  $\Pi_{max}$  foi alcançado ao redor de  $52 \text{ mN/m}$  e a área molecular de  $\sim 8 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , correspondendo ao máximo de compressibilidade.

A relação de potencial de superfície-área por molécula ( $\Delta V$ - $A$ ) para o APCP é apresentado na Figura 2.3, bem como o efeito do pH no comportamento interfacial do

APCP, o qual já foi identificado nas curvas de compressão  $\Pi$ - $A$ . Os dados obtidos do APCP em pH ácido são extremamente relevantes uma vez que a acidificação é uma característica comum associada a processos inflamatórios e o APCP é um derivado pirimidínico com propriedades antiinflamatórias [4,8]. Em adição, a acidose extracelular é uma condição comumente associada a uma grande variedade de situações fisiológicas e patológicas. Em termos gerais, a diminuição da área molecular foi acompanhada por uma notável tendência a maiores valores de potenciais de superfície. Para toda a faixa de pH analisada as isotermas  $\Delta V$ - $A$  apresentaram valores positivos que variaram de 125 mV a 295 mV sob o máximo de compressão. Claramente, o aparente aumento do pH induz a um aumento no potencial de superfície. Em adição, o  $\Delta V$  para cada pH estudado aumenta de maneira progressiva e homogênea, sem a aparente formação de agregados quando a área por molécula é diminuída. Com base nestes achados, nós estimamos como o  $\Delta V$  é afetado pelas variações do pH em áreas correspondentes a  $\Pi=30$  mN/m, valor de pressão de superfície em que as moléculas de APCP foram estáveis.

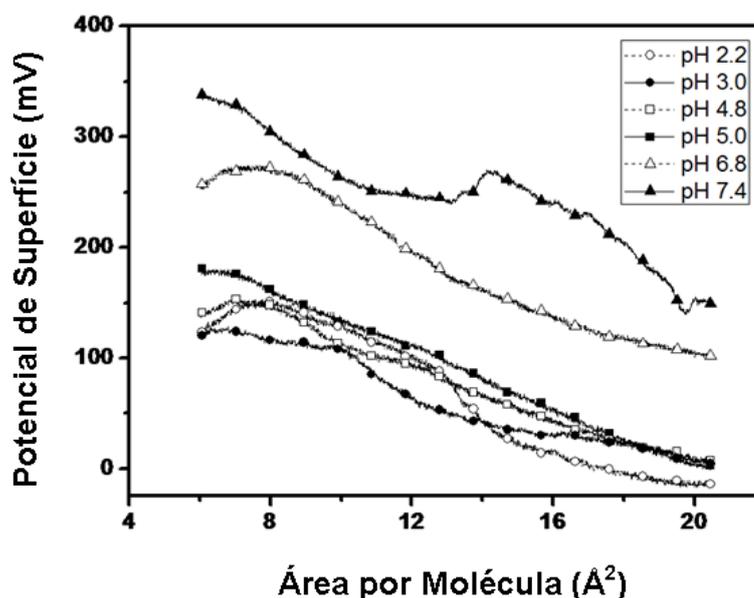


Figura 2.3. Isotermas  $\Delta V$ - $A$  das monocamadas de APCP puro a diferentes pH,  $T=18^{\circ}\text{C}$ .

As modificações observadas para as isotermas  $\Delta V$ - $A$  do APCP podem ser associadas à variações na contribuição da dupla camada de Gouy-Chapman que existe (ao menos parcialmente) em monocamadas ionizadas [21,22]. Geralmente, as moléculas dos derivados pirimidínicos tem um valor de  $pK_a$  em torno de 5,0 [23]. Desta forma, as monocamadas de

APCP são positivamente carregadas na medida em que se aumenta a acidificação do meio, tendo o grau de ionização,  $\alpha$ , dado por:

$$pK = pH_i - \log(\alpha / (1 - \alpha)) \quad \text{Eq. 4}$$

onde  $pH_i$  é o pH na interface ar/água e podem ser determinadas a partir de

$$pH_i = pH_b + e\psi_0 / (2.3kT) \quad \text{Eq. 5}$$

onde  $pH_b$  é o pH da subfase (bulk),  $e$  é a carga elementar,  $k$  é a constante Boltzmann,  $T$  é temperatura, e  $\psi_0$  é a diferença de potencial através da dupla camada. De acordo com a teoria de Gouy-Chapman [24],  $\psi_0$  é dado por

$$\psi_0 = (2kT / e) \sinh^{-1} e\alpha / A(5.88 \cdot 10^{-7} c\epsilon T)^{1/2} \quad \text{Eq. 6}$$

onde  $A$  é a área por molécula,  $c$  é a força iônica (em mol/L) na subfase, e  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio [25]. Considerando que a monocamada flutuante está em equilíbrio eletroquímico com a solução aquosa, o potencial de superfície da monocamada ionizada das moléculas espalhadas pode ser expresso por

$$\Delta V = (12\pi\mu_{\perp} / A_0) + \psi_0 \quad \text{Eq. 7}$$

Espera-se que monocamadas de APCP dispersas em pH ácido, sejam ionizadas. De acordo com a Tabela 2.1, observa-se que as moléculas de APCP são ionizadas positivamente na faixa de pH estudada com o máximo valor de  $\psi_0$  no pH 2.2. O valor positivo está relacionada a protonação do grupo amina do APCP. É razoável propor que a protonação dos nitrogênios tem duas importantes conseqüências para a interação de APCP com DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>). A protonação aumenta sua hidrofiliicidade e afinidade para as regiões com altos valores de  $\epsilon$ , quando comparado com as formas não-protonadas.

Valores  $\Delta V$  foram expressos em termos de momentos de dipolo de superfície,  $\mu_{\perp} = A\Delta V/12\pi$ , onde  $A$  é área molecular, em  $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ ,  $\Delta V$  em milivolts e  $\mu_{\perp}$  foi obtido em unidades de milidebye (mD) [24]. Nós observamos que um aumento no pH de 2,2 a 7,4 produz mais do que duas vezes um aumento no  $\mu_{\perp}$  (Tabela 1). Este aumento é associado com a desprotonação a altos pHs, onde a molécula é encontrada como monocamadas parcialmente ionizadas.

Tabela 2.1 – pH da subfase, área molecular média, potencial de superfície, momento de dipolo e diferença de potencial da dupla camada das monocamadas flutuantes de APCP.

$\text{pH}_{\text{bulk}}$	Área ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ )	$\Delta V$ (mV)	$\mu_{\perp}$ (mD)	$\Psi_0$ (mV)
2.2	6.15	177	29	462.21
4.8	7.27	150	29	392.88
6.8	7.38	271	53	392.88
7.4	9.02	282	67	300.44

A Figura 2.4 mostra as isotermas  $\Pi$ - $A$  das monocamadas DPPC, DSPE-PEG<sub>2000</sub> e sistemas binários DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) em soluções aquosas. Nossos resultados para as moléculas puras estão em concordância com os relatados na literatura [9; 26; 28]. Como esperado, as monocamadas flutuantes do DPPC apresentam um platô associado com a transição de expandido (E) para a fase condensada (C), i.e. condensação das cadeias alquila, a  $\Pi=14$  mN/m correspondendo a uma área molecular média de  $52.3 \text{\AA}^2/\text{molécula}$ .

As isotermas  $\Pi$ - $A$  para o DSPE-PEG<sub>2000</sub> (detalhe da Fig. 3) gradualmente aumenta com a diminuição da área molecular, alcança um pseudoplatô abaixo de  $900 \text{\AA}^2/\text{molécula}$  e apresenta um ponto correspondente a  $600 \text{\AA}^2/\text{molécula}$  que é relativamente grande, sendo seguido pela condensação das cadeias alquila. O platô nas isotermas  $\Pi$ - $A$  das monocamadas de PEO e PEG na interface ar/água é geralmente atribuído a mudanças conformacionais na parte polimérica [28]. Em particular, para os PEOs e PEGs que estão inseridos em solventes considerados ideais na interface ar/água [29], o platô pode ser interpretado como uma transição de “mushroom” para “brush” [30]. Analisando as isotermas  $\Pi$ - $A$  do sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes concentrações molares, nós observamos que as isotermas exibem três regiões: (i) uma expandida abaixo de  $\sim 6\text{mN/m}$ ; (ii) um pseudoplatô com um ponto intermediário em  $\sim 8\text{mN/m}$ ; e, (iii) uma região de baixa

compressibilidade acima de  $\sim 15\text{mN/m}$ . Posteriormente, um perfil mais expandido é observado para o sistema binário quando comparado com a monocamada pura de DPPC.

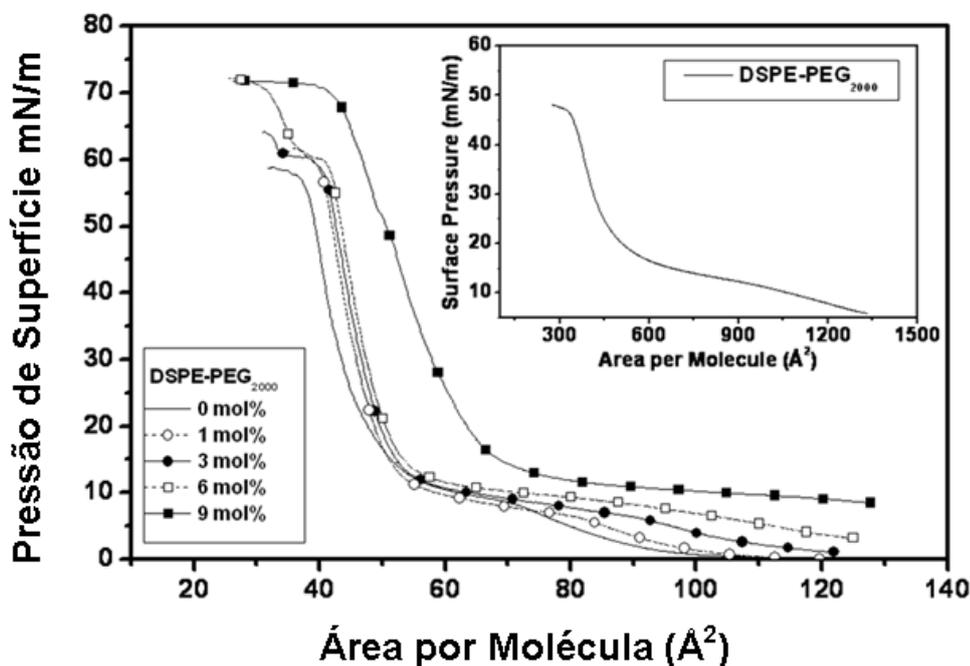


Figura 2.4. Isotermas  $\Pi$ - $A$  do sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes concentrações relativas de PEG-fosfolipídios ( $x = \{1, 3, 6, \text{ e } 9 \text{ mol}\%$ ). Detalhe: Isotherma  $\Pi$ - $A$  da monocamada pura de DSPE-PEG<sub>2000</sub>.

O  $\Pi_{max}$  aumenta proporcionalmente com a concentração molar do DSPE-PEG<sub>2000</sub>; este comportamento pode ocorrer devido a repulsão estérica que ocorre entre as cadeias de PEG. Similarmente, a pressão de colapso ( $\Pi_c$ ) aumenta gradualmente com a concentração molar do DSPE-PEG<sub>2000</sub>, indicando a miscibilidade entre os dois componentes.

Na Figura. 2.5 nós observamos um aumento no  $\Delta V$  com o aumento da concentração molar do fosfolipídio peguilado. A curva para o DPPC puro parte do potencial zero em grandes áreas por molécula e, subsequentemente, aumenta abruptamente a uma dada área crítica. Este comportamento tem sido atribuído, no caso de fosfolipídios e outros compostos alifáticos, a uma diminuição do  $\epsilon$  efetivo na interface monocamada/água, em que acreditamos que ocorra quando uma densidade crítica de empacotamento é alcançada [21]. A introdução do DSPE-PEG<sub>2000</sub> na monocamada de DPPC causa um aumento global no

potencial de superfície. O  $\Delta V_{max}$  foi alcançado a  $\sim 45 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  para todas as concentrações molares de DSPE-PEG<sub>2000</sub>. Em adição, nós observamos a existência de platôs correspondentes a transições de fase G/LE a  $\sim 110 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  e LE/LC a  $\sim 70 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Para a monocamada pura de DSPE-PEG<sub>2000</sub> nós observamos um comportamento expandido com o  $\Delta V_{max}$  alcançando  $\sim 410 \text{ mV}$  e um elevado  $\Delta V$  a grandes áreas moleculares (detalhe da Figura. 2.5).

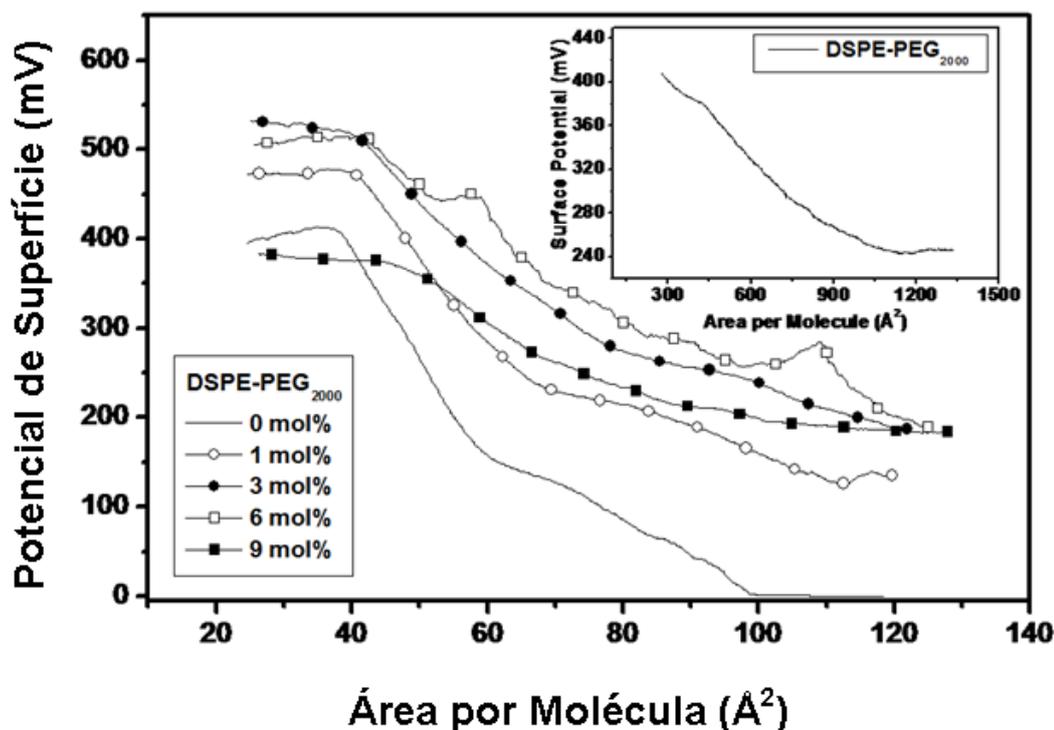


Figura 2.5. Isotermas  $\Delta V$ -A do sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes concentrações relativas de PEG-fosfolípidios ( $x = \{1, 3, 6, \text{ e } 9 \text{ mol}\%\}$ ). Detalhe: Isoterma  $\Delta$ -A da monocamada pura de DSPE-PEG<sub>2000</sub>,  $T=18^\circ\text{C}$ .

