

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**FÍSICO-QUÍMICA INTERFACIAL
DE FILMES MISTOS DE FOSFOLIPÍDEOS E
ÁCIDO ÚSNICO**

NERIVAN BARBOSA DE LIMA

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

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

RECIFE

26/Fevereiro/2004

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Nerivan Barbosa de Lima**, realizada em 26 de fevereiro de 2004 como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14 15 minutos do dia 26 de fevereiro de 2004 foi realizada, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, a defesa de dissertação de **Nerivan Barbosa de Lima**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, coordenadora do curso supra citado, fez a apresentação do aluno, de sua orientadora, Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, de seu Co-orientador, Prof. Dr. Celso Pinto de Melo, do Depto. de Física/UFPE e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Nereide Stela Santos Magalhães, na qualidade de Presidente, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Nicácio Henrique da Silva, os três do Depto. De Bioquímica e Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, da UFRN. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Físico-química Interfacial de Filmes Mistos de Fosfolípidos e Ácido Usnico**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 56 (cinquenta e seis) minutos. Após a apresentação, a Sra. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para o Prof. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, em seguida, para o Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, e finalmente para o Prof. Nicácio Henrique da Silva. Concluídas suas arguições, agradeceram e cumprimentaram o mestrando e seus orientadores. A sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso, na presença da Coordenadora. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovado com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 26 de fevereiro de 2004.

Assinada em Recife, 26 de fevereiro de 2004.
Nereide Stela Santos Magalhães
Presidente da Banca Examinadora

Assinada em Recife, 26 de fevereiro de 2004.
Secretário do Curso
Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

NERIVAN BARBOSA DE LIMA

**FÍSICO-QUÍMICA INTERFACIAL
DE FILMES MISTOS DE FOSFOLIPÍDEOS E
ÁCIDO ÚSNICO**

**Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal
de Pernambuco**

APROVADO POR: _____

Data:26/02/04

INDICE ANALÍTICO

	Página
Agradecimentos	II
Lista de figuras	III
Lista de figuras do artigo	IV
Lista de tabelas do artigo	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Introdução	8
Ácido úsnico	8
Propriedades biológicas do ácido úsnico	9
Mecanismo de ação do ácido úsnico	12
Lipossomas	14
Filmes de Langmuir	16
Físico-química interfacial em monocamadas de fosfolípidos	19
Justificativa do trabalho	21
Objetivos	22
Referências	23
Trabalho a ser submetido para publicação	27
Introdução	28
Experimental	30
Resultados e discussões	31
Conclusões	49
Referências	50

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua constante presença em minha vida.

Aos meus pais pelo eterno e forte apoio.

À prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães pela excepcional orientação.

Ao Prof. Dr. Celso Pinto de Melo pela indispensável presença científica que se fez ser.

A todos que fazem parte do Departamento de Bioquímica, em especial a prof.^a Dr.^a Vera Lucia de Menezes Lima, Miron por toda amizade desenvolvida.

A todos os colegas de turma do mestrado, em especial Ana acácia, Regina, Lilian, Ana Catarina e Alexandre Libânio.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do LIKA, em especial Hercília, Noêmia, Ian, Marcela, Milena, Simone, Agenor, Mariana, Dayse, a todos pelos valiosos momentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que diretamente ou indiretamente contribuíram, clareando os caminhos e mostrando horizontes.

Especialmente agradeço à FACEPE- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco, a quem dedico, de forma plena, esta e muitas outras conquistas de minha vida.

Ao CNPq pelo suporte para realização desta tese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido úsnico	8
Figura 2. Cuba padrão de Langmuir-Blodgett	18

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Estrutura química do ácido úsnico	28
Figura 2. Isoterma de compressão do ácido úsnico	32
Figura 3. Isoterma de histeresis do ácido úsnico	32
Figura 4. Isoterma compressibilidade do ácido úsnico.	33
Figura 5. Isotermas de compressão dos filmes de PC; PC-DPPE (1:1); PC-DPPE (4:1) e PC-DPPE (7:1).	34
Figura 6. Isotermas de compressão dos filmes de DPPC; DPPC-DPPE (1:1); DPPC-DPPE (4:1) e DPPC-DPPE (7:1).	35
Figura 7. Isotermas de compressão dos filmes de DPPE; DPPE-PA (1:1) e DPPE-AS (1:1).	36
Figura 8. Isotermas de compressão pressão superficial-área molecular dos filmes de DPPC; DPPC-PA (1:1) e DPPC-SA (1:1).	38
Figura 9. Isotermas de compressão pressão superficial-área molecular dos filmes de PC; PC-PA (1:1) e PC-SA (1:1).	37
Figura 10. Isotermas de compressão dos filmes de ácido úsnico, DPPE, DPPE-UA (4:1) e DPPE- UA (7:1).	38
Figura 11. Isotermas de compressão dos filmes de ácido úsnico, DPPC, DPPC-UA (4:1) e DPPC- UA (7:1).	41
Figura 12. Isotermas de compressão dos filmes de ácido úsnico, PC, PC-UA (4:1) e PC-UA (7:1).	43
Figura 13. Isotermas de compressão dos filmes de ácido úsnico, PC-DPPE-UA (1:1:1) e PC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).	44
Figura 14. Isotermas de compressão dos filmes de Ácido úsnico, DPPC-DPPE-SA (1:1:1:1) e DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).	43
Figura 15. Isotermas de compressão dos filmes de ácido úsnico, PC-DPPE (1:1), PC-DPPE-PA (1:1:1) e PC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1).	44
Figura 16. Isotermas de compressão dos filmes de ácido úsnico, DPPC-DPPE-PA (1:1:1:1) e DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPC. Dipalmitoilfosfatidilcolina	30
DPPE. Dipalmitoiletanolamina	30
PC. fosfatidilcolina de soja	30
AS. Estearilamina	30
PA. Ácido fosfatídico	30
UA. Ácido úsnico	30

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

	Página
Tabela 1: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de PC; PC-DPPE (1:1); PC-DPPE (4:1) e PC-DPPE (7:1).	34
Tabela 2: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPC; DPPC-DPPE (1:1); DPPC-DPPE (4:1) e DPPC-DPPE (7:1).	35
Tabela 3: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPE; DPPE-SA (1:1) e DPPE-PA (1:1).	37
Tabela 4: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPC; DPPC-AS (1:1) e DPPC-PA (1:1).	38
Tabela 5: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de PC; PC-SA (1:1) e PC-PA (1:1).	39
Tabela 6: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPE; DPPE-UA (4:1) e UA (7:1).	41
Tabela 7: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPC; DPPC-UA (4:1) e DPPC-UA (7:1)	42
Tabela 8: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de PC; PC-UA (4:1) e PC-UA (7:1).	43
Tabela 9: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de PC-DPPE-SA (1:1:1) e PC-DPPE-SA-UA (1:1:1).	44
Tabela 10: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPC-DPPE-SA (1:1:1) e DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1)	45
Tabela 11: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de PC-DPPE-PA (1:1:1) e PC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1)	47
Tabela 12: Parâmetros das isothermas de compressão dos filmes de DPPC-DPPE-PA e DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1)	48