A Figura 2.6 mostra as isotermas  $II$ -A para o sistema ternário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP. Quando o conteúdo de APCP é aumentado, a monocamada se torna mais expandida e com maiores amms.

As isotermas  $II$ -A para as monocamadas ternárias DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP possuem um platô LE/LC, similar ao DPPC. A introdução de APCP nas moléculas de DPPC dificulta o empacotamento e isto reflete no perfil das monocamadas expandidas do sistema binário de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) (Figura 2.6), quando comparado aos componentes puros.

A partir da Figura 2.7 nós observamos que a presença de APCP no sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) afeta o potencial de superfície da monocamada, que depende basicamente da componente normal (perpendicular a superfície da água) dos momentos de dipolo das moléculas formadoras do filme e também da contribuição da dupla camada elétrica formada quando a monocamada é ao menos parcialmente ionizada [31].

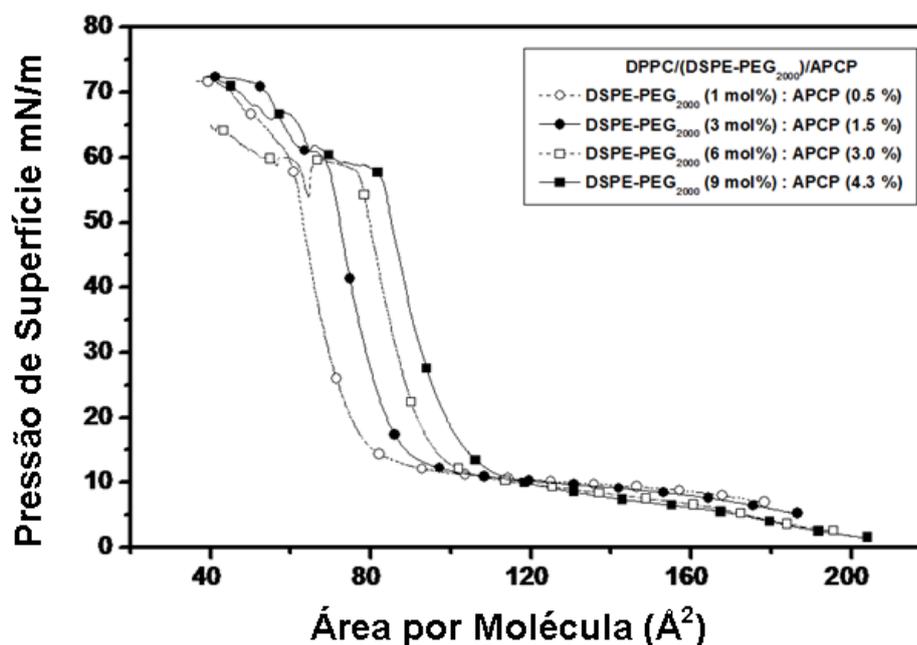


Figura 2.6. Isothermas  $I\Gamma A$  do sistema ternário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP a diferentes concentrações relativas de APCP ( $x = \{0.5, 1.5, 3.0 \text{ e } 4.3 \text{ mol}\%$ }).

A densidade de empacotamento e a orientação das moléculas na interface ar/água parecem ser os parâmetros essenciais para o entendimento dos resultados do  $\Delta V$ . A introdução da molécula de APCP nos sistemas binários de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) provoca um aumento global do  $\Delta V$ . Na Figura 2.7 nós observamos dois regimes aparentes para os valores do potencial de superfície a 0,5-1,5% e 3,0-4,3% para o APCP e  $\Delta V_{max}$  ao redor de 340mV e 450mV para cada regime, respectivamente. Por outro lado, nós podemos observar que as moléculas de APCP parecem ser atraídas pelas regiões polares da monocamada de fosfolipídios, provavelmente porque os seus heterocíclicos ficam acima da superfície da água, praticamente paralelos ao plano da monocamada [32,33]. A carga negativa dos grupos polares dos fosfolipídios atrai o APCP protonado e a carga positiva o repele. Em adição, o empacotamento molecular é, portanto, afetado e, por sua vez, causa uma diminuição da componente normal do  $\mu_{\perp}$  filme.

Com o objetivo de elucidar a conformação adquirida pelas moléculas de PEG na interface ar/água, dados experimentais foram correlacionados com dados teóricos. De Gennes [34] demonstrou que a determinação dos regimes apresentados pelas moléculas de PEG é dependente da distância que existe entre os polímeros ( $D$ ).

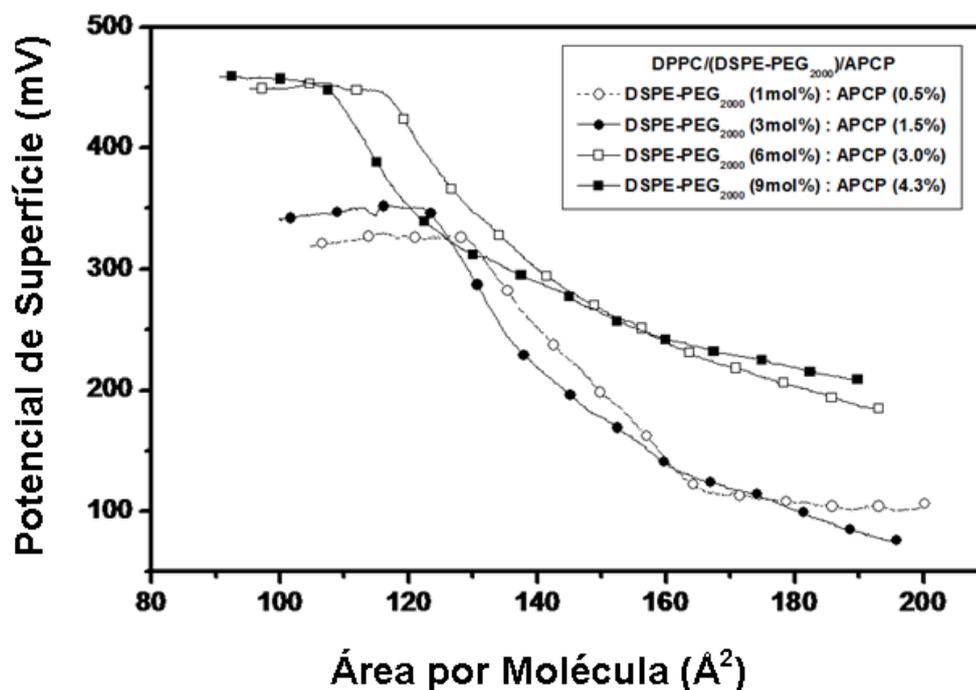


Figura 2.7. Isotermas  $\Delta V$ - $A$  do sistema ternário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP a diferentes concentrações relativas de APCP ( $x = \{0.5, 1.5, 3.0 \text{ e } 4.3 \text{ mol}\%$ }).

Sabe-se que  $D=(A/M)^{1/2}$ , onde  $M$  é a fração molar lipídio peguilado e  $A$  é a área por molécula de lipídio na monocamada flutuante [16].

A partir das análises da variação da distância entre os sítios peguilados, associados com o aumento na concentração molar nas pressões de superfícies de 10, 20, 50 e 60 mN/m, tendo em vista que o  $R_f$  do DSPE-PEG<sub>2000</sub> apresenta o valor de 35 Å, uma modificação de “mushroom” (até 3,0%) para a conformação “brush” (acima de 3,0%) pode ser observada para o DSPE-PEG<sub>2000</sub> no sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) (Figura 2.8). A introdução das moléculas de APCP resulta em maiores valores para a variação da distância, i.e., expansão das monocamadas binárias de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>). Mudanças de DSPE-PEG<sub>2000</sub>, ou seja, modificação conformacional de “mushroom” para “brush” é dificultada, devido a presença do APCP (Figura 2.9), ocorrendo apenas a 9mol% de DSPE-

PEG<sub>2000</sub>, exceto para  $\Gamma=10\text{mN/m}$ . Este aumento pode ser associado com interações eletrostáticas, que retêm as moléculas de APCP nas monocamadas binárias de DSPE-PEG<sub>2000</sub> sob compressão lateral.

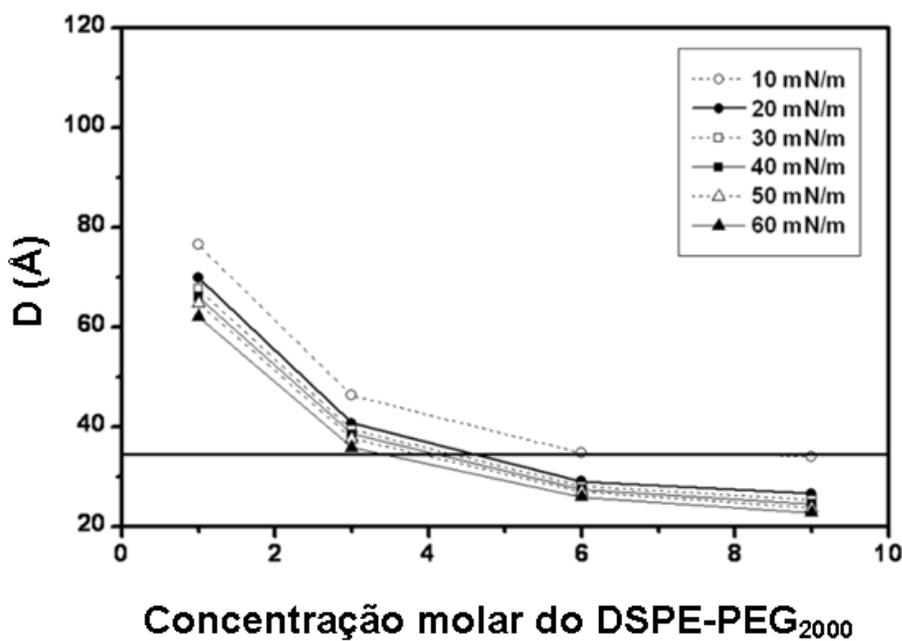


Figura 2.8. Variação da distância entre os sítios peguados (D) para DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) em função do aumento da concentração molar de (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes pressões de superfície.

Informações mais detalhadas da reorganização molecular na monocamada sob compressão foram obtidas utilizando a técnica de AFM. Para tanto, o filme de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) e DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP foram depositados a  $\Gamma=30\text{mN/m}$ , e as imagens de AFM obtidas demonstram estruturas elevadas (fase clara), sobre uma matriz contínua (fase escura) (Figura 2.10). A partir das imagens topográficas sabe-se que os picos observados entre as duas fases encontra-se em torno de 4nm e apresentam forma e tamanho irregulares, sendo randomicamente distribuídos ao longo do substrato. As imagens de AFM do DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) nos permite visualizar uma fina estrutura composta de numerosos defeitos na forma de vales (Figura 2.10a), resultante da reorganização da camada durante o processo de secagem [35,36]. Vales com uma profundidade de ~4nm estão presentes nos grandes domínios e são certamente devido ao estresse durante a elaboração do filme [37]. Em adição, a diferença de altura medida das seções transversais na imagem topográfica do

DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP na Figura 2.10 b mostra que os vales possuem um profundidade de 2-3nm.

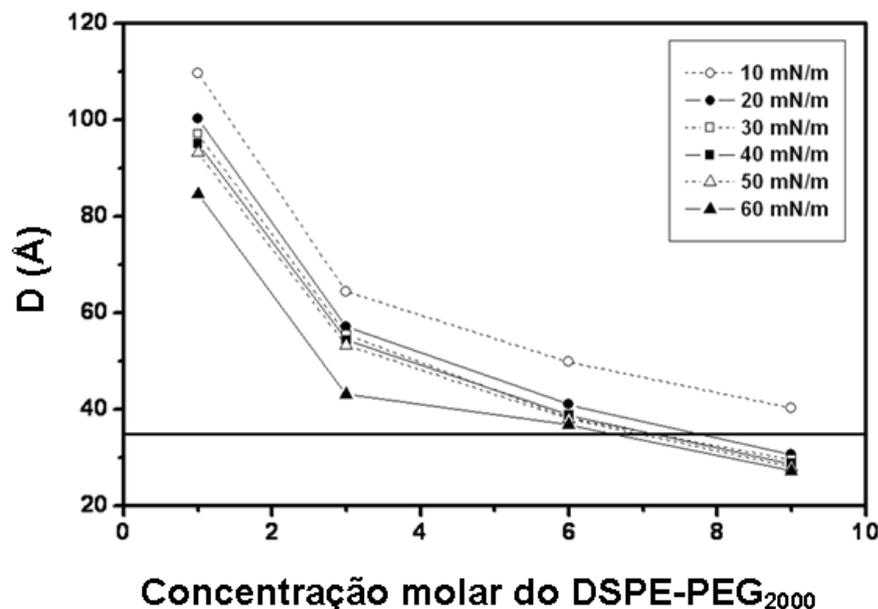


Figura 2.9. Variação da distância entre os sítios peguados (D) para DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP em função do aumento da concentração molar de (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes pressões de superfície.

Para relacionar a morfologia da monocamada, diferentes interações devem ser consideradas, tais como, forças eletrostáticas e forças de van der Waals. Devido à carga negativa presente na superfície da mica [39] e à carga positiva do APCP e das cabeças polares do grupo colina (fosfatidilcolina é grupo polar zwitteriônico com a carga positiva da colina em contato com a superfície da mica), surgem interações eletrostáticas [40]. Em adição, interações de van der Waals que apresentam um papel fundamental nas propriedades mecânicas nas monocamadas dos fosfolípidios, estando envolvidas na coesão das monocamadas dos fosfolípidios com outras moléculas.

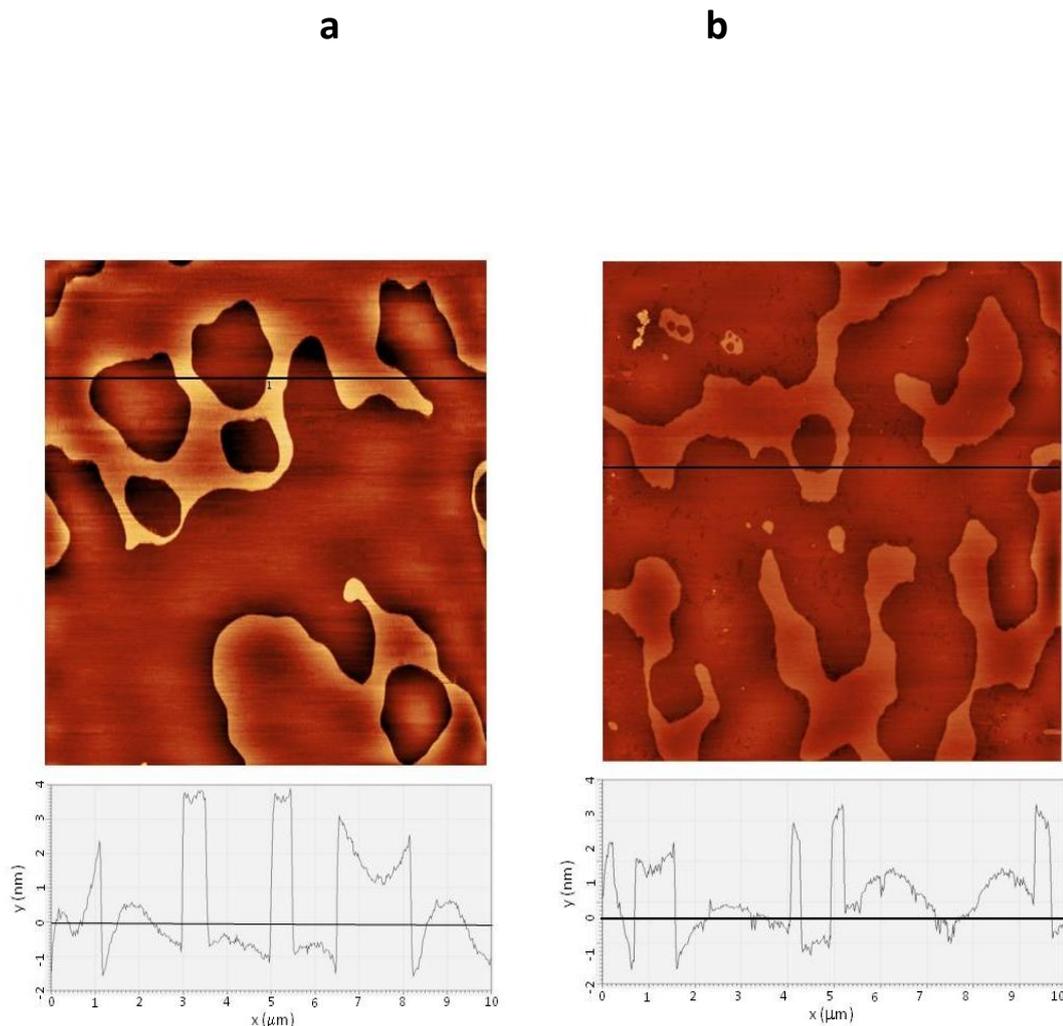


Figura 2.10. Imagem topográfica de MFA ( $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ) de monocamada pura de DPPC/(DSPE-PEG2000) (a) e mista de DPPC/(DSPE-PEG2000)/APCP (b) transferida em mica. A análise da seção ao longo da linha preta nas imagens (a) e (b) mostram que a altura entre os níveis inferior e superior é de aproximadamente 4 nm.

## 2.5. Conclusões

A inclusão de DSPE-PEG<sub>2000</sub> em monocamadas de DPPC resulta na formação de filmes estáveis, densamente organizados e homogêneos. A incorporação de APCP nas monocamadas de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) provoca uma expansão das monocamadas em altas concentrações de APCP e torna a monocamada mais condensada em baixa concentração dos mesmos, provavelmente porque as moléculas de APCP e DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) assumem diferente arranjo molecular a baixas concentrações. Além disso, modificações do DSPE-PEG<sub>2000</sub> de “mushroom” para “brush” são dificultadas, devido a

presença do APCP. A interação entre o APCP protonado e o DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) é estabilizada pelas interações eletrostáticas e a carga negativa do grupo cabeça polar do lipídio interage com o APCP atraindo-o para a região polar. Por fim, as imagens de AFM revelaram ausência de defeitos tanto para o sistema binário quanto para o sistema ternário.

## 2.6. Referências

- [1] G.W. Anderson, I.F. Halverstadt, W.H. Miller, R.O. Roblin, Studies in Chemotherapy.10. Antithyroid Compounds - Synthesis of 5-Substituted and 6- Substituted 2-thiouracils from Beta-Oxoesters and Thiourea, J. Amer. Chem. Soc. 67 (1945) 2197-2200.
- [2] M.N. Nasr, M.M. Gineinah, Pyrido[2,3-d]pyrimidines and pyrimido[5,4-d]pyrido[2,3-d] pyrimidines as new antiviral agents: Synthesis and biological activity, Archiv. Der Pharmazie 335 (2002) 289-295.
- [3] S.R. Kanth, G.V. Reddy, K.H. Kishore, P.S. Rao, B. Narsaiah, U.S.N. Murthy, Convenient synthesis of novel 4-substituted-amino-5-trifluoromethyl-2,7-disubstituted pyrido[2,3-d]pyrimidines and their antibacterial activity, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 1011-1016.
- [4] E.P.D. Falcao, S.J. de Melo, R.M. Srivastava, M.T.J.D. Catanho, S.C. Do Nascimento, Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-(3- and 4-(N-phthalimidophenyl)) pyrimidines, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 276-282.
- [5] K.K. Ho, J.R. Beasley, L. Belanger, D. Black, J.H. Chan, D. Dunn, B. Hu, <sup>a</sup> Klon, S.G. Kultgen, M. Ohlmeyer, S.M. Parlato, P.C. Ray, Q. Pham, Y.J. Rong, A.L. Roughton, T.L. Walker, J. Wright, K. Xu, Y. Xu, L.M. Zhang, M. Webb, Triazine and pyrimidine based rock inhibitors with efficacy in spontaneous hypertensive rat model, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 6027-6031.
- [6] G. Loew, L. Toll, J. Lawson, E. Uyeno, H. Kaegi, Pyrazolo[1,5-a]Pyrimidines - Receptor-Binding and Anxiolytic Behavioral-Studies, Pharmacol. Biochem. Behav. 20 (1984) 343-348.
- [7] P.G. Baraldi, M.G. Pavani, M.D. Nunez, P. Brigidi, B. Vitali, R. Gambari, R. Romagnoli, Antimicrobial and antitumor activity of N-heteroimine-1,2,3-dithiazoles and their transformation in triazolo-, imidazo-, and pyrazolopyrimidines, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 (2002) 449-456.

[8] S.J. de Melo, L.C. dos Santos, E.P.D. Falcao, R.M. Srivastava, C. Luu-Duc, Synthesis of new 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles, *J.Chem. Res.* (2002) 216-217.

[9] V. Tsukanova, C. Salesse, On the nature of conformational transition in poly(ethylene glycol) chains grafted onto phospholipid monolayers, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 10754-10764.

[10] A.M. Díez-Pascual, A. Compostizo, A. Crespo-olín, R.G. Rubio, R. Miller, Adsorption of water-soluble polymers with surfactant character. Adsorption kinetics and equilibrium properties, *J. Coll. Interf. Sci.* 307 (2007) 398-404.

[11] A.M. Díez-Pascual, F. Monroy, F. Ortega, R.G. Rubio, R. Miller, B.A. Noskov, Adsorption of water-soluble polymers with surfactant character. Dilational viscoelasticity, *Langmuir* 23 (2007) 3202-3808.

[12] P. Vermette, L. Meagher, Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms, *Coll. Surf. B-Biointerf.* 28 (2003) 153-198.

[13] H. Bianco-Peled, Y. Dori, J. Schneider, L.P. Sung, S. Satija, M. Tirrell, Structural study of langmuir monolayers containing lipidated poly(ethylene glycol) and peptides, *Langmuir* 17 (2001) 6931-6937.

[14] S. Rex, M.J. Zuckermann, M. Lafleur, J.R. Silvius, Experimental and Monte Carlo simulation studies of the thermodynamics of polyethyleneglycol chains grafted to lipid bilayers, *Biophys. J.* 75 (1998) 2900-2914.

[15] V.P. Torchilin, V.G. Omelyanenko, M.I. Papisov, A.A. Bogdanov, V.S. Trubetskoy, J.N. Herron, C.A. Gentry, Poly(Ethylene Glycol) on the Liposome Surface - on the Mechanism of Polymer-Coated Liposome Longevity, *Biochim. Biophys. Acta* 1195 (1994) 11-20.

[17] A. Pantos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, C.M. Paleos, Interactions of complementary PEGylated liposomes and characterization of the resulting aggregates, *Langmuir* 20 (2004) 6165-6172.

[18] D. Marsh, R. Bartucci, L. Sportelli, Lipid membranes with grafted polymers: physicochemical aspects, *Biochim. Biophys. Acta* 1615 (2003) 33-59.

[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, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 59 (2008) 771-791.

[21] G.P. Borissevitch, M. Tabak, O.N. Oliveira, Interaction of dipyrindamole with lipids in mixed Langmuir monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1278 (1996) 12- 18.

[22] P. Dynarowicz-Latka, A. Cavalli, D.A. Silva Filho, P. Milart, M.C. dos Santos, O.N. Oliveira, Quantitative treatment of surface potentials in Langmuir films from aromatic amphiphiles, *Chem. Phys. Lett.* 337 (2001) 11-17.

[23] G.P. Borissevitch, M. Tabak, I.E. Borissevitch, O.N. Oliveira, Interaction of dipyrindamole derivatives with lipids in mixed floating Langmuir monolayers, *Coll. Surf. B-Biointerf.* 7 (1996) 69-81.

[24] G.L. Gaines, *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*, Interscience Publishers, New York, 1966.

[25] C.A.S. Andrade, <sup>a</sup> Baszkin, N.S. Santos-Magalhaes, L.C.B.B. Coelho, C.P. De Melo, Dielectric properties of Bauhinia monandra and concanavalin A lectin monolayers, part I, *J. Coll. Interf. Sci.* 289 (2005) 371-378.

[26] J.M. Nascimento, C.P. de Melo, N.S. Santos-Magalhaes, V. Rosilio, M.A.M. Maciel, C.A.S. Andrade, Thermodynamic investigation of mixed monolayers of trans-dehydrocrotonin and phospholipids, *Coll. Surf. A- Physicochem. Eng.Aspects* 358 (2010) 42-49.

[27] 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. Coll. Interf. Sci.* 289 (2005) 379-385.

[28] M. Jebrail, R. Schmidt, C.E. DeWolf, V. Tsoukanova, Effect of aliphatic chain length on stability of poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayers at the air/water interface, *Coll. Surf. A- Physicochem. Eng. Aspects* 321 (2008) 168-174.

[29] A.R. Esker, L.H. Zhang, B.B. Sauer, W. Lee, H. Yu, Dilational viscoelastic behaviors of homopolymer monolayers: surface light scattering analysis, *Coll. Surf. A- Physicochem. Eng. Aspects* 171 (2000) 131-148.

[30] H.X. Zhao, P.M. Dubielecka, T. Soderlund, P.K.J. Kinnunen, Interactions of adriamycin, cytochrome c, and serum albumin with lipid monolayers containing poly(ethylene glycol)- eramide, *Biophys. J.* 83 (2002) 954-967.

[31] O.N. Oliveira, D.M. Taylor, T.J. Lewis, S. Salvagno, C.J.M. Stirling, Estimation of group dipole-moments from surface-potential measurements on Langmuir monolayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 85 (1989) 1009-1018.

[32] P.J. Bowen, T.J. Lewis, Electrical Interactions in Phospholipid Layers, *Thin Sol. Films* 99 (1983) 157-163.

[33] M.M. Velázquez, F. Ortega, F. Monroy, R.G. Rubio, S. Pegiadou, L.Pérez, M.R. Infante, Langmuir monolayers of the zwitterionic surfactant hexadecyl 1- N-L- ryptophan glycerol ether, *J. Coll. Interf. Sci.* 283 (2005) 144–152.

[34] P.G. de Gennes, Polymers at an Interface - a Simplified View, *Adv. Coll. Interf. Sci.* 27 (1987) 189-209.

[35] D.K. Schwartz, J. Garnaes, R. Viswanathan, J.A.N. Zasadzinski, Surface order and stability of Langmuir-Blodgett films, *Science* 257 (1992) 508-511.

[36] J.M. Solletti, M. Botreau, F. Sommer, W.L. Brunat, S. Kasas, T.M. Duc, R. Celio, Elaboration and characterization of phospholipid Langmuir-Blodgett films, *Langmuir* 12 (1996) 5379-5386.

[37] J. Frommer, Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy in organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (1992) 1298-1328.

[38] V. Tsukanova, C. Salesse, High-pressure transition of a poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayer at the air/water interface, *Macromol.* 36 (2003) 7227-7235.