RESUMO

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2h,9bH)-dibenzofurano], apresenta-se como um pigmento amarelo, de forte caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e glicerol, parcialmente solúvel em etanol e facilmente solúvel em éter, acetona, benzeno e clorofórmio. Produzido por líquens visando sua defesa, o ácido úsnico encontra-se no talo líquênico, onde sua concentração parece estar relacionada com a quantidade integral de agentes tóxicos aromáticos do ambiente. Das classes de compostos de baixo peso molecular, derivados de líquens, o ácido úsnico tem sido extensivamente estudado em virtude de sua ampla potencialidade de ação biológica: propriedades antimicrobianas, antitumorais, antivirais, antiinflamatórias, antipiréticas e analgésicas. Assim, no extensivo campo de estudo envolvendo o ácido úsnico, destacam-se os trabalhos que buscam formas de minimizar os seus efeitos colaterais: a vetorização por lipossomas tem sido uma dessas linhas de estudo. O estudo do mecanismo de interação do ácido úsnico com lipossomas pode ser efetuado através da análise físico-química de monocamadas mistas de fosfolipídios com ácido úsnico. No presente trabalho, estudos foram realizados objetivando a caracterização físico-química interfacial, através da técnica de Langmuir, das propriedades do ácido úsnico puro e quando em filmes mistos com fosfolipídios. A técnica de Langmuir envolve a formação com posterior compressão de filmes finos formados por monocamadas moleculares em uma interface ar-água. Por meio desta técnica, isotermas que relacionam a área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$) dos filmes com as pressões superficiais (π) correspondentes são obtidas. Tais isotermas forneceram resultados que indicam que: em filmes puros de PC (fosfatidilcolina) o ácido úsnico reduz substancialmente tanto a pressão de colapso, de 45 para 24 mN/m, quanto a área molecular, de 62,5 para 37,5 $\text{\AA}^2/\text{mol.}$; em filmes de DPPE, o ácido úsnico reduz a área molecular de 40,8 para 16,5 $\text{\AA}^2/\text{mol.}$, sem alterar a pressão de colapso; em filmes de DPPC, a área molecular média não foi alterada, embora a pressão de colapso tenha sofrido um acréscimo de 55 para 68,5 mN/m. Em filmes mistos tanto com DPPC quanto com PC, o ácido úsnico pouco influenciou os parâmetros das isotermas obtidas. Assim, pelos resultados obtidos, o ácido úsnico apresenta uma maior adsorção em filmes puros de DPPC, onde contribui para aumentar a resistência mecânica do filme em 13,5 mN/m. Em filmes puros de DPPE, a presença de ácido úsnico promoveu a dessorção deste fosfolipídeo para a subfase aquosa, fenômeno também observado nos filmes puros de PC, onde também ocorreu redução da resistência mecânica do filme em 21 mN/m.

ABSTRACT

The usnic acid it comes as a yellow pigment, of strong character hidrophobic, being insoluble in water and glicerol, partially soluble in etanol and easily soluble in ether, acetone, benzene and chloroform. Produced by liquens seeking your defense, the acid úsnico is in the shaft liquênico, where your concentration seems to be related with the integral amount of aromatic toxicant agents of the atmosphere. Of the classes of composed of low molecular weight, derived of liquens, the acid úsnico has been extensivamente studied by virtue of your wide potentiality biological action. Like this, in the extensive study field involving the usnic acid, they stand out the works that look for forms of minimizing your collateral effects: the carriers for liposomes has been one of those study lines. The study of the mechanism of interaction of the usnic acid with liposomes can be made through the physical-chemical analysis of mixed monolayers of phospholipids with acid úsnico. In the present work, studies were accomplished aiming at the characterization physical-chemistry interfacial, through the technique of Langmuir, of the properties of the pure usnic acid and when in mixed films with phos[pholips]. The technique of Langmuir involves the formation with subsequent compression of fine films formed by molecular monolayers in an interface air-water. Through this technique, isotherms that they relate the molecular area ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$) of the films with the superficial pressures (p) correspondents are obtained. Such isotherms supplied results that indicate that: in pure films of PC (phosphocholine) the usnic acid reduces the collapse pressure, of 45 substantially so much for 24 mN/m, as the molecular area, of 62.5 for 37.5 $\text{\AA}^2/\text{mol.}$; in films of DPPE, the usnic acid reduces the area of 40.8 for 16.5 $\text{\AA}^2/\text{mol.}$, without altering the collapse pressure; in films of DPPC, the medium molecular area was not altered, although the collapse pressure has suffered an increment of 55 for 68.5 mN/m. In mixed films so much with DPPC as with PC, the usnic acid little influenced the parameters of the obtained isotherms. Like this, for the obtained results, the acid úsnico presents a larger adsorption in pure films of DPPC, where it contributes to increase the mechanical resistance of the film in 13.5 mN/m. In pure films of DPPE, the presence of usnic acid promoted the dessorcion of this phospholipids for the aqueous subfase, phenomenon also observed in the pure films of PC, where it also happened reduction of the mechanical resistance of the film in 21 mN/m.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ÁCIDO ÚSNICO

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2h,9bH)-dibenzofurano] (C₁₈H₁₆O₇), peso molecular de 344,4, ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (+) e (-), as quais dependem da projeção do grupo metila angular localizado na posição do carbono quiral 9b (Figura 1). É um constituinte bastante abundante em diversos gêneros de líquens filogeneticamente distintos, tais como *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria*, *Ramalina* e *Parmelia* (Venkataramana & Krishna, 1992; Muller, 2001; Cochietto *et al.*, 2002; Ingólfssdóttir, 2002). Apresentando-se como um pigmento amarelo, cujo ponto de fusão encontra-se em torno de 203°C, de forte caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e glicerol, parcialmente solúvel em etanol e facilmente solúvel em éter quente, acetona, benzeno e clorofórmio (Cochietto *et al.*, 2002).

In vivo, o ácido úsnico é produzido pelos líquens, provavelmente visando sua defesa. A presença de agentes poluentes parece estimular sua biosíntese, fato que o torna um indicador de biomonitoramento ambiental. Sua concentração no talo liquênico parece estar relacionada com a quantidade integral dos agentes tóxicos aromáticos (Cardarelli *et al.*, 1997; Muller, 2001).

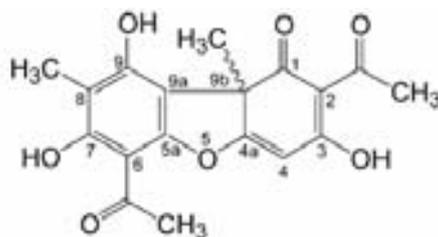


Figura 1: Estrutura química do ácido úsnico (Ingólfssdóttir, 2002)

1.1.2. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ÚSNICO

1.1.2.1. AÇÃO ANTIBIÓTICA

Das classes de compostos de baixo peso molecular, derivados de líquens, o ácido úsnico tem sido mais extensivamente estudado. Nas décadas de 40 e 50, diversos compostos liquênicos foram mencionados ativos contra várias linhagens de bacilos da tuberculose e organismos Gram-positivos, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, tendo o ácido úsnico destacado-se em virtude de sua intensa ação antibiótica (Müller, 2001). O ácido úsnico também tem sido relatado como sendo um potente agente antibacteriano contra muitos microrganismos comuns, desempenhando menor ação quando comparado às drogas padrão: rifampicina e estreptomicina (Müller, 2001). É bem difundida a propriedade antibiótica do ácido úsnico frente a bactérias gram-positivas, em trabalhos realizados por Lauterwein *et al.*, (1995). Entretanto, o ácido úsnico demonstrou ser inativo em estudos realizados com bactérias Gram-negativas, tais como *Escherichia*, *Salmonella* e *Shighella* (Müller, 2001).