[39] S. Nishimura, S. Biggs, P.J. Scales, T.W. Healy, K. Tsunematsu, T. Tateyama, Molecular-scale structure of the cation modified muscovite mica basal-plane, *Langmuir* 10 (1994) 4554–4559.

[40] G. Oncins, L. Picas, J. Hernández-Borrell, S. Garcia-Manyes, F. Sanz, Thermal response of Langmuir-Blodgett films of dipalmitoylphosphatidylcholine studied by atomic force microscopy and force spectroscopy, *Biophys. J.* 93 (2007) 2713–2725.

## DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Em síntese, ao analisar a monocamada de APCP puro, observa-se um perfil expandido e este fato deve-se à protonação do grupo amina presente nesta molécula que se ioniza na faixa de pH estudada. Além disso, nota-se que os valores de potencial de superfície foram positivos e aumentam de forma gradual na medida em que se diminui a área por molécula, este fato se deve tanto à carga positiva presente na superfície quando à contribuição da dupla camada elétrica.

Na isoterma  $\Pi$ -A de DPPC puro foi encontrado um platô associado à transição de expandido (E) para a fase condensada (C), que se deve à condensação das cadeias alquil. Em adição, a isoterma de potencial de superfície parte do potencial zero em grandes áreas por molécula e, subsequentemente, aumenta abruptamente a uma dada área crítica. Este comportamento tem sido atribuído a uma diminuição do  $\varepsilon$  efetivo na interface monocamada/água, que ocorre quando uma densidade crítica de empacotamento é alcançada.

Para a isoterma  $\Pi$ -A do DSPE-PEG<sub>2000</sub> a pressão de superfície aumenta gradualmente com a diminuição da área molecular, sendo que a existência de um pseudoplatô é atribuído a mudanças conformacionais na parte polimérica de uma conformação em “panqueca” para uma conformação em “brush”. Em relação à isoterma de potencial de superfície, o  $\Delta V$  aumenta com o aumento da concentração molar do fosfolípido peguilado.

Para as isotermas  $\Pi$ -A do sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a diferentes concentrações molares, foram observadas três regiões: (i) uma expandida; (ii) um pseudoplatô; e, (iii) uma região de baixa compressibilidade. Além disso, a monocamada apresenta-se mais expandida quando comparada com a monocamada pura de DPPC. O  $\Pi_{max}$  aumenta proporcionalmente com a concentração molar do DSPE-PEG<sub>2000</sub>; este comportamento pode ocorrer devido a repulsão estérica que ocorre entre as cadeias de PEG. Similarmente, a pressão de colapso ( $\Pi_c$ ) aumenta gradualmente com a concentração molar do DSPE-PEG<sub>2000</sub>, indicando a miscibilidade entre os dois componentes. Neste sistema binário, a isoterma de potencial de superfície confirma o comportamento expandido com o aumento global no potencial de superfície a grandes áreas moleculares.

Com a introdução do APCP formando um sistema ternário (DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP) a monocamada torna-se mais expandida e com maiores  $\Pi_{max}$  à medida em que se aumenta a concentração do mesmo. Este fato ocorre devido à molécula de APCP

que dificulta o empacotamento das moléculas presentes no filme. Estes resultados foram confirmados com as isotermas de potencial de superfície onde a introdução do APCP provoca um aumento global do  $\Delta V$ . A carga negativa dos grupos polares dos fosfolipídios atrai o APCP protonado e a carga positiva o repele dificultando o empacotamento molecular. Além disso, sabe-se que em monocamadas de APCP puro o mesmo sofre resistência ao empacotamento com o aumento da protonação do grupo amina, como pode ser confirmado pela diminuição da componente normal do  $\mu_{\perp}$ .

Com o objetivo de estimar o momento em que existe mudança conformacional das cadeias poliméricas de PEG tanto no sistema binário quanto no sistema ternário, dados experimentais foram correlacionados com dados teóricos. Pode-se observar que para o sistema binário DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) uma modificação da conformação em “mushroom” para a conformação em “brush” ocorreu a 3 mol% e que a introdução das moléculas de APCP causa interações eletrostáticas que retêm as moléculas de APCP nas monocamadas binárias de DSPE-PEG<sub>2000</sub> sob compressão lateral, este fato resulta em maiores distâncias entre as cadeias poliméricas e conseqüentemente a mudança conformacional de “mushroom” para “brush” é dificultada, ocorrendo apenas a 9 mol% de DSPE-PEG<sub>2000</sub>, não ocorrendo na menor pressão de superfície analisada.

Informações mais detalhadas da reorganização molecular na monocamada sob compressão foram obtidas utilizando a técnica de AFM. Foram observadas diferença de altura mais significativas na imagem topográfica do DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) em relação às do DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP, pois apesar dos fosfolipídios-PEG apresentarem-se mais ordenados, que o composto ternário, este apresenta a vantagem de possuir forças eletrostáticas atuando entre a superfície negativa do substrato utilizado (mica) e a carga positiva do APCP e do grupo colina. Além disso, as forças de van der Waals também exercem influência.

Diante dos resultados supracitados, podemos afirmar que monocamadas de DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) e DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP podem ser formadas, resultando em filmes estáveis, densamente organizados e homogêneos nas condições realizadas e que a incorporação de APCP torna a monocamada mais expandida, porém este fato não afeta a estabilidade da monocamada. Além disso a transição das cadeias de PEG de “mushroom” para “brush” torna-se dificultada devido a presença do APCP. Imagens de AFM revelaram ausência de defeitos de filmes depositados sobre mica tanto para o sistema binário quanto para o sistema ternário.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, T. M.; HANSEN, C.B.; MENEZES, D. E. L. de. Pharmacokinetics of longo-circulating lipossomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 16, p. 267-284, 1995.
- ANDERSON, G. W.; HALVERSTADT, I. F.; MILLER, W. H.; ROHLIN, R. O. STUDIES IN CHEMOTHERAPY. Antithyroid Compounds - Synthesis of 5-Substituted and 6-Substituted 2-Thiouracils from Beta-Oxoesters and Thiourea. **Journal of American Chemical Society**, vol. 2197, n. 67, 1945.
- BAEKMARK, T. R.; WIESENTHAL, T.; KUHN, P.; ALBERSDÖRFER, A; NUYKEN, O; MERKEL, R. A Systematic Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy and Film Balance Study of the Phase Behavior of Lipopolymer Monolayers at the Air-Water Interface. **Langmuir**, vol. 15, p. 3616-3626, 1999.
- BAEKMARK, T. R.; WIESENTHAL, T.; KUHN, P.; BAYERL, T. M.; NUYKEN, O; MERKEL, R. New Insights into the Phase Behavior of Lipopolymer Monolayers at the Air/Water Interface. IRRAS Study of a Polyoxazoline Lipopolymer. **Langmuir**, vol. 13, p. 5521-5523, 1997.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 2, 2007.
- BEHRING, J L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004.
- BERMAN, A.; COHEN, M.; REGEV, O. Catanionic Vesicle-PEG-Lipid System: Langmuir Film and Phase Diagram Study. **Langmuir**, vol. 18, n. 15, p. 5681-5686, 2002.
- BIANCO-PELED, H.; DORI, Y.; SCHNEIDER, J.; SUNG, L.-P.; SATIJA, S.; TIRRELL, M. Structural Study of Langmuir Monolayers Containing Lipidated Poly(ethylene glycol) and Peptides. **Langmuir**, vol. 17, n. 22, p. 6931-6937, 2001.
- BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, vol. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.
- BONARDI, C. **Potencial de superfície de filmes de Langmuir e Langmuir- Blodgett**. 1995. 75f. Dissertação (Mestre em Ciências – Física Aplicada) – Universidade de São Carlos, São Carlos, 1995.

BORDEN, M. A.; PU, G.; RUNNER, G. J.; LONGO, M. L. Surface phase behavior and microstructure of lipid/PEG-emulsifier monolayer-coated microbubbles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.35, p.209–223, 2004.

BORGES, C. P.; FERRAZ, H. C.; ALVES, T. L. M. et al. Fundamentos e Aplicações de Fenômenos Interfaciais – Série Escola Piloto em Engenharia Química, **COPPE/UFRJ**, 2005.

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

BREWER, M.; ZHANG, T.; DONG, W.; RUTHERFORD, M.; TIAN, Z. R. Future Approaches of Nanomedicine in Clinical Science. **Medical Clinics of North America**, vol 91, n.5, p. 963–1016, 2007.

CHEN, Q.; ZHANG, D.; LI, R.; LIU, H.; HU, Y. Effect of the spacer group on the behavior of the cationic Gemini surfactant monolayer at the air/water interface. **Thin Solid Films**, vol. 516, n. 23, p. 8782–8787, 2008.

CONSTANTINO, C. J. L. **Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de ligninas**. 1995. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência – Física aplicada) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

CUNHA, T. N.; SOARES, I. C.; de GASPARI, E. N. Em busca de lipossomas inteligentes para a administração de drogas para a tuberculose. **Boletim Epidemiológico Paulista**, vol., 4, n. 39, 2007. Disponível em : <[www.cve.saude.sp.gov.br](http://www.cve.saude.sp.gov.br)>, acesso em: 18 de mar. 2011.

DADASHZADEH, S.; VALI, A M.; REZAIE, M. The effect of PEG coating on *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* disposition of topotecan loaded liposomes in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 353, n.1-2, p. 251–259, 2008.

DAVIES, J. T. A surface equation of state for charged monolayers. **Journal of Colloid and Science**, vol. 11, n 4-5, p. 377-390, 1956.

de GENNES P.G. Polymers at an Interface - a Simplified View. **Advances in Colloids and Interfaces Science**, vol. 27, p. 189-209, 1987.

DENG, Y.; ZHOU, X.; DESMOULIN, S. K.; WU, J.; CHERIAN, C.; HOU, Z.; MATHERLY, L. H.; GANGJEE, A . Synthesis and Biological Activity of a Novel Series of 6-Substituted Thieno[2,3-*d*]pyrimidine Antifolate Inhibitors of Purine Biosynthesis with Selectivity for High Affinity Folate Receptors over the Reduced Folate Carrier and Proton-Coupled Folate

Transporter for Cellular Entry. **Journal of medicinal Chemistry**, vol. 52, p. 2940–2951, 2009.

DHRUV, H.; PEPALLA, R.; TAVERAS, M.; BRITT, D. H. Protein Insertion and Patterning of PEG Bearing Langmuir Monolayers Harshil. **Biotechnology Progress**, vol. 22, n. 1 p.150-155, 2006.

DIPARTIMENTO DI FISICA. Università Degli Studi di Parma. Disponível em: <[www.fis.unipr.it](http://www.fis.unipr.it)>, acesso em: 20 de fev. 2011.

DOMÈNECH, O.; REDONDO, L.; MONTERO, M. T.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J. Specific Adsorption of Cytochrome *c* on Cardiolipin-Glycerophospholipid Monolayers and Bilayers. **Langmuir**, vol. 23, p.5651-5656, 2007.

DU, H.; CHANDAROY, P.; HUI, S. H. Grafted poly-ethylene glycol/on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1326, n. 2, p. 236–248, 1997.

FALCÃO, E. P. S.; MELO, S. J. ; SRIVASTAVA, R. M. ; CATANHO, T. J. A. ; NASCIMENTO, S. C. . Synthesis and Anti-inflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 41, n. 000, p. 276-282, 2006.

FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA JR.; O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de langmuir e langmuir-blodgett (LB). **Química Nova**, vol. 28, n. 3, p.502-510, 2005.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A. da; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. de. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 3, 2005.

FREIRE-NORDI, C. S.; TACIRO, C.; BERNARDES-FILHO, R.; PARIZOTO, N. A. Obtenção de imagens de algas por microscopia de força atômica. **Comunicado técnico** 63, 2004.

GADAD, S. G.; ANEGUNDI, R. I.; PATTAN, S. R.; MAHAJANSHETTI, C. S.; SHISHOO, C. J. Synthesis and Antihyperlipidemic Activity of some 2-aminomethyl-3-aryl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo (b) 5,6-dimethylthieno (2,3-d)-pyrimidin-4-ones. **Arzneim**, vol. 46, n. 10, p. 981-985, 1996.

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

GANJEE, A.; DEVRAJ, R.; QUEENER, S. F. Synthesis and Dihydrofolate Redutase Inhibitory Activities of 2,4-Diamino-5-deaza and 2,4-Diamino-5,10-dideaza Lipophilic Antifolates. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 40, n. 4, p. 470-478, 1997.

GARBUZENKO, O; BARENHOLZ, Y.; PRIEV, A Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 135, n.2, p. 117–129, 2005.

GEORGIEV, G. A; SARKER, D. K.; AL-HANBALI, O; GEORGIEV, G. D.; LALCHEV, Z. Effects of poly (ethylene glycol) chains conformational transition on the properties of mixed DMPC/DMPE-PEG thin liquid films and monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 59, n. 2, p. 184–193, 2007.

GUGLIOTTI, M. Irving Langmuir: o milagre da ciência. **Química Nova**, vol. 24, n. 4, p. 568-572, 2001.

GUIMARÃES, J. A. **Estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett visando o desenvolvimento de biossensor de colesterol**. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GÜNTHERODT, H.-J.; WIESENDANGER, R. **Scanning Tunneling Microscopy II**, 2 ed. Springer, 1995.

HODGES, C. S. **Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids**. **Advances in Colloid And Interface Science**, vol. 99, n.1, p. 13-75, 2002.

HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Pratical Guide to Scanning Probe Microscopy**, Park Scientific Instruments, 1996.

IVANOVA, TZ.; SAULNIER, P.; MALZERT, A; BOURY, F.; PROUST, J. E.; PANAIOTOV, I. Basic and enzymatic hydrolysis in mixed polyethylene glycol/poly(D,L-lactide-co-glycolide) films spread at the air-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 23, n.10, p. 7–21, 2002.

JEBRIL, M.; SCHMIDT, R.; DEWOLF, C. E.; TSOUKANOVA, V. Effect of aliphatic chain length on stability of poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayers at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 321, n. 1-3, p. 168–174, 2008.

JEONG, L. S.; SCHINAZI, R. F.; BEACH, J. W.; KIM, H. O.; NAMPALLI, S.; SHANMUGANATHAN, K.; ALVES, A.; J.; MCMILLAN, A.; CHU, C. K.; MATHIS, R. Asymmetric Synthesis and Biological Evaluation of  $\beta$ -L-(2R,5S)- and 2-L-(2R,5R)-1,3-

Oxathiolane-Pyrimidine and Purine Nucleosides as Potential Anti-HIV Agents. **Journal of medicinal chemistry**, vol. 36, n.2, 1993.

KANSYL, M.; SEYDEL, J. K.; WIESE, M.; HALLER, R. SYNTHESIS OF NEW 2,4-DIAMINO-5-BENZYLPIRIMIDINES ACTIVE AGAINST VARIOUS BACTERIAL SPECIES. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 27, n. 3, p. 237-244, 1992.

KATAKAMI, T.; YOKOYAMA, T.; MIYAMOTO, M.; MORI, H.; KAWAUCHI, N.; NOBORI, T.; SAN-NOHE, K.; KAIHO, T. Synthesis and Pharmacological Studies of N-Substituted 6-[(2-Aminoethyl) amino]-1,3-dimethyl-2,4 (1*H*, 3*H*)-pyrimidinediones, Novel Class III antiarrhythmic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 35, p. 3325-3330, 1992.

KENWORTHY, A. K.; HRISTOVA, K.; NEEDHAM, D.; MCINTOSH, T. J. Range and Magnitude of the Steric Pressure Between Bilayers Containing Phospholipids with Covalently Attached Poly(ethylene glycol). **Biophysical Journal**, vol. 68, n.5, p. 1921-1936, 1995.

KIM, K.; SHIN, K.; KIM, H.; KIM, C.; BYUN, Y. In Situ Photopolymerization of a Polymerizable Poly(ethylene glycol)-Covered Phospholipid Monolayer on a Methacryloyl-Terminated Substrate. **Langmuir**, vol. 20, n. 13, p. 5396-5402, 2004.

KSV INSTRUMENTS. Operation manual LB device. **KSV minitroug, Revison 1.1**, p.25. Disponível em : <[www.ksvltd.com](http://www.ksvltd.com)>, acesso em: 20 de fev. 2011.

KUHL, T. L.; LECKBAND, D. E.; LASIC, D. D.; ISRAELACHVILI, J. N. Modulation of Interaction Forces Between Bilayers Exposing Short-Chained Ethylene Oxide Headgroups. **Biophysical Journal**, vol. 66, n. 5, p. 1479-1488, 1994.

KUHL, T. L.; MAJEWSKI, J.; WONG, J. Y.; STEINBERG, S.; LECKBAND, D. E.; ISRAELACHVILI, J. N.; SMITH, G. S. A Neutron Reflectivity Study of Polymer-Modified Phospholipid Monolayers at the Solid- Solution Interface: Polyethylene Glycol-Lipids on Silane-Modified Substrate. **Biophysical Journal**, vol. 75, n. 5, p. 2352-2362, 1998.

LANGMUIR, I. The Mechanism of the Surface Phenomena of Flotation. **Transactions of the Faraday Society**. vol. 15, p.62-74, 1920.

LANGMUIR, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. **Journal of the American Chemical Society**. vol. 39, n. 9, p.1848-1906, 1917.

LEAL, C; RÖGNVALDSSON, S.; FOSSHEIM, S.; NILSSEN, E. A; TOPGAARD, D. Dynamic and structural aspects of PEGylated liposomes monitored by NMR. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 325, n. 2, p. 485-493, 2008.

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

LIN, R.; JOHNSON, S.G.; CONNOLLY, P. J.; WETTER, S. K.; BINNUN, E.; HUGHES, T.V.; MURRAY, W. V.; PANDEY, N. B.; MORENO-MAZZA, S. J.; ADAMS, M.; FUENTES-PESQUERA, A.R.; MIDDLETON, S. A. Synthesis and evaluation of 2,7-diamino-thiazolo[4,5-d] pyrimidine analogues as anti-tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 19, p. 2333–2337, 2009.

LIRA, M. C. B. **Complexo de inclusão ácido úsnico:β-ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MACHADO, L. C.; GNOATTO, C. A; KLÜPPEL, M. L. W. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**, vol. 29, n. 67, p. 215-224, 2007.

MAJEWSKI, J.; KUH, T. L.; GERSTENBERG, M. C.; ISRAELACHVILI, J. N.; SMITH, G. S. Structure of Phospholipid Monolayers Containing Poly(ethylene glycol) Lipids at the Air-Water Interface. **Physical Chemistry B**. Vol. 101, n. 16, p. 3122-3129, 1997.

MALZERT, A.; BOURY, F.; SAULNIER, P.; BENOÎT, J. P.; PROUST, J. E. Interfacial Properties of a PEG2000-PLA50 Diblock Copolymer at the Air/Water Interface. **Langmuir**, vol 17, n. 25, p. 7837-7841, 2001.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, vol 24, n.1, p. 87-93, 2001.

MARTINA, M. -S.; NICOLAS, V.; WILHELM, C.; MÉNAGER, C.; BARRATT, G.; LESIEUR, S. The in vitro kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages. **Biomaterials**, vol. 28, n. 28, p. 4143–4153, 2007.

MENGUI, U. A. **Crescimento por MBE e caracterização de filmes SnTe e heteroestruturas de SnTe/Sn<sub>1-x</sub>EuxTe sobre BaF<sub>2</sub>**. 117f. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais) Instituto Nacionais de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2006.

MENON, R. G.; PURUSHOTHAMAN, E. Synthesis and Antimicrobial Activities of Pyridocinnolinedithiones, their bis (alkylthio) derivatives and 4-amino-2-ethylthiopyrimidocinnolines. **Indian Journal of Chemistry**, vol. 35B, n. 11, p. 1185-1189, 1996.

MORRIS, V. J.; MACKIE, A. R.; WILDE, P. J.; KIRBY, A. R.; MILLS, E. C. N.; GUNNING P. Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers at the molecular level. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, vol. 34, n. 1, p 3-10, 2001.

NIIYA, K.; OLSSON, R. A.; THOMPSON, R. D.; SILVIA, S. K.; UEEDA, M. 2-(N'-Alkylidenehydrazino) adenosines: Potent and Selective Coronary Vasodilators. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 35, p. 4557-4561, 1992.

NOLL, S.; KRALJ, M.; SUMAN, L.; STEPHAN, H.; PIANTANIDA, I. Synthesis of modified pyrimidine bases and positive impact of chemically reactive substituents on their in vitro antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 44, p. 1172-1179, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. de; TAYLOR, D. M. O largo potencial dos filmes ultra-finos. **Revista ciência hoje**, vol. 12, n. 67, 1990.

OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. de. Langmuir-Blodgett Films - Properties and Possible Applications. **Brazilian Journal of Physics**, vol. 22, n. 2, 1992.

PAIVA, E. C. **Estudo do processo de nucleação de cdte crescido sobre si (111) por epitaxia de paredes quentes (hwe)**. 2003. 58f. Tese (Doutorado em Física Aplicada), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003.

PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA Jr., O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, vol. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

PAVINATTO, F. J. **Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de azopolímeros com controle do tamanho da cadeia e posição dos cromóforos**. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em ciência e Engenharia de materiais interunidades) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RAM, V. J.; HAQUE, N.; GURU, P. Y. Chemotherapeutic agents XXV: synthesis and leishmanicidal activity of carbazolympirimidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 27, p. 851-855, 1992.

ROBERTS G.G.; **Langmuir-Blodgett films** – Plenum Press, New York, 1990.

RUBINGER, C. P. L.; MOREIRA, R. L.; CURY, L. A. et al. Langmuir-Bldgett ans Langmuir-Schaefer Films of Poly(5-amino-1-naphthol) Conjugated Polymer. **Applied Surface Science**, vol. 253, p. 543-548, 2006.

SADANANDAM, Y. S.; SHETTY, M. M.; DIWAN, P. V. Synthesis and biological evaluation of new 3,4-dihydro-6-methyl-5-*N*-methyl-carbamoyl-4-(substituted phenyl)-2(1*H*)pyrimidinones and pyrimidinethiones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Vol. 27, n. 1, p. 87-92, 1992.

SCHMIDT, T. F. **Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces nanoestruturadas**. 2008. 151f. Dissertação (Mestrado em ciência e engenharia dos materiais) - Universidade de São Paulo, São carlos, 2008.

SILVA, J. B. P.; BARRO NETO, B. ; MELO, S. J.; FALCÃO, E. P. S.; CATANHO, T. J. A. Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) of 4-Amino-2,6-Diarylpyrimidine-5-Carbonitriles Having Anti-inflammatory Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 19, p. 337-343, 2008.

SINGHAL, R.; GAMBHIR, A.; PANDEY, M. K.; ANNAPOORNI, S.; MALHOTRA, B. D. Immobilization of urease on poly(N-vinyl carbazole)/stearic acid Langmuir Blodgett films for application to urea biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, vol.17, n.8, p.697-703, 2002.

STORM, G.; CROMMELIN, D. J. A. Liposomes: quo vadis? **Pharmaceutical science & technology today**, vol. 1, n. 1, p.19-31, 1998.

TANWIR, K.; TSOUKANOVA, V. Lateral Distribution of a Poly(ethylene glycol)-Grafted Phospholipid in Phosphocholine Monolayers Studied by Epifluorescence Microscopy. **Langmuir**, vol 24, n. 24, p. 14078-14087, 2008.

TENÓRIO, A. C. **Propriedades espectroscópicas e elétricas de filmes de Langmuir-Blodgett do ácido retinóico**. 2002. 242f. Tese (Doutorado em Ciências)– Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nat. Rev. Drug Discov**. Vol 4, p. 145–160, 2005.

TRIVEDI, A. R.; DODIYA, D. K.; RAVAT, N. R.; SHAH, V. H. Synthesis and biological evaluation of some new pyrimidines via a novel chalcone series. **General papers-Department of Chemistry, Saurashtra Uversity, ARKIVOK (xi)**, p. 131-141, 2008.

TSUKANOVA, V.; SALESSE, C. High-Pressure Transition of a Poly(ethylene glycol)-Grafted Phospholipid Monolayer at the Air/Water Interface. **Macromolecules**, vol. 36, n. 19, p. 7227-7235, 2003.

TSUKANOVA, V.; SALESSE, C. On the Nature of Conformational Transition in Poly(ethylene glycol) Chains Grafted onto Phospholipid Monolayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, vol. 108, n. 30, p. 10754-10764, 2004.

TURNER, N. W.; WRIGHT, B. E.; HLADY, V. ; BRITT, D. W. Formation of protein molecular imprints within Langmuir monolayers: A quartz crystal microbalance study. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 308, n. 1, p. 71–80, 2007.

VERMETTE, P.; MEAGHER, L. Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 28, p. 153-198, 2003.

VOLLHARDT, D. Effect of interfacial molecular recognition of non-surface-active species on the main characteristics of monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 116, n. 1-3, p.63 – 80, 2005.

VOYUTSKY, S. **Colloid Chemistry**; Mir Publishers, Moscou, Russian, 1978.

WOO, P. W. K.; KOSTLAN, C. R.; SIRCAR, C. J.; DONG, M. K.; GILBERTSEN, R. B. Inhibitors of Human Purine Nucleoside Phosphorilase. Synthesis and Biological Activities of 8-amino-3-benzylhypoxanthine and Related Analogues. **Journal of Medicinal chemistry**, vol. 35, p. 1451-1457, 1991.

WYSZYNSKI, B.; SOMBOONB, P.; NAKAMOTOB, T. Pegylated lipids as coatings for QCM odor-sensors. **Sensors and Actuators B**, vol. 121, n. 2, p. 538–544, 2007.

XU, M.; SUN L.; YIN, S.; LIU, C.; WU, L. Monolayer behavior of a pyridyl head-group-containing amphiphile and its miscibility with poly(D,L-lactide-co-glycolide) on different pH subphase. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 316, p. 912–920, 2007.

ZALIPSKY, S. **Polyethylene glycol-lipid conjugates**. In: LASIC D.D; MARTIN, F. J. (ed), *Stealth Liposomes*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995.

ZANIQUELLI, M. E. D.; BUENO, W. A.; HOMEM, A. J. M. Construção de uma cuba de Langmuir para a preparação e estudo de monocamadas líquidas. **Química Nova**, vol. 16, n. 3, p. 229-233, 1993.

## **ANEXO A – ARTIGO**



Contents lists available at ScienceDirect

# Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfa](http://www.elsevier.com/locate/colsurfa)

## Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers

D.M.N. Luna<sup>a</sup>, E.P.S. Falcão<sup>a</sup>, S.J. Melo<sup>b</sup>, C.A.S. Andrade<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil<sup>b</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 August 2010

Received in revised form 6 October 2010

Accepted 6 October 2010

Available online 20 October 2010

#### Keywords:

Langmuir monolayers  
 Pyrimidine  
 Interface characterization  
 PEGylated lipids

### ABSTRACT

4-amino-2-phenyl, 6(*p*-fluor-phenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (APCP) is a new derivative of pyrimidine with low solubility in water and anti-inflammatory properties. We compared the interfacial behaviors of spread films of poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid (DSPE-PEG<sub>2000</sub>), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), and APCP and a mixture of these molecules. The surface pressure–area (*Π*–*A*) isotherm showed that APCP and DSPE-PEG<sub>2000</sub> molecules were stable at the air/water interface and could be evenly inserted into a DPPC floating monolayer. The introduction of APCP into the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary monolayer generally causes an overall increase in surface potential. Analyses of distance variation between the grafted sites are associated with a change of mushroom to brush conformation and this behavior is observed for the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) and DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP monolayers. Langmuir–Blodgett (LB) films of molecules of biological interest were transferred onto mica in order to investigate their interaction. AFM images do not show any regular shape or size and are randomly distributed.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Compounds containing pyrimidine heterocycles have been extensively studied due to their pharmacological and biological properties, for example, their antifungal [1], antiviral [2], antimicrobial [3], antitumor and anti-inflammatory [4] activities. The pyrimidine ring is present in the chemical structure of several pharmaceuticals, such as drugs for hypertension [5] and anxiolytics [6], as well as in other antimicrobial and antitumor agents [7]. The molecule 4-amino-2-phenyl, 6(*p*-fluor-phenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (APCP) belongs to a new derivative of pyrimidine with anti-inflammatory properties [4,8].