1.1.2.2. AÇÃO CITOTÓXICA E ANTITUMORAL

Aumento da sobrevida de 35-52 % de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado foi demonstrado em experimentação em que camundongos com carcinoma de pulmão de Lewis foram tratados com ácido úsnico (Takai *et al.*, 1979). Estes achados levaram à realização da síntese de novos derivados de ácido úsnico com maior afinidade sobre o sistema Lewis. Testes citotóxicos, destes novos derivados frente à

linhagem L₁₂₁₀, revelaram que, dentre os análogos estudados, os de natureza hidrofílica demonstraram menor citotoxicidade. Em ensaios posteriores, estes derivados menos citotóxicos demonstraram significativa perda da atividade antitumoral, contra o tumor de Lewis (Takai *et al.*, 1979).

Estudos relativos à ação dos ácidos liquênicos sobre crescimento de células malignas e normais do câncer de mama, linhagem T-47D e ZR-75-1, de leucemia (K-262) evidenciaram que culturas expostas a estes compostos apresentaram visíveis mudanças relacionadas à monocamada celular. As células apresentam-se arredondadas e desprendidas da superfície. As células ZR-75-1 apresentaram vacuolização, e nas células K562, observou-se redução da monocamada celular. Características morfológicas de apoptoses foram identificadas em estudos com altas concentrações de ácido úsnico (Ingólfssdóttir, 2002).

Sobre linhagem celular de queratinócitos humano HaCaT, modelo favorável de elevada proliferação na epiderme, uma potente ação antiproliferativa do ácido úsnico foi relatada por Muller & Kumar (1999), onde a não alteração da atividade da lactato desidrogenase no meio de cultura foi um leve sinal da perda de danificação da membrana, indicando que o efeito sobre estas células foi mais de natureza citostática do que citotóxica. Em testes de atividade antitumoral com cinco compostos liquênicos, utilizando um simples teste de bioensaio com camarões de água salgada, demonstrou que o ácido úsnico foi o composto bioativo mais potente (Fávaro *et al.*, 1990).

Conforme Virtanen & Karki (1956), a dose letal do ácido úsnico em diferentes animais foram: camundongos, intraperitoneal (ip): 25 mg/kg; subcutânea (sc): 70 mg/kg; rato, intravenosa (iv): 30 mg/kg; coelhos iv: 30 mg/kg; cachorros, iv: 40 mg/kg. No estudo de toxicidade crônica deste composto em coelhos, evidenciou-se que quando foi

administrada uma solução os animais apresentaram perdas de apetite, dificuldades respiratórias e câimbras estomacais.

Em relação à toxicidade do ácido úsnico em seres humanos, observou-se experimentalmente que administrações de 0,1-1g/dia não demonstraram efeito tóxico. Entretanto, quantidades de 3 g/dia são responsáveis por complicações hepáticas nos indivíduos tratados (Ingólfssdóttir, 2002).

1.1.2.3. AÇÃO ANTIVIRAL

No ensaio de ação antiviral, realizado com cinco compostos liquênicos, o ácido úsnico apresentou-se como o mais ativo, frente ao tumor produzido pela indução do vírus Epstein-Barr (Yamamoto *et al.*, 1998). Posteriores estudos realizados com preparações orgânicas de *Usnea longissima*, contendo o ácido usnico em alto teor, apresentou uma significativa redução da ativação do tumor Epstein-Barr induzido pela teleocidina B-4 (Yamamoto *et al.*, 1998). Pacientes tratados com solução de ácido úsnico associado ao sulfato de zinco, como adjuvante terapêutico no tratamento da infecção do Papilomavírus genital, apresentaram um aumento na velocidade de reconstituição do epitélio. A diferença entre o indivíduo tratado e o controle permaneceu significativa mesmo 6 meses após o término do tratamento (Cocchietto *et al.*, 2002).

Relacionando a possível ação do ácido úsnico sobre a proliferação de viral, Campanella *et al.*, (2002) descreve que o ácido úsnico apresenta uma relevante inibição sobre a replicação do DNA viral, mesmo em concentrações não citotóxicas, onde a prolongada permanência deste composto no meio de cultura, torna-se indispensável para

manter este padrão de ação.

1.1.2.4. AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA, ANTIPIRÉTICA E ANALGÉSICA

O ácido úsnico, isolado da *Usnea diffracta*, desenvolveu ação antipirética e analgésica, atuando contra hipertemia induzida por lipopolissacarídeos em camundongos. Neste estudo foi observado que este composto atua induzido pelo ácido acetil salicílico, e atua de forma dose independente (Müller, 2001).

No estudo de atividade antiinflamatória dose-dependente do ácido úsnico, isolado de *Roccella montagnei*, em ratos, observou-se uma significativa redução da atividade após o tratamento crônico, sugerindo, que este composto apresenta efeito antipirético e analgésico. Conforme estes resultados o mecanismo de ação pode envolver uma inibição da síntese de prostaglandinas (Müller, 2001).

1.1.3. MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO ÚSNICO

Abo-khatwa *et al.*, (1996), relatam que o ácido úsnico, ácido vulpínico e atranorina apresentaram ação como desacopladores da fosforilação oxidativa, quando testados em mitocôndrias de fígado de rato. Em tais estudos estes compostos atuaram no interior da membrana mitocondrial através de suas propriedades lipofílicas com características semelhantes ao do 2,4-dinitrofenol. Vavasseur *et al.*, (1991) também evidenciou o potencial inibitório do ácido úsnico sobre processos respiratórios aeróbicos em células vegetais em *Cormmelina communis*. Johnson *et al.*, (1950) descreveram o relevante efeito inibitório do

ácido úsnico na respiração, em homogenatos de rim de rato, bem como o desacoplamento da fosforilação oxidativa em homogenato de fígado de rato em concentrações mínimas de 1,3-2,6 µg/ml.

Takai *et al.*, (1979) constataram a importância do caráter hidrofóbico do ácido úsnico e da porção β-tricetona deste, na toxicidade contra células neoplásicas. Havendo qualquer alteração nestas características, ocorre uma considerável redução na ação citotóxica deste composto.

Aventou-se a hipótese que a atividade antibiótica das substâncias liquênicas seja medida pela alteração da permeabilidade das paredes celulares bacterianas (Vicente, 1975). Esta teoria é reforçada pelo fato que estas substâncias são produzidas e utilizadas pelo fungo associado no líquen para aumentar a permeabilidade de solutos através da parede e da membrana celular da alga, controlando o aporte das substâncias fotoassimiladas.

Acredita-se também que o ácido úsnico pode reagir de maneira preferencial com compostos químicos integrantes das paredes celulares de bactérias Gram-positivas. Vicente & Cifuentes (1981), descrevem que pequenas concentrações de ácido úsnico são capazes de promover a destruição parcial de tais membranas. O fato está de acordo com a hipótese de que o ácido úsnico se ligaria preferencialmente a componentes minoritários da parede celular destas bactérias, os peptidoglicanos. Como estes atingem grandes proporções nas paredes celulares das Gram-positivas, a ligação do ácido úsnico a eles culmina com a destruição da parede e morte celular (Vicente, 1975).

1.2. LIPOSSOMAS

Nas últimas décadas, numerosos estudos demonstraram que a distribuição de um fármaco no organismo pode ser modificada pelo uso de vetores coloidais, tais como lipossomas. Estes carreadores protegem certos princípios ativos da degradação e/ou inativação pelo suco gástrico; melhoram a biodisponibilidade por aumento da penetração celular de substâncias hidrofílicas e proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado (órgão, tecido ou célula), eliminando ou minimizando os efeitos colaterais que normalmente acompanham a terapêutica convencional.