In recent years, researchers have been paying increasing attention to short-chain poly(ethylene oxide) (PEO) with molecular weights (MW) in the range of 1–5 kDa, also known as poly(ethylene glycol)s (PEG) [9–11]. PEG has many biomedical applications, such as improving of biocompatibility, and this is basically because PEG grafts have been shown to promote the reduction in the adsorption of proteins, which is generally recognized as a primary response of the reticuloendothelial system to foreign bodies [12].

The resistance of PEGs to protein adsorption has made them attractive for applications such as surface coatings to improve the compatibility of implanted medical devices and to prolong the circulation time of liposomes for drug delivery [12]. One encouraging approach to grafting PEG chains is through the introduction of PEG-lipid conjugates into membrane-mimetic lipid structures (monolayers, bilayers, and liposomes) [12–14]. The amounts of PEG-grafted phospholipids and the MW of the PEG unit can be modulated to optimize the circulation time and as little as 2 mol% of PEGylated phospholipid (2 kDa) is enough to prolong the circulation time of liposomes [15].

In addition, diverse studies have been performed aimed at shedding light on the properties of PEG-grafted lipids [16,17]. Lipopolymeric membranes depend on the material conformation and the MW of the polymeric chains seems to be the main factor [18]. Below the MW of 2 kDa lipopolymers take on a mushroom conformation. Conversely, up to MW of 2 kDa, the polymeric chains on the surface undergo a conformational change, which leads to the compressed and densely packed brush conformation [18].

In this study, we explore the effect of the PEG-lipid molecules on the (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)-APCP system at the air/water interface, by means of the Langmuir and Langmuir–Blodgett (LB) technique, as a model system for stealth drug delivery. In addition, the LB film technique was exploited to analyze the morphology and to investigate subtle details of monolayer microstructure.

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 3523 3351; fax: +55 81 3523 3351.  
 E-mail address: [cstrandrade@gmail.com](mailto:cstrandrade@gmail.com) (C.A.S. Andrade).

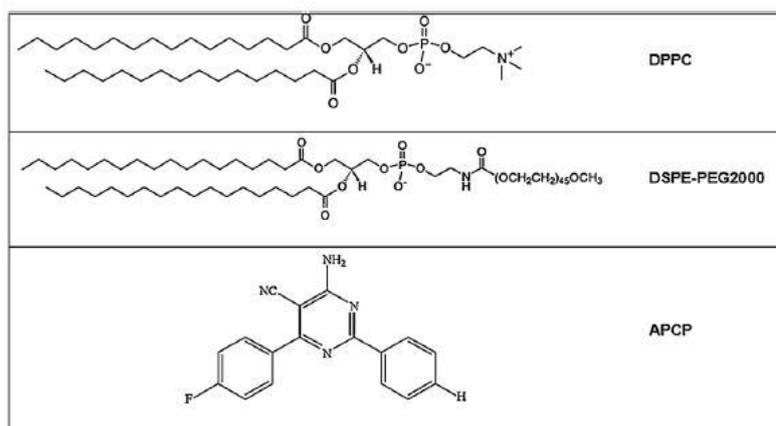


Fig. 1. The chemical structures of DPPC, DSPE-PEG<sub>2000</sub> and APCP.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Pyrimidine derivative was synthesized by one of us (EPSF), starting from aromatic aldehyde reacting with malonitrile and, subsequently, adding amyndine to obtain 4-amino-2-phenyl, 6(*p*-fluor-phenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine [4,8]. Poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid with a PEG average MW of 2 kDa (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[poly(ethylene glycol)<sub>2000</sub>], i.e., DSPE-PEG<sub>2000</sub>) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) were obtained from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL) and Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA), respectively, and used as received.

Stock solutions of DPPC and DSPE-PEG<sub>2000</sub> were prepared at a concentration of 0.1–0.6 mg/mL by dissolution in chloroform/methanol (9:1, v/v). The concentration of the pure DPPC in solution used for spreading was  $1.7 \times 10^{15}$  molecules/ $\mu\text{L}$ . Stock solutions were mixed in various molar ratios (*x*) to obtain spreading solutions containing 1, 3, 6, and 9 mol% of DSPE-PEG<sub>2000</sub>. Next, mixed solutions of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP with different molar ratios (*x* = {0.5, 1.5, 3.0 and 4.3 mol%}) of ACP were prepared using suitable aliquots of pure solutions of the pyrimidine and phospholipids. Buffer solutions of citrate (sodium citrate)-phosphate (pH 2.2, 4.8, 6.8 and 7.4) were prepared with ultrapure water (Millipore-Synergy®). Ultrapure water was obtained with resistivity 18.2 M $\Omega$ ·cm and a typical surface tension of 72.2 mN/m at 20 °C. The chemical structures of ACP, DSPE-PEG<sub>2000</sub> and DPPC are presented in Fig. 1.

### 2.2. Surface pressure and surface potential measurements

The measurements of surface pressure ( $\Pi$ ) versus molecular area (*A*) isotherms of pure and mixed phospholipids/APCP monolayers were performed at a symmetric compression rate of 10.0 mm/min in an auto-recording Langmuir-type film minitrough (KSV Instruments, Finland), with a total area of 273 cm<sup>2</sup>. The system was equipped with a Wilhelmy plate and the surface pressure was measured to an accuracy of  $\pm 0.1$  mN/m. Pure and mixture solutions were spread dropwise at the interface by gastight syringe (Hamilton Company, Reno, NV) after allowing 10 min for evaporation.

By means of the vibrating plate method ( $\nu = 300$  Hz), the surface potential ( $\Delta V$ ) of pure and mixed phospholipid/APCP monolayers was measured with a KSV Kelvin apparatus with the probe elec-

trode located at approximately 2–3 mm above the water surface, and the  $\Delta V$  was determined to an accuracy of  $\pm 10$  mV. Data were collected using the KSV software, while the  $\Pi$  and  $\Delta V$  isotherms were presented by taking the average value of at least three independent measurements. All deviations of the surface area values were smaller than  $\pm 1 \text{ \AA}^2$ .

### 2.3. Atomic force microscopy measurements

Atomic force microscopy (AFM) measurements were performed with a commercial PicoSPM II microscope (Molecular Imaging, USA). Cantilevers with a silicon tip (NanoWorld Innovative Technologies, NCHR,  $F_0 = 320$  KHz, nominal spring constant =  $42 \text{ N m}^{-1}$ ) were used for the non-contact mode AFM in air at room temperature (approximately 25 °C). To eliminate artifacts, images were obtained from at least three macroscopically separated areas on each sample. The LB technique was employed to transfer phospholipids monolayers from the water surface onto a solid substrate. Freshly cleaved mica was used as the deposition substrate. All monolayers were deposited in the upstroke mode and the deposition speed was 1 mm/min. The transfer ratios were close to  $1.0 \pm 0.01$  for all depositions.

## 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 pressure ( $\Pi_{\text{max}}$ ) value of the lateral pressure supported by the Langmuir films was attained. Note that  $\Pi_{\text{max}}$  does not necessarily correspond to a collapse pressure of the Langmuir film, since in several instances this maximum value is reached but no indication 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 the folding of double layers atop the floating monolayer, is a hallmark of an authentically collapsed Langmuir film [19,20].

Fig. 2a shows the  $\Pi$ –*A* isotherm of pure ACP on citrate–phosphate buffer solution subphase ranging from 2.2 to 7.4. ACP molecules exhibited expanded isotherms for the entire pH range studied. From the isotherms analyzed we observed that for pH 7.4 a gas to liquid-expanded (G/LE) transition at  $\sim 14 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  ( $\Pi = 6 \text{ mN/m}$ ) occurred, and, subsequently, a liquid-expanded to liquid-condensed (LE/LC)

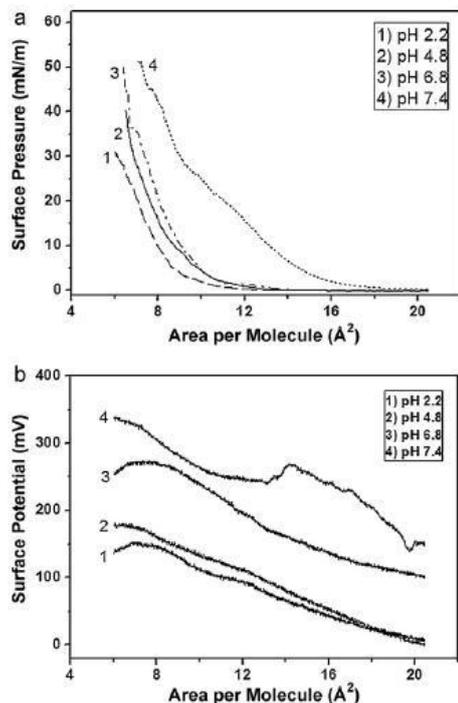


Fig. 2. (a)  $\Pi$ - $A$  and (b)  $\Delta V$ - $A$  isotherms of pure APCP monolayers at different pHs.

transition at  $\sim 10 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  ( $\Pi = 26 \text{ mN/m}$ ). In addition, at this pH the  $\Pi_{\text{max}}$  was reached around  $52 \text{ mN/m}$  and the molecular area of  $\sim 8 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ , corresponding to the maximum of compressibility.

The surface potential–area per molecule ( $\Delta V$ - $A$ ) relationship for APCP is shown in Fig. 2b, as well as the pH effect on the interfacial behavior of the APCP already identified in the  $\Pi$ - $A$  compression curves. Data obtained from APCP at acidic pH is extremely relevant since acidification is a common feature associated with inflammatory processes and APCP is a pyrimidine derivative with anti-inflammatory properties [4,8]. In addition, extracellular acidosis is a condition commonly associated to a variety of physiological and pathological situations. In general terms, the decrease in molecular areas was accompanied by a noticeable trend to higher surface potential values. For the entire pH range the  $\Delta V$ - $A$  isotherms showed positive values varying from 125 mV to 295 mV under maximum compression. Clearly, the apparent increase in the pH induces an increase in the surface potential. In addition,  $\Delta V$  for every studied pH increases in a homogeneous and progressive way, with no apparent cluster formation as the area per molecule is decreased. On the basis of these findings, an estimate of how  $\Delta V$  is affected by pH variations was determined at the surface areas corresponding to the  $\Pi = 30 \text{ mN/m}$ , a value of the surface pressure at which the monolayers of APCP molecules were found to be stable.

On analysis of the case of APCP floating monolayers, the visualized changes in  $\Delta V$ - $A$  isotherms may be associated with variations in the contribution of the Gouy–Chapman double layer that exists (at least partially) in ionized monolayers [21,22]. Generally, pyrimidine derivative molecules have a  $\text{pK}_a$  value of 5.0 [23]. Thus APCP monolayers are expected to be positively charged at the pH values

Table 1

pH of the subphase, mean molecular area, surface potential, dipole moment and potential difference across the double-layer of APCP floating monolayers.

pH <sub>bulk</sub>	Area ( $\text{\AA}^2/\text{molecule}$ )	$\Delta V$ (mV)	$\mu_{\perp}$ (mD)	$\psi_0$ (mV)
2.2	6.15	177	29	462.21
4.8	7.27	150	29	392.88
6.8	7.38	271	53	392.88
7.4	9.02	282	67	300.44

investigated and possess a degree of ionization,  $\alpha$ , as follows

$$\text{pK} = \text{pH}_i - \log \left( \frac{\alpha}{1-\alpha} \right) \quad (1)$$

where  $\text{pH}_i$  is the pH at the air/water interface and can be determined from

$$\text{pH}_i = \frac{\text{pH}_b + e\psi_0}{2.3kT} \quad (2)$$

where  $\text{pH}_b$  is the bulk pH (pH of the subphase),  $e$  is the elementary charge,  $k$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the temperature, and  $\psi_0$  is the potential difference across the double-layer. According to the Gouy–Chapman theory [24],  $\psi_0$  is given by

$$\psi_0 = \frac{(2kT/e) \sinh^{-1} e\alpha}{A(5.88 \cdot 10^{-7} c\epsilon T)^{1/2}} \quad (3)$$

where  $A$  is the area per molecule,  $c$  is the ionic strength (in mol/L) in the subphase, and  $\epsilon$  is the dielectric constant of the medium [25]. Considering that the floating monolayer is in electrochemical equilibrium with the aqueous solution, the surface potential of the ionized monolayer of spread molecules may be expressed by

$$\Delta V = \left( \frac{12\pi\mu_{\perp}}{A_0} \right) + \psi_0 \quad (4)$$

Langmuir monolayers spread on buffers are expected to be fully ionized. From Table 1 we observed that APCP molecules are positively ionized in the entire pH range studied with a maximum  $\psi_0$  value at pH 2.2. These positive values are related to the protonation of amine group of APCP. It is reasonable to propose that the protonation of nitrogens has two important consequences for the interaction of APCP with DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>). The protonation increases its hydrophilicity and affinity to the regions with higher  $\epsilon$  values, as compared with non-protonated forms. However, the presence of the positive charge is essential for obtaining the electrostatic interactions between APCP molecules and polar heads of the phospholipids. The effects of protonated APCP upon phospholipid monolayers differ considerably from those of the non-protonated ones.

$\Delta V$  values were expressed in terms of surface dipole moments,  $\mu_{\perp} = A\Delta V/12\pi$ , where  $A$  is the molecular area in  $\text{\AA}^2/\text{molecule}$ ,  $\Delta V$  in millivolts and  $\mu_{\perp}$  was obtained in millidebye units (mD) [24]. We observed that an increase in pH from 2.2 to 7.4 produced a more than twofold increase in  $\mu_{\perp}$  (Table 1). This increase is associated with the APCP deprotonation at high pHs, where the molecule is found as partially ionized monolayers.

Fig. 3 shows the  $\Pi$ - $A$  isotherms of pure DPPC, DSPE-PEG<sub>2000</sub> and binary DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) monolayers on an aqueous solution. Our results for pure molecules are in agreement with those in the literature [9,26–28]. As expected, the DPPC floating monolayer shows a plateau associated with a transition from expanded (E) to condensed phase (C), i.e., acyl chain condensation, at  $\Pi = 14 \text{ mN/m}$  corresponding to a mean molecular area (mma) of  $52.3 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ .

The  $\Pi$ - $A$  isotherm for pure DSPE-PEG<sub>2000</sub> isotherm (inset of Fig. 3) gradually increases with a decreasing molecular area, reaches a pseudoplateau below  $900 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and presents a

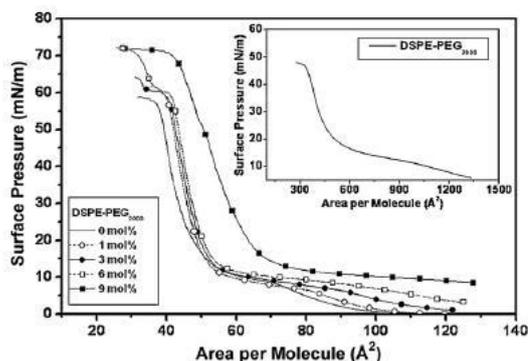


Fig. 3.  $\Pi$ - $A$  isotherms of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary system at different relative concentrations of PEG-grafted phospholipids ( $x = \{1, 3, 6, \text{ and } 9 \text{ mol}\%$ ). Inset:  $\Pi$ - $A$  isotherms of pure DSPE-PEG<sub>2000</sub> monolayers.

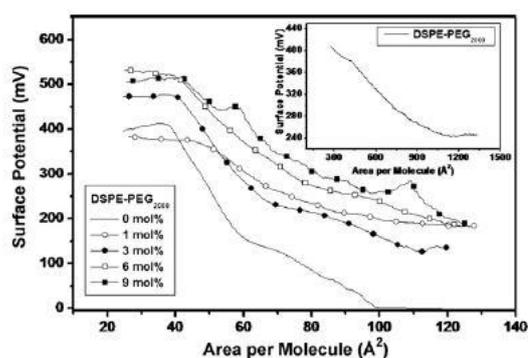


Fig. 4.  $\Delta V$ - $A$  isotherms of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary system at different relative concentrations of PEG-grafted phospholipids ( $x = \{1, 3, 6, \text{ and } 9 \text{ mol}\%$ ). Inset:  $\Delta V$ - $A$  isotherms of pure DSPE-PEG<sub>2000</sub> monolayers.

corresponding  $m$  of  $600 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  that is relatively large, following which a condensation of the acyl chains takes place. The plateau in  $\Pi$ - $A$  isotherms of PEO- and PEG-grafted monolayers at the air/water interface is usually attributed to conformational changes in polymeric moiety [28]. In particular, for PEOs and PEGs that are in a good solvent condition at the air/water interface [29],

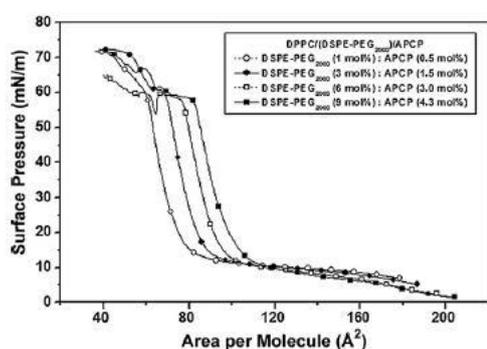


Fig. 5.  $\Pi$ - $A$  isotherms of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP ternary monolayers at different relative APCP concentrations ( $x = \{0.5, 1.5, 3.0 \text{ and } 4.3 \text{ mol}\%$ ).

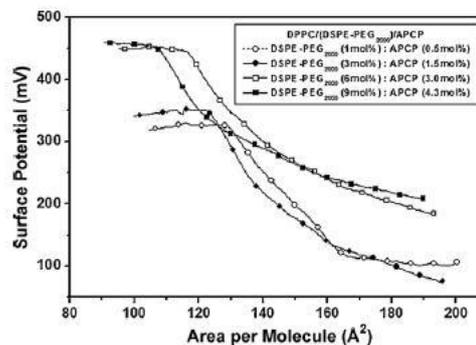


Fig. 6.  $\Delta V$ - $A$  isotherms of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP ternary monolayers at different relative APCP concentrations ( $x = \{0.5, 1.5, 3.0 \text{ and } 4.3 \text{ mol}\%$ ).

the plateau can be interpreted as a transition from pancake to brush conformation [30].

Analyzing the  $\Pi$ - $A$  isotherms of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary system at different molar concentrations, we observed that the isotherms exhibit three major regions: (i) an expanded region below  $\sim 6 \text{ mN/m}$ ; (ii) a pseudoplateau with a midpoint at  $\sim 8 \text{ mN/m}$ ; and, (iii) a low-compressibility region above  $\sim 15 \text{ mN/m}$ . Next, a more expanded profile is observed for the binary system studied as compared with that for the pure DPPC monolayer.  $\Pi_{\text{max}}$  increases proportionally with the DSPE-PEG<sub>2000</sub> molar concentration; this behavior may occur due to the steric repulsion occurring between

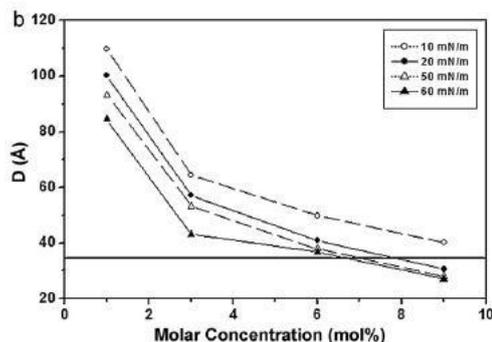
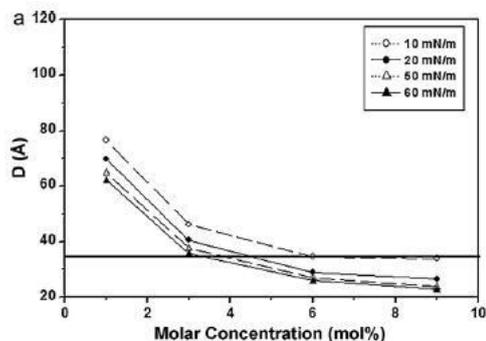


Fig. 7. Distance variation between grafted sites ( $D$ ) for (a) DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) and (b) DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP with the increase of (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) molar concentration at different surface pressures.

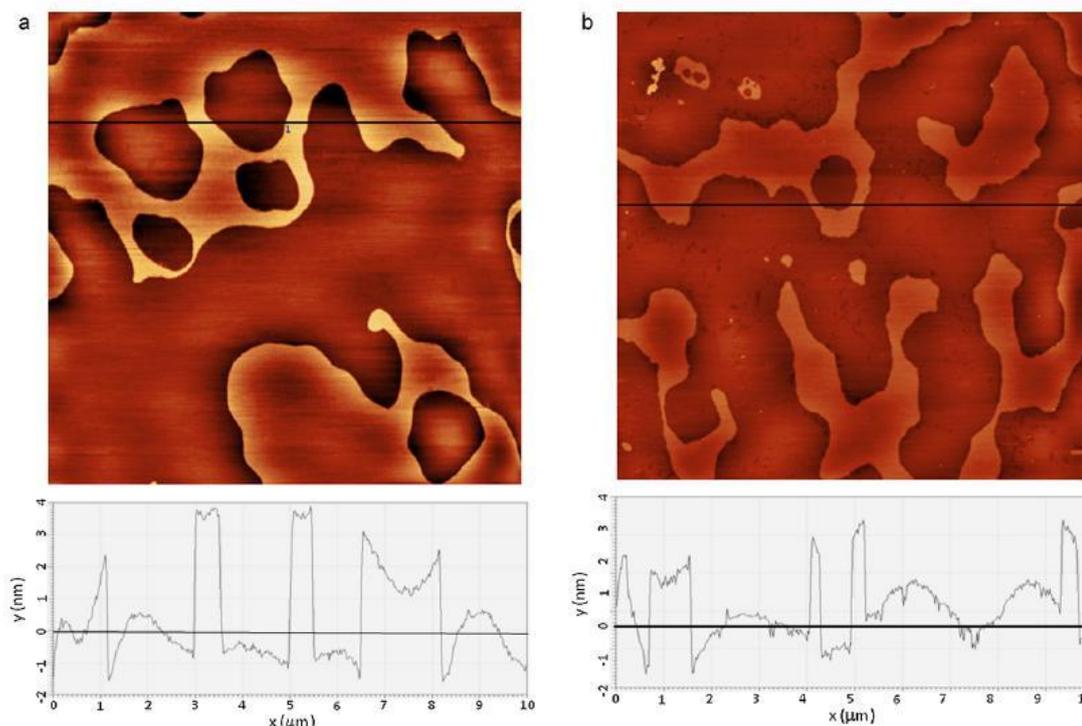


Fig. 8. An AFM topographic image ( $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ) of the pure DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) (a) and mixed DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP (b) monolayer transferred on mica. A section analysis along the black line in images (a) and (b) shows that the step height between higher and lower levels is approximately 4 nm.

the PEG chains. Similarly, the collapse pressure ( $\Pi_c$ ) gradually increases with the DSPE-PEG<sub>2000</sub> molar concentration, indicating the miscibility between the two components.

Similarly, in Fig. 4 we observed an increase in the  $\Delta V$  with the increase in PEGylated phospholipid molar concentration. The curve for pure DPPC starts off at zero surface potential for large areas per molecule and, subsequently, increases abruptly at a given critical area. This behavior has been attributed, in the case of monolayers of phospholipids and other aliphatic compounds, to the decrease in the effective  $\epsilon$  at the monolayer/water interface, which is believed to occur when a critical packing density is achieved [21]. The introduction of DSPE-PEG<sub>2000</sub> into the DPPC monolayer causes an overall increase in surface potential. The  $\Delta V_{\text{max}}$  was reached at  $\sim 45\ \text{\AA}^2/\text{molecule}$  for all DSPE-PEG<sub>2000</sub> molar concentrations. In addition, we observed the existence of plateaus corresponding to G/LE phase transition at  $\sim 110\ \text{\AA}^2/\text{molecule}$  and LE/LC phase transition at  $\sim 70\ \text{\AA}^2/\text{molecule}$ . For the pure DSPE-PEG<sub>2000</sub> monolayer we observed an expanded behavior with a  $\Delta V_{\text{max}}$  reaching  $\sim 410\ \text{mV}$  and an elevated  $\Delta V$  at high molecular areas (inset of Fig. 4).

Fig. 5 shows the  $\Pi$ - $A$  isotherms for the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP ternary system. When the APCP content is increased, the monolayer becomes increasingly more expanded and with higher  $mna$ . The  $\Pi$ - $A$  isotherms for DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/APCP ternary monolayers have the LE/LC plateau, similar to the one for DPPC. The introduction of APCP onto DPPC molecules prevents them from close packing and this is reflected in the profile of expanded monolayers of the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary system (Fig. 5), as compared with the pure components.

From Fig. 6 we observed that the presence of APCP in the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary monolayers affects the monolayer

surface potential, which depends basically on the normal component (perpendicular to the water surface) of dipole moments of the film-forming molecules, and also on the contribution from the electric double-layer formed when the monolayer is at least partially ionized [31]. The packing density and the orientation of the molecules on the air/water interface therefore appear to be essential parameters for understanding the  $\Delta V$  results. The introduction of APCP into the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary monolayer generally causes an overall increase in  $\Delta V$ . In Fig. 6, we observed two apparent regimes for surface potential values at 0.5–1.5% and 3.0–4.3% of APCP and  $\Delta V_{\text{max}}$  at around 340 mV and 450 mV for each regime, respectively.

On the other hand, we can state that the protonated APCP molecules have broader effects, because they seem to be pulled closer to the polar region of the phospholipid monolayers, probably with their heterocycles protruding from the water interface, owing to their interaction with the lipid headgroup charges, which lie practically parallel to the plane of the monolayer [32,33]. The negative charge of the phospholipid headgroup attracts the protonated APCP and pulls it into the polar region and the positive one repels the protonated APCP. In addition, molecular packing is thereby affected which, in turn, causes the normal component of the  $\mu_{\perp}$  of film-forming molecules to decrease.

In an attempt to elucidate the conformation acquired by the PEG molecules on the air/water interface, we correlated the experimental data with the theoretical data. de Gennes [34] showed that the determination of the regimes shown by PEG molecules is dependent on the distance between the grafted sites ( $D$ ) and the size of the coil shape of the polymer in solution. In this study we calculated  $D$  by  $D = (A/M)^{1/2}$ , where  $M$  is the mole fraction of PEG-lipid

and  $A$  is the area per lipid molecule in the floating monolayer [16]. From the analyses of distance variation between the grafted sites, associated with the increase in molar concentration at surface pressures of 10, 20, 50 and 60 mN/m, a change of mushroom (at 3.0%) to brush conformation (up to 3.0%) is observed for the DSPE-PEG<sub>2000</sub> in the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary system (Fig. 7a). The introduction of ACP molecules results in higher values for the distance variation, i.e., expansion of the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary monolayers. DSPE-PEG<sub>2000</sub> changes from brush to mushroom conformation is hampered, due to the presence of ACP (Fig. 7b), occurring only at 9 mol% of DSPE-PEG<sub>2000</sub>, except for  $\Pi = 10$  mN/m. This increase can be associated with the electrostatic interactions, which retain the ACP molecules in the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) binary monolayers on lateral compression.

We obtained more detailed information on the molecular reorganization in the monolayer on compression using AFM technique. The film of the DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) and DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/ACPC was deposited at  $\Pi = 30$  mN/m, and the AFM image obtained is made of elevated features (bright phase), embedded in a continuous matrix (dark phase) (Fig. 8). From the AFM topographic image the step height measured between the two phases is about 4 nm and the elevated structures show an irregular shape or size and are randomly distributed throughout the substrate. AFM images of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) allow us to visualize a fine structure composed of numerous defects in the form of holes (Fig. 8a), resulting from the reorganization of the layer during the drying process [35,36]. Holes with a depth of ~4 nm are present particularly on the largest domains and are certainly due to stress during elaboration of the film [37]. In addition, the height difference measured from the cross sections in the topographic image of DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)/ACPC in Fig. 8b shows that the holes have a fairly uniform depth of 2–3 nm. The ordering in PEG-grafted phospholipid monolayers was expected to occur on a somewhat smaller scale [38].