O princípio da vetorização de medicamentos está fundamentado no tamanho, lipofilia, estabilidade e citotropismo do princípio ativo e na composição dos fluidos biológicos, monitorada pelas características do veículo. Sistemas coloidais de liberação controlada de drogas oferecem diversas vantagens com relação às formas de dosagens convencionais. Devido ao reduzido tamanho das partículas, as preparações coloidais prestam-se à administração parenteral e podem ser úteis para liberação controlada do princípio ativo em órgãos específicos ou sítios alvos do organismo. O direcionamento da substância biologicamente ativa ao sítio de ação desejado, poderá não somente melhorar a eficiência terapêutica, como também permitir a redução da quantidade da droga a ser administrada para obtenção da resposta biológica, minimizando com isso efeitos colaterais indesejáveis (Magenheim & Benita, 1991).

A modulação apropriada do fármaco no organismo está relacionada diretamente com a forma de administração do medicamento. Atualmente, o objeto principal de investigação na farmácia galênica é o desenvolvimento de novas formas de administração

de medicamentos que possam melhorar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade de fármacos (Couvreur *et al.*, 1997, Puisieux & Roblot, 1989).

Assim, em meio a este contexto de vetorização, temos os lipossomas, vesículas simples constituídas por cavidade aquosa revestida por uma membrana composta de moléculas lipídicas, fosfolípidios, fosfoglicerídeos e esfingolipídios e seus produtos de hidrólise, o mais comum é a fosfatidilcolina, também conhecida como lecitina, (Kallinteri *et al.*, 2002).

Lipossomas conjugados a proteínas tem aberto vários caminhos, principalmente devido ao uso potencial como sistemas de liberação de medicamentos e aplicações na área de diagnóstico. Esta técnica possa ser aplicada a uma grande variedade protéica, tais como anticorpos, proteína A de *Staphylococcus aureus*, lectinas de plantas e enzimas (Malcolm *et al.* 1993). Chen *et al.* (1996) observaram que lectina de *Ulex europaeus* incorporada na bicamada fosfolipídica de lipossomas, favoreceu significativamente a absorção pelo trato gastrointestinal (10,5%) com relação a lipossomas sem lectina (3,2%). Segundo Malcolm *et al.* (1993), lipossomas conjugados a proteínas apresentam considerável interesse como sistemas potenciais de direcionamento de fármacos e outros agentes terapêuticos.

Em virtude de suas potencialidades como vetor de drogas, é grande o interesse pelos lipossomas, o que tem levado a investigações extensivas para o uso destas vesículas como carreadoras de agentes antitumorais, antimalários, antivirais, antiinflamatórios antifúngicos, antibióticos, como também, prostaglandinas, esteróides e broncodilatadores, além de suporte para catalisadores (Lasic, 1992).

1.3. FILMES DE LANGMUIR

Filmes de Langmuir é a denominação comumente atribuída à filmes orgânicos finos formados por monocamadas moleculares em um interface ar-água. Langmuir demonstrou que monocamadas de ácido graxos poderiam ser ordenadas em uma interface ar-água pela aplicação de uma pressão superficial. Foi possível então submeter essas monocamadas flutuantes a mudanças de fases correspondentes a uma transformação de um estado gasoso, em que as moléculas seriam não interagentes, a um estado sólido, onde as moléculas formariam um filme rígido (Kroschwitz 1990).

As moléculas tipicamente usadas para a fabricação desses filmes são de natureza anfifílicas, moléculas constituídas por uma longa cadeia alifática (que é hidrofóbica e portanto impede a dissolução da molécula na subfase aquosa) e por uma cabeça hidrofílica, permitindo a fixação da molécula na superfície da água (Gaines, 1990). Portanto, este tipo de molécula adota configurações especiais em interfaces aquosas, formando estruturas organizadas, decorrentes da insolubilidade das porções hidrofóbicas, fato determinante na química interfacial dessas moléculas. Um processo de espalhamento espontâneo é observado quando moléculas anfifílicas são colocadas em uma superfície aquosa, esse processo é decorrente da busca do sistema em alcançar minimizações em seu conteúdo de energia livre. Assim, considerações de entropia deverão requerer que essas moléculas se dispersem na água. No entanto, a energia deverá ser reduzida para qualquer configuração que maximize as interações das moléculas polares da água umas com as outras e com os grupos de cabeça polar. Tais configurações devem reduzir as interações entre os grupos polares e apolares. O sistema completo assim constituído se comportará de forma a que

exista interação entre os grupos polares, que se agruparão, enquanto que os grupos polares e apolares irão, por sua vez agregar-se preferencialmente. Três configurações diferentes de sistemas formados por grupos polares e apolares podem ser destacados. Em primeiro lugar, temos os filmes de Langmuir, formados por uma monocamada de moléculas anfifílicas. Esses filmes podem existir em uma interface líquido-gás se os grupos polares dessas moléculas estiverem sempre em contato com o líquido polar. Outra configuração estrutural também possível de ser observada para essas moléculas são as micelas, que constam usualmente de estruturas fechadas de moléculas anfifílicas, arranjadas de tal forma que, em um solvente polar, os grupos polares fiquem na região mais externa da estrutura enquanto os grupos apolares se agrupam em seu interior. As vesículas, outra configuração estrutural, constam de um arranjo semelhante às micelas, usualmente em forma aproximadamente esférica, mas cujas paredes são formadas de bicamadas de moléculas anfifílicas (Gaines, 1990).

A solubilidade de um material anfifílico em água depende do comprimento das partes hidrofóbicas e da natureza do grupo hidrofílico. Os fosfolipídios, substâncias de extrema relevância nos sistemas biológicos, podem existir como vesículas ou como monocamadas superficiais (Gaines, 1990). Quaisquer sejam os prospectos comerciais para os filmes de finos, não existe dúvida quanto à aplicabilidade da técnica de Langmuir para a pesquisa fundamental. Várias áreas da ciência são beneficiadas pelas investigações de sistemas modelo baseados em montagens monomoleculares (Roberts, 1990).

A preparação de filmes orgânicos finos a partir de moléculas biológicas tem despertado interesse especial pelas suas múltiplas aplicações na produção de dispositivos com características físicas, químicas e biológicas especificadas, relacionadas às suas ordens estruturais compatíveis às suas funções complexas e altamente elaboradas das moléculas

biológicas. Assim, a preparação de filmes de Langmuir tem sido convenientemente utilizada para estudar as interações cooperativas entre os constituintes de membranas e as propriedades de superfície como um todo. Neste sentido, inúmeros estudos são realizados envolvendo as propriedades estruturais de monocamadas de fosfolípidos (Miyasaka, 1978).

Na prática os filmes de Langmuir são espalhados em uma superfície de uma subfase formada por água ultra limpa, deionizada, colocada em uma cuba de teflon. A cuba possui uma barreira móvel controlada mecanicamente para comprimir o filme pela diminuição da área superficial livre da cuba. A isoterma pressão-área, a primeira e mais fundamental caracterização das monocamadas, é monitorizada continuamente e para um certo valor crítico da razão área/(número de moléculas) a pressão começa rapidamente a crescer; a fase sólida é então alcançada e a pressão passa a ser aproximadamente constante. Aumentando-se ainda mais a pressão o filme fino estará sujeito ao colapso, quando pode ocorrer tanto a diluição da monocamada na sub-fase quanto deformações estruturais no filme flutuante (Gaines, 1990).