To relate the monolayer structures different interactions should be considered, namely electrostatic and van der Waals forces. Because of the mica surface negative charge [39] and the positive charge of the ACP and choline headgroups (phosphocholine is a zwitterionic headgroup with the choline positive charge facing toward the mica surface), electrostatic interactions arise [40]. In addition, it can be considered that, although several forces are involved in the cohesion of phospholipid monolayers with other molecules, interchain van der Waals interactions play a key role in the mechanical properties of phospholipid monolayers [40].

#### 4. Conclusions

The inclusion of DSPE-PEG<sub>2000</sub> to DPPC monolayers results in the formation of stable, densely packed and homogenous films. The incorporation of ACP into DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) monolayers causes the monolayers to be expanded at high ACP concentrations but they are more condensed at low ones, probably because ACP and DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) molecules assume a different molecular arrangement at low concentrations. DSPE-PEG<sub>2000</sub> changes from brush to mushroom conformation are hampered, due to the presence of ACP. The interaction of protonated ACP and DPPC/(DSPE-PEG<sub>2000</sub>) is stabilized by electrostatic interactions. The negative charge of the lipid headgroup interacts with the ACP and pulls it into the polar region. The present study contributes to a better understanding of the relative stability of more complex mixtures.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the support received from the National Council for Scientific and Technological Development

(Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq) and Pernambuco State Foundation for the Support of Science and Technology (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE). D.M.N. Luna would like to thank FACEPE for an MSc scholarship.

#### References

- [1] G.W. Anderson, I.F. Halverstadt, W.H. Miller, R.O. Roblin, Studies in chemotherapy. 10. Antithyroid compounds – synthesis of 5-substituted and 6-substituted 2-thiouracils from beta-oxoesters and thiourea, *J. Am. Chem. Soc.* 67 (1945) 2197–2200.
- [2] M.N. Nasr, M.M. Gineinah, Pyrido[2,3-d]pyrimidines and pyrimido[5' 4': 5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidines as new antiviral agents: synthesis and biological activity, *Archiv. Der Pharmazie* 335 (2002) 289–295.
- [3] S.R. Kanth, G.V. Reddy, K.H. Kishore, P.S. Rao, B. Narsaiah, U.S.N. Murthy, Convenient synthesis of novel 4-substituted-amino-5-trifluoromethyl-2,7-disubstituted pyrido[2,3-d]pyrimidines and their antibacterial activity, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1011–1016.
- [4] E.P.D. Falcao, S.J. de Melo, R.M. Srivastava, M.T.J.D. Catanho, S.C. Do Nascimento, Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-(3-and 4-(N-phthalimidophenyl)) pyrimidines, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 276–282.
- [5] K.K. Ho, J.R. Beasley, L. Belanger, D. Black, J.H. Chan, D. Dunn, B. Hu, A. Klon, S.G. Kultgen, M. Ohlmeyer, S.M. Parlato, P.C. Ray, Q. Pham, Y.J. Rong, A.L. Roughton, T.L. Walker, J. Wright, K. Xu, Y. Xu, L.M. Zhang, M. Webb, Triazine and pyrimidine based rock inhibitors with efficacy in spontaneous hypertensive rat model, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6027–6031.
- [6] G. Loew, L. Toll, J. Lawson, E. Uyeno, H. Kaegi, Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines – receptor-binding and anxiolytic behavioral-studies, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20 (1984) 343–348.
- [7] P.G. Baraldi, M.G. Pavani, M.D. Nunez, P. Brigidi, B. Vitali, R. Gambari, R. Romagnoli, Antimicrobial and antitumor activity of N-heteroimmine-1,2,3-dithiazoles and their transformation in triazolo-, imidazo-, and pyrazolopyrimidines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2002) 449–456.
- [8] S.J. de Melo, L.C. dos Santos, E.P.D. Falcao, R.M. Srivastava, C. Luu-Duc, Synthesis of new 4-amino-2,6-diarylpurimidine-5-carbonitriles, *J. Chem. Res.* (2002) 216–217.
- [9] V. Tsukanova, C. Saless, On the nature of conformational transition in poly(ethylene glycol) chains grafted onto phospholipid monolayers, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 10754–10764.
- [10] A.M. Diez-Pascual, A. Compositto, A. Crespo-Colin, R.G. Rubio, R. Miller, Adsorption of water-soluble polymers with surfactant character. Adsorption kinetics and equilibrium properties, *J. Colloid Interface Sci.* 307 (2007) 398–404.
- [11] A.M. Diez-Pascual, F. Monroy, F. Ortega, R.G. Rubio, R. Miller, B.A. Noskov, Adsorption of water-soluble polymers with surfactant character. Dilational viscoelasticity, *Langmuir* 23 (2007) 3202–3208.
- [12] P. Vermette, L. Meagher, Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms, *Colloid Surface B: Biointerface* 28 (2003) 153–198.
- [13] H. Bianco-Peled, Y. Dori, J. Schneider, L.P. Sung, S. Satija, M. Tirrell, Structural study of Langmuir monolayers containing lipidated poly(ethylene glycol) and peptides, *Langmuir* 17 (2001) 6931–6937.
- [14] S. Rex, M.J. Zuckermann, M. Lafleur, J.R. Silvius, Experimental and Monte Carlo simulation studies of the thermodynamics of polyethyleneglycol chains grafted to lipid bilayers, *Biophys. J.* 75 (1998) 2900–2914.
- [15] V.P. Torchilin, V.G. Omelyanenko, M.I. Papisov, A.A. Bogdanov, V.S. Trubetskiy, J.N. Herron, C.A. Gentry, Poly(ethylene glycol) on the liposome surface – on the mechanism of polymer-coated liposome longevity, *Biochim. Biophys. Acta* 1195 (1994) 11–20.
- [16] B. Wyszynski, P. Somboon, T. Nakamoto, Pegylated lipids as coatings for QCM odor-sensors, *Sens. Actuators B* 121 (2007) 538–544.
- [17] A. Pantos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, C.M. Paleos, Interactions of complementary PEGylated liposomes and characterization of the resulting aggregates, *Langmuir* 20 (2004) 6165–6172.
- [18] D. Marsh, R. Bartucci, L. Sportelli, Lipid membranes with grafted polymers: physicochemical aspects, *Biochim. Biophys. Acta* 1615 (2003) 33–59.
- [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, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 59 (2008) 771–791.
- [21] G.P. Borissevitch, M. Tabak, O.N. Oliveira, Interaction of dipyrindamole with lipids in mixed Langmuir monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1278 (1996) 12–18.
- [22] P. Dynarowicz-Latka, A. Cavalli, D.A. Silva Filho, P. Milart, M.C. dos Santos, O.N. Oliveira, Quantitative treatment of surface potentials in Langmuir films from aromatic amphiphiles, *Chem. Phys. Lett.* 337 (2001) 11–17.
- [23] G.P. Borissevitch, M. Tabak, I.E. Borissevitch, O.N. Oliveira, Interaction of dipyrindamole derivatives with lipids in mixed floating Langmuir monolayers, *Colloid Surface B: Biointerface* 7 (1996) 69–81.
- [24] G.L. Gaines, Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces, Interscience Publishers, New York, 1966.

- [25] C.A.S. Andrade, A. Baszkin, N.S. Santos-Magalhaes, L.C.B.B. Coelho, C.P. de Melo, Dielectric properties of Bauhinia monandra and concanavalin A lectin monolayers. Part I, *J. Colloid Interface Sci.* 289 (2005) 371–378.
- [26] J.M. Nascimento, C.P. de Melo, N.S. Santos-Magalhaes, V. Rosilio, M.A.M. Maciel, C.A.S. Andrade, Thermodynamic investigation of mixed monolayers of trans-dehydrocrotonin and phospholipids, *Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects* 358 (2010) 42–49.
- [27] 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.
- [28] M. Jebrail, R. Schmidt, C.E. DeWolf, V. Tsoukanova, Effect of aliphatic chain length on stability of poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayers at the air/water interface, *Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects* 321 (2008) 168–174.
- [29] A.R. Esker, L.H. Zhang, B.B. Sauer, W. Lee, H. Yu, Dilational viscoelastic behaviors of homopolymer monolayers: surface light scattering analysis, *Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects* 171 (2000) 131–148.
- [30] H.X. Zhao, P.M. Dubielecka, T. Soderlund, P.K.J. Kinnunen, Interactions of adriamycin, cytochrome c, and serum albumin with lipid monolayers containing poly(ethylene glycol)-ceramide, *Biophys. J.* 83 (2002) 954–967.
- [31] O.N. Oliveira, D.M. Taylor, T.J. Lewis, S. Salvagno, C.J.M. Stirling, Estimation of group dipole-moments from surface-potential measurements on Langmuir monolayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 85 (1989) 1009–1018.
- [32] P.J. Bowen, T.J. Lewis, Electrical interactions in phospholipid layers, *Thin Solid Films* 99 (1983) 157–163.
- [33] M.M. Velázquez, F. Ortega, F. Monroy, R.G. Rubio, S. Pegiadou, L. Pérez, M.R. Infante, Langmuir monolayers of the zwitterionic surfactant hexadecyl 1-N-L-tryptophan glycerol ether, *J. Colloid Interface Sci.* 283 (2005) 144–152.
- [34] P.G. de Gennes, Polymers at an interface – a simplified view, *Adv. Colloid Interface Sci.* 27 (1987) 189–209.
- [35] D.K. Schwartz, J. Garnaes, R. Viswanathan, J.A.N. Zasadzinski, Surface order and stability of Langmuir–Blodgett films, *Science* 257 (1992) 508–511.
- [36] J.M. Solletti, M. Botreau, F. Sommer, W.L. Brunat, S. Kasas, T.M. Duc, R. Celio, Elaboration and characterization of phospholipid Langmuir–Blodgett films, *Langmuir* 12 (1996) 5379–5386.
- [37] J. Frommer, Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy in organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (1992) 1298–1328.
- [38] V. Tsukanova, C. Salesse, High-pressure transition of a poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayer at the air/water interface, *Macromolecules* 36 (2003) 7227–7235.
- [39] S. Nishimura, S. Biggs, P.J. Scales, T.W. Healy, K. Tsunematsu, T. Tateyama, Molecular-scale structure of the cation modified muscovite mica basal-plane, *Langmuir* 10 (1994) 4554–4559.
- [40] G. Oncins, L. Picas, J. Hernández-Borrell, S. Garcia-Manyes, F. Sanz, Thermal response of Langmuir–Blodgett films of dipalmitoylphosphatidylcholine studied by atomic force microscopy and force spectroscopy, *Biophys. J.* 93 (2007) 2713–2725.

**ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO  
(INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY)**

## **Nanotecnologia Aplicada à Odontologia** Nanotec. Aplic. Odontol.

Débora Máximo das Neves Luna<sup>1</sup>

César Augusto Souza de Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cirurgiã-Dentista, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. +55(81) 3523-3351 deboramyluna@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutor em Ciências dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. +55(81) 3523-3351 csrandrade@gmail.com

### **Resumo**

Nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que visa, principalmente, à obtenção de estruturas em escala nanométrica para as mais diversas aplicações. Devido ao reduzido tamanho, surgem modificação nas propriedades físico-químicas, e assim, novas funções são evidenciadas. A bionanotecnologia por sua vez, é a aplicação da nanotecnologia nas áreas das ciências da vida e biológicas. O desenvolvimento deste campo científico tem avançado rapidamente nos últimos anos e, mais especificamente, na odontologia podem-se criar placas, parafusos e implantes com maior afinidade pelo tecido original, acelerar o crescimento ósseo, incorporar fármacos, utilizar células-tronco e hormônio do crescimento, além de aumentar a longevidade e biocompatibilidade de dispositivos cirúrgicos e próteses. A terapêutica medicamentosa, através da utilização de nanossistemas para o carreamento de fármacos, promove o aumento da biodisponibilidade, liberação controlada e ainda existe a possibilidade de direcionamento para um tecido-alvo. Tais sistemas de liberação controlada podem ser utilizados no tratamento de periodontopatias, na endodontia e no diagnóstico de patologias. Portanto, a presente revisão visa promover uma discussão a respeito da nanotecnologia e suas potenciais aplicações na área da pesquisa odontológica, a fim de estimular a pesquisa nesta área.

**Descritores: Nanotecnologia; Nanopartículas; Nanoestruturas.**

**ANEXO C – APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E RESUMOS  
PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS**

LUNA, D. M. N.; ANDRADE, C. A. S. Nanotecnologia aplicada à odontologia. In: 15º Congresso Norte-Nordeste de Odontologia, 2010, Olinda/PE. ABO Nacional- Contando a História da Odontologia, 2010, vol. 18, p. 15-142.

LUNA, D. M. N.; FALCÃO, E. P. S.; MELO, S. J.; ANDRADE, C. A. S. Caracterização físico-química de monocamadas interfaciais mistas compostas por composto 4-amino-2-fenil,6-(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila pirimidina (APCP) e fosfolipídios. 62 reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC). Natal/RN, 2010.

LUNA, D. M. N.; FALCÃO, E. P. S.; ANDRADE, C. A. S. Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers. X Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Salvador/BA, 2010.

## **ANEXO D– NORMAS DA REVISTA**



# COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICO-CHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS

An International Journal Devoted to the Principles and Applications of Colloid and Interface Science

**AUTHOR INFORMATION PACK**

## GUIDE FOR AUTHORS

### BEFORE YOU BEGIN

#### **Ethics in Publishing**

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### **Policy and ethics**

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

#### **Contributors**

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

#### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

#### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

To submit your article please go to: <http://ees.elsevier.com/colsua> .

#### **Referees**

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of five potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors.

## **PREPARATION**

### **LaTeX**

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### Results

Results should be clear and concise.

### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Inorganic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. Further, high-resolution graphics files must be provided separately whether or not the graphics are embedded. See further under Electronic artwork.

### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### References

#### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice

versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

#### *Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ...."

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2000) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp. 281–304.

#### **Journal Abbreviations Source**

Journal names should be abbreviated according to CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/>

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 10 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### *Proofs*

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### *Offprints*

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

## AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.