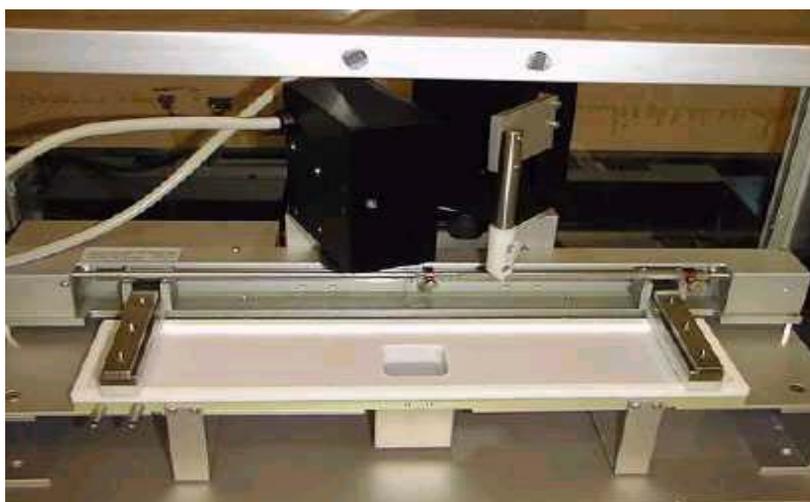


Figura 2: Cuba padrão de Langmuir-Blodgett

A técnica de Langmuir é atualmente uma das mais efetivas nos estudos da físico-química da superfície (Petty, 1996; Davies & Rideal, 1961; Ulman, 1991). Esta técnica foi consolidada no início do século XX por Irving Langmuir ao estudar, teórica e experimentalmente, a formação de filmes de substâncias puras, principalmente ácidos graxos sobre a superfície da água (Cavalli, 1993).

Um filme de Langmuir pode ser formado quando uma certa quantidade de moléculas anfífilas é espalhada na superfície da água. As moléculas na monocamada são orientadas de forma tal que esta técnica torna-se extremamente atrativa na preparação de sistemas altamente organizados e com espessura controlada (ordem de grandeza de angstroms). Portanto, como várias moléculas de importância biológica (fosfolípidos) possuem propriedades anfífilas, esta técnica se mostra muito efetiva em alguns processos de estudos biológicos (Philipps & Chapman, 1968).

A técnica de formação de monocamadas de Langmuir é o primeiro passo para a produção de estruturas moleculares de alta qualidade filmes de Langmuir-Blodgett (LB). Os filmes de Langmuir-Blodgett, em homenagem aos cientistas americanos Irving Langmuir e Katharine-Blodgett, são obtidos através da transferência de monocamadas para um substrato sólido. Para essa transferência, o substrato é imerso e retirado da subfase aquosa, passando pela monocamada que se transfere para o substrato (Petty, 1996). A repetição desse procedimento permite a deposição de várias camadas em um mesmo substrato. Esta técnica apresenta-se como uma das mais importantes na área da tecnologia de ponta por permitir a fabricação de filmes ultra-finos (ordem de nm), o controle da espessura em Angstroms, e a obtenção de uma grande ordem estrutural (Ulman, 1991).

O universo de aplicações dos filmes de LB e filmes de Langmuir é vasto e ocupa espaço nas mais diversas áreas, incluindo física, biologia, química e em várias áreas interdisciplinares, como a tecnologia farmacêutica (Roberts,1990).

1.3.1. FÍSICO-QUÍMICA INTERFACIAL EM MONOCAMADAS DE FOSFOLIPÍDEOS

Os mecanismos dos processos ocorridos em membranas biológicas, podem ser estudados por diferentes sistemas modelos: monocamadas de fosfolipídeos, interação de lipossomas, micelas detergentes, interação de proteínas e fosfolipídeos, interações de proteínas e fosfolipídeos e outras moléculas de importância biológica que possuam propriedades anfífilas (Philipps & Chapman, 1968; Ponchel & Irache, 1998). Monocamadas de fosfolipídeos na interface ar-água são consideradas como um modelo de membranas biológicas, simples mas muito eficiente, pois o arcabouço de tais membranas é formado por uma bicamada de fosfolipídeos (Philipps & Chapman, 1968). Modelando uma membrana celular é possível estudar, em nível molecular, sua interação com drogas e enzimas. A mesma interpretação pode ser feita ao comparar essas monocamadas com lipossomas que encapsulam substâncias bioativas (Dalençon *et al.*, 1996).

O estudo do mecanismo de interação de moléculas bioativas com lipossomas, carreador utilizado na encapsulação e transporte seletivo de fármacos, modelo ideal que representa a interação de fármacos com tecidos alvos, pode ser efetuado através da análise físico química de monocamadas de fosfolipídeos. Esta análise fundamental é imprescindível para viabilizar o uso de inúmeros compostos bioativos na preparação de

formas farmacêuticas de liberação controlada e de alta especificidade por determinados tecidos do organismo. Assim, o conhecimento das propriedades químicas interfaciais de moléculas bioativas em interações com fosfolípidios em monocamadas de Langmuir é de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas micro e nanoparticulados contendo tais moléculas bioativas em suas superfícies ou encapsuladas em suas estruturas (Ponchel & Irache, 1998).

2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O presente trabalho apresenta um caráter multidisciplinar, associando a biotecnologia de liberação controlada de fármacos com a físico química interfacial, buscando, desta forma, suporte ao estudo da estabilidade de sistemas de liberação controlada de medicamentos.

O estudo do mecanismo de interação do ácido úsnico com fosfolípidios, lipídeos constituintes de lipossomas, utilizados na encapsulação e transporte seletivo de fármacos, pode ser efetuado através da análise físico química de monocamadas mistas formadas por fosfolípidios e ácido úsnico, depositadas numa interface ar-água. Estas análises fornecem informações significantes da organização e da magnitude das interações entre fosfolípidios e compostos bioativos em estudo (Berthelot *et al.*, 1998).

Para a realização dos estudos da físico química interfacial do ácido úsnico, utilizou-se a técnica de Langmuir. Esta técnica revela os aspectos dinâmicos das interações moleculares através de medidas de tensão superficial (Sigmund *et al.*, 1999). Assim, o fundamento destes estudos interfaciais reside na análise das alterações das propriedades

físico-químicas da monocamada como reflexo das interações existentes entre os seus constituintes. Portanto, medidas de tensão superficial refletirá a existência de natureza de interações moleculares entre o componente bioativo em estudo e fosfolípidos (Chen *et al.*, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Caracterizar do ponto de vista físico-químico interfacial, através da técnica de Langmuir, as propriedades de ácido úsnico em filmes mistos com fosfolípidos.

3.2. ESPECÍFICOS

- Estudar as propriedades interfaciais do ácido úsnico;
- Determinar a pressão de superfície de filmes mistos do ácido úsnico e fosfolípidos em presença de fosfolípidos com carga positiva ou negativa;
- Correlacionar a estabilidade dos filmes mistos contendo ácido úsnico com a estabilidade de lipossomas contendo ácido úsnico.

4. REFERÊNCIAS

ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAI, A. A.; AL-JAWHARI, D. A. **Natural Toxins**, 4(2): 96-102, 1996.

BERTHELOT, L.; ROSILIO, V.; COSTA, M. L.; CHIERICI, S.; ALBRECHT, G.; BOULLANGER, P.; BASZKIN, A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 11 (1998) 239-248.

CAVALLI, A. **Condutância Lateral em Filmes de Langmuir e Filmes Mistos de Fármacos com Fosfolipídeos** — Dissertação de mestrado, São Carlos, Brasil, (1993).

CHEN, H.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. **Pharm. Res.**, 13,9, 1378-83, 1996.

CHEN, P.; POLICOVA, Z.; PACE-ASCIAK, C. R.; NEWMANN, A. W. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 15 (1999) 3 13-324.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G.. **Biochemistry**, 84: 329-334, 2002.

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO, F. **Cel. Mol. Life Sci.** 53(8) 667-672, 1997.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L. **Naturwissenschaften** 89:137-149, 2002.

COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. **Pharm.**, 8; 1079-1086, 1997.

DALENÇON, F.; ROSILIO V.; BASZKIN, A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 15 (1999) 195-201.

DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K., **Interfacial Phenomena**, Academic press, N. Y. (1961).

FÁVARO, O. C. N.; OLIVERIRA, M. .M.; ROSSINI, A.; KAMARA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro. 62 (3) 217-224, 1990.

GAINES, G. L **Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interface** Wiley, New Iork, 1990).

INGÓLFSDÓTTIR, K. **Phytochemistry** 61:729-736 2002.

JOHNSON, R. B.; FELDOT, G.; LARDY, H. A. **Ach. Biochem.**, 28:317-323, 1950.

KALLINTERI, P.; ANTIMISIARIS, S.G.; KARNABATIDIS, D.; KALOGEROPOULOU, C.; TSOTA, I.; SIABLIS, D. **Biomaterials**, 23 (24), 4819-4826, 2002

KROSCSWITZ, J. I. **Eletrical and Eletronic Propertie of Polymers: A State-of-the-Art Compendium** Jonh Wiley & Sons, New York, 1900.

LASIC, D. D. **Liposomes**. American Science, New Haven, v. 80, n. 1, p. 20 - 30, 1992.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETER, T.; MARRE, R.. **Antimicrob. Agent Chemoth.** 39:2541-2543, 1995.

MALCOLM, N. J.; FRANCIS, S. E.; HUTCHINSON, F. J.; HANDLEY, P. S. **Biochim. Biophys. Acta**: 1147 (1993) 251-261.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. S. **T.P. Pharma-Sciences** 1: 221-41, 1991.

MIYASAKA, T.; WATANABE, T.; FUJISHIMA A.; HONDA, K., **Am. Chem. Soc.** 100, 6657-61(1978).

MULLER K. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 56: 9-16, 2001.

- MULLER, K. S & KUMAR, K.C.; Lichen Metabolites. **J. Nat. Prod.** 62: 821-823, 1999.
- PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett Films**, Cambridge University Press, Cambridge (1996).
- PHILIPHS, M. C.; CHAPMAIN, D. **Biochim. Biophys. Acta** 163 (1968), 301.
- PONCHEL, G.; IRACHE, J. **Adv. Drug Deli. Rev.** 34 (1998) 191-219.
- PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. (1989) **S.T.P. Pharm. Sci**, n.2, 107-113.
- ROBERTS, G. G., **Contemp. Phys.** 25. 109 1984
- SIGMUND, W. M.; GOEDEL, W. A.; SOUTO-MAIOR, R.; TENÓRIO, A. C.; DE MELO, C. P. **Langmuir** 15 (1999) 3273-3278.
- TAKAI, M. UEHARA, Y. BEISLER, J. A. Usnic Acid Derivatives as Potential Antineoplastic Agents. **J. Med. Chem.** 22(11): 1380-1384, 1979.
- ULMAN **An Introduction to Ultrathin Organic Films. From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly**, Academic Press, (1991).
- VAVASSEUR, A. GAUTIER, H. THIBAUD, M. C. LASCÈVE, G. **J. Plant Physiol.**, 139: 90-94, 1991.
- VENKATARAMANA, D. KRISHNA, K. **J. Chromatogr.** 575: 167-170, 1992.
- VICENTE, C. **Fisiologia de las substancias liquenicas**. Madrid: Allandra, 162p. 1975.
- VICENTE, C. CIFUENTES, B. **Cryptog. Bryol. Lichenol.** 2 (2):213-222, 1981.

VIRTANEN, O.; KARKI, N. **Suomen Kehruistilehti**, 29:225-226, 1956.

YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; MATSUBARA, H.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; KUROKAWA, T.; YOSHIMURA, I. **Recent Res. Devel. Phytochem.** 2:23-33. 1998.

5. TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Colloids and Surface B: Biointerfaces

study of mixed films of usnic acid and phospholipids

Nerivan Barbosa de Lima^a, Celso Pinto de Melo^b, Nereide Stela Santos Magalhães^c

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil*

^b*Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil*

^c*Laboratorio de Imunopatologia Keiso-Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil*

1.Introdução

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2h,9bH)-dibenzofurano] ($C_{18}H_{16}O_7$), peso molecular de 344,4, ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (+) e (-), as quais dependem da projeção do grupo metil angular localizado na posição do carbono quiral 9b (Figura 1). É um constituinte bastante abundante em diversos gêneros de líquens filogeneticamente distintos, tais como *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria*, *Ramalina* e *Parmelia* [1]. Apresentando-se como um pigmento amarelo, cujo ponto de fusão encontra-se em torno de 203°C, de forte caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e glicerol, parcialmente solúvel em etanol e facilmente solúvel em éter quente, acetona, benzeno e clorofórmio [2].

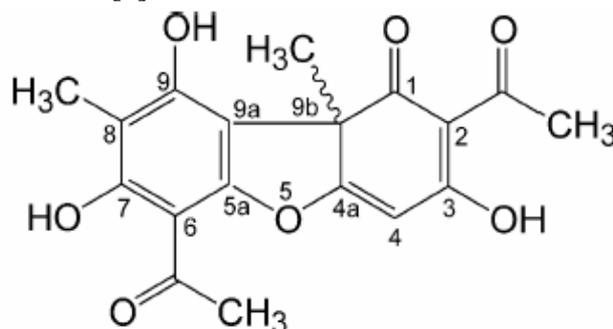


Figura 1. Estrutura química do ácido úsnico (Ingólfssdóttir, 2002).

In vivo, o ácido úsnico é produzido pelos líquens provavelmente visando sua defesa. A presença de agentes poluentes parece estimular sua biosíntese, fato que o torna um indicador de biomonitoramento ambiental. Sua concentração no talo líquênico parece estar relacionada com a quantidade integral dos agentes tóxicos aromáticos [3].

Estudos recentes constataram a importância do caráter hidrofóbico do ácido úsnico e da porção β -tricetona deste, na toxicidade contra células neoplásicas. Havendo qualquer alteração nestas características, ocorre uma considerável redução na ação citotóxica deste composto [4] Em ensaio de ação antiviral, realizado com cinco compostos líquênicos, o ácido úsnico apresentou-se como o mais ativo, frente ao tumor produzido pela indução do vírus Epstein-Barr [5].

Relacionando a possível ação do ácido úsnico sobre a proliferação de viral, o ácido úsnico apresenta uma relevante inibição sobre a replicação do DNA viral, mesmo em concentrações não citotóxicas, onde a prolongada permanência deste composto no meio de cultura, torna-se indispensável para manter este padrão de ação[6]

Filmes de Langmuir é a denominação comumente atribuída à filmes orgânicos finos formados por monocamadas moleculares em um interface ar-água. Langmuir demonstrou que monocamadas de ácido graxos poderiam ser ordenadas em uma interface ar-água pela aplicação de uma pressão superficial. Foi possível então submeter essas monocamadas flutuantes a mudanças de fases correspondentes a uma transformação de um estado gasoso, em que as moléculas seriam não interagentes, a um estado sólido, onde as moléculas formariam um filme rígido [7]

As moléculas tipicamente usadas para a fabricação desses filmes são de natureza anfífilas, moléculas constituídas por uma longa cadeia alifática (que é hidrofóbica e portanto impede a dissolução da molécula na subfase aquosa) e por uma cabeça hidrofílica, permitindo a fixação da molécula na superfície da água [8].

A preparação de filmes orgânicos finos a partir de moléculas biológicas tem despertado interesse especial pelas suas múltiplas aplicações na produção de dispositivos com características físicas, químicas e biológicas especificadas, relacionadas às suas ordens estruturais compatíveis às suas funções complexas e altamente elaboradas das moléculas biológicas. Assim, a preparação de filmes de Langmuir tem sido convenientemente utilizada para estudar as interações cooperativas entre os constituintes de membranas e as propriedades de superfície como um todo. Neste sentido, inúmeros estudos são realizados envolvendo as propriedades estruturais de monocamadas de fosfolípidos [9].

Os mecanismos dos processos ocorridos em membranas biológicas, podem ser estudados por diferentes sistemas modelos: monocamadas de fosfolípidos, interação de lipossomas, micelas detergentes, interação de proteínas e fosfolípidos, interações de proteínas e fosfolípidos e outras moléculas de importância biológica que possuam propriedades anfífilas [10]. Monocamadas de fosfolípidos na interface ar-água são consideradas como um modelo de membranas biológicas, simples mas muito eficiente, pois o arcabouço de tais membranas é formado por uma bicamada de fosfolípidos. Modelando uma membrana celular é possível estudar, em nível molecular, sua interação com drogas e

enzimas. A mesma interpretação pode ser feita ao comparar essas monocamadas com lipossomas que encapsulam substâncias bioativas [11].

2. Experimental

Todos os reagentes foram fornecidos pela Sigma Chemical Co: ácido usnico (UA); L- α Ácido fosfatídico (PA); Estearilamina (SA); Fosfatidilcolina (PC); Dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); Dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE). Para constituir a subfase, em todas as isotermas formadas, foi utilizada água deionizada (pH=7.0, T=25°C, 16 M Ω .cm) extraída de um sistema ultra-purificador (NANOpure Serie 550).

Para a realização dos experimentos, todas as soluções utilizadas foram preparadas utilizando-se um sistema de solvente constituído por uma mistura composta por (9:1) clorofórmio-metanol (v:v).

Proporções em massa foram utilizadas para a obtenção das monocamadas mistas. Os experimentos foram realizados em três blocos, cada um dos quais tendo-se um fosfolípido de referência, cujo peso molecular foi utilizado para a definição das áreas moleculares ocupadas pelo filme durante o processo de compressão das monocamadas.

Os filmes mistos em que o DPPE foi utilizado como fosfolípido de referência foram nas seguintes proporções: DPPE; DPPE-PA (1:1); DPPE-SA (1:1); DPPE-UA (4:1) e DPPE-UA (7:1).

Os filmes mistos em que o DPPC foi utilizado como fosfolípido de referência foram nas seguintes proporções: DPPC; DPPC-DPPE (1:1); DPPC-DPPE (4:1); DPPC-DPPE (7:1); DPPC-PA (1:1); DPPC-SA (1:1); DPPC-UA (4:1); DPPC-UA (7:1); DPPC-DPPE-PA (1:1:1); DPPC-DPPE-SA (1:1:1);); DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1); DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).

Os filmes mistos em que o DPPC foi utilizado como fosfolípido de referência foram nas seguintes proporções: PC; PC-DPPE (1:1); PC-DPPE (4:1); PC-DPPE (7:1); PC-PA (1:1); PC-SA (1:1); PC-UA (4:1); PC-UA (7:1). PC-DPPE-PA (1:1:1); PC-DPPE-SA (1:1:1);). PC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1); PC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).

As medidas de pressão superficial (π) em interface de todos os formados foram realizados em cuba padrão de Langmuir-Blodgett (KSV Instruments, Model KSV 5000), a

qual encontra-se no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da UFPE. A cuba modelo KSV 5000 é equipada com microbalanças para medir a pressão superficial através da técnica da lâmina de Wilhelmy. Esta cuba consiste basicamente de um reservatório para a subfase líquida, barreiras móveis que vinculam apenas as moléculas do filme e um sensor de pressão. O instrumento é controlado por um computador PC AT e com um sistema de software KSV versão 3.1 que acompanha a dinâmica de formação e deformação do filme [12]. Os experimentos de avaliação da pressão superficial de todos os filmes estudados foram efetuados em triplicatas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Propriedades interfaciais do Ácido úsnico

A atividade interfacial o ácido úsnico não demonstrou ter significantes ações na interface ar-água, visto que o mesmo não chegou a atingir valores relevantes de pressão superficial (Figura 2). Sua quase inexistência de atividade interfacial, em tais interfaces é verificada em tanto em sua isoterma de histeresis (Figura 3), quanto em sua isoterma de compressibilidade (Figura 4), onde é bem evidente há ocorrência de grandes perdas de ácido úsnico para a sub-fase aquosa. O ácido úsnico, mesmo apresentando um forte caráter hidrofóbico [13], passa a sub-fase aquosa. Provavelmente está molécula se organiza de forma a proteger, do contato direto com água, seus anéis hidrofóbicos, expondo à água suas regiões hidrofílicas. Este arranjo organizacional da molécula pode ser decorrência da estrutura do Ácido úsnico, onde a distribuição espacial das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas não permite que as moléculas de ácido úsnico se organizem, formando filmes na interface ar-água o que faz com tais moléculas prefiram à sub-fase aquosa, durante o processo de compressão, à permanecerem na interface sob a forma de monocamadas.

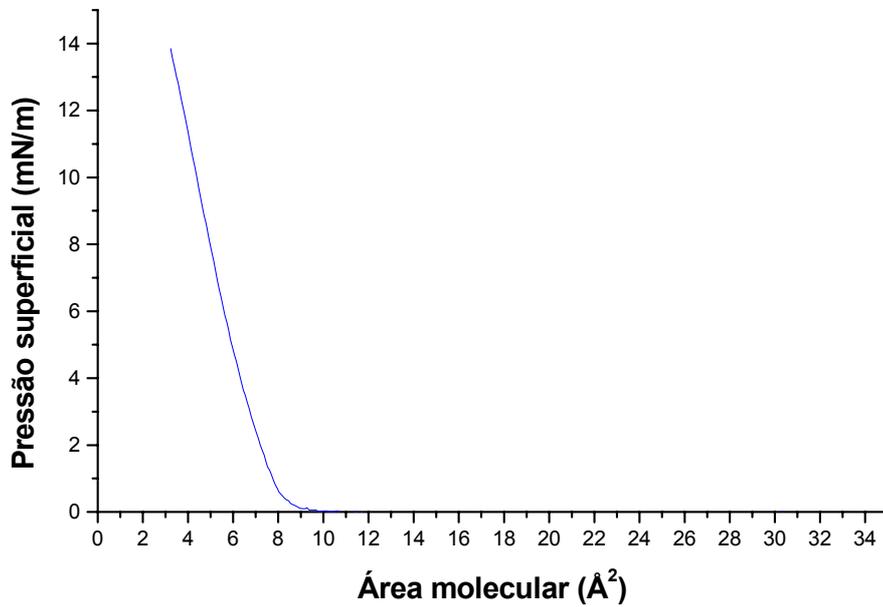


Figura 3: Isoterma de compressão (pressão superficial-área molecular) do ácido úsnico.

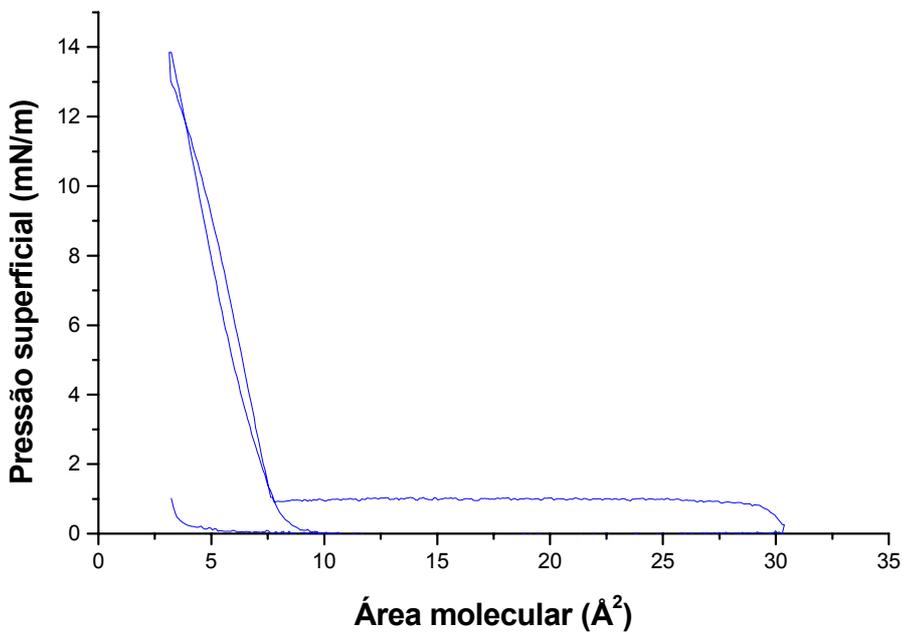


Figura 4: Isoterma de histeresis (pressão superficial-área molecular) do ácido úsnico.

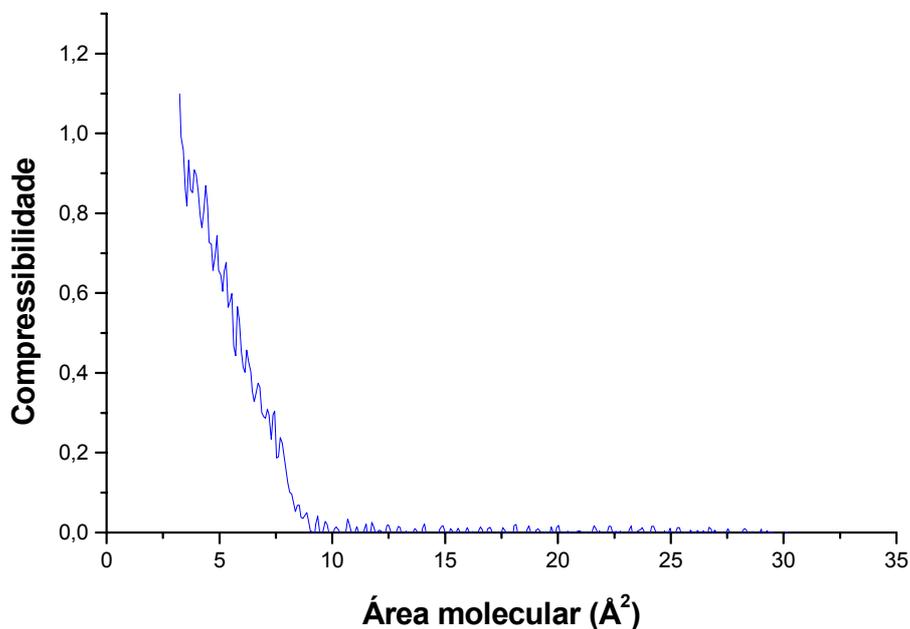


Figura 5: Isoterma compressibilidade (compressibilidade-área molecular) do ácido úsnico.

3.2. Análise de filmes mistos de fosfolipídeos

3.2.1. Influência da presença de DPPE em filmes de PC

Os filmes mistos PC-DPPE foram estudados nas proporções, em massa, de 1:1; 4:1 e 7:1. Em todas essas proporções, a análise das respectivas isotermas de compressão demonstrou que a presença de DPPE, nas proporções estudadas, não promove mudanças significativas nos valores de área molecular e de pressão superficial no colapso em comparação ao filme puro de PC que apresenta, no colapso, valores em torno de 48 mN/m e 65 Å²/mol. para pressão superficial e área molecular, respectivamente [14]. Desta forma, a estabilidade do filme de PC não sofreu alterações em decorrência da presença de DPPE, visto que não houve variações nos valores de pressão superficial dos filmes mistos de PC-DPPE em comparação ao filme puro de PC (Figura 5, tabela 1).

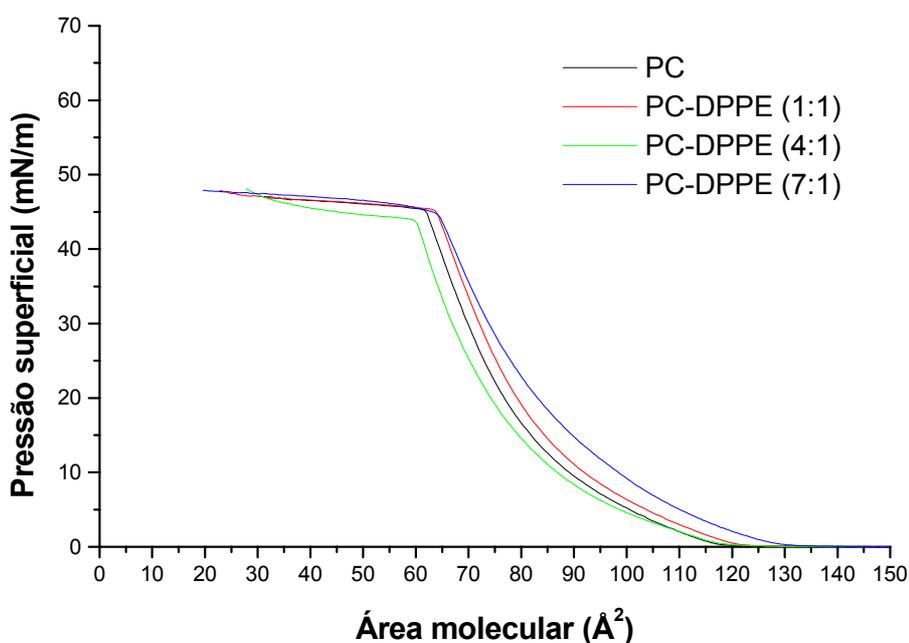


Figura 6: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de PC; PC-DPPE (1:1); PC-DPPE (4:1) e PC-DPPE (7:1).

Tabela 1: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de PC; PC-DPPE (1:1); PC-DPPE (4:1) e PC-DPPE (7:1).

FILMES	Área molecular (Å²/mol.)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular ($\Delta \text{Å}^2/\text{mol}$)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ ($\Delta \text{mN/m}$)
PC	64	45		
PC-DPPE (1:1)	64	45	0	0
PC-DPPE (4:1)	60	43,5	4	1,5
PC-DPPE (7:1)	62	45	2	0

3.2.2. Influência da presença de DPPE em filmes de DPPC

Considerando pressão superficial no colapso, a análise das isotermas de compressão dos filmes mistos DPPC-DPPE, nas proporções, em massa, de 1:1; 4:1 e 7:1, não

demonstrou mudanças em seus valores em comparação ao filme puro de DPPC. Apenas no filme misto DPPC-DPPE (4:1), foi verificado um pequeno aumento na pressão superficial alcançada pelo filme (60 mN/m) em comparação a pressão superficial do filme puro de DPPC (55 mN/m). No entanto, em termos de área molecular, acréscimos em seus valores de área molecular, em todas as proporções estudadas, foram observados, sofrendo um maior acréscimo de área molecular o filme misto DPPC-DPPE (4:1) que atingiu valores de área molecular em torno de 60 Å²/mol. em comparação com a área molecular do filme puro de DPPC que apresenta, no colapso, valores em torno de 55 mN/m e 32 Å²/mol. para pressão superficial e área molecular, respectivamente [15] (figura 6, tabela 2).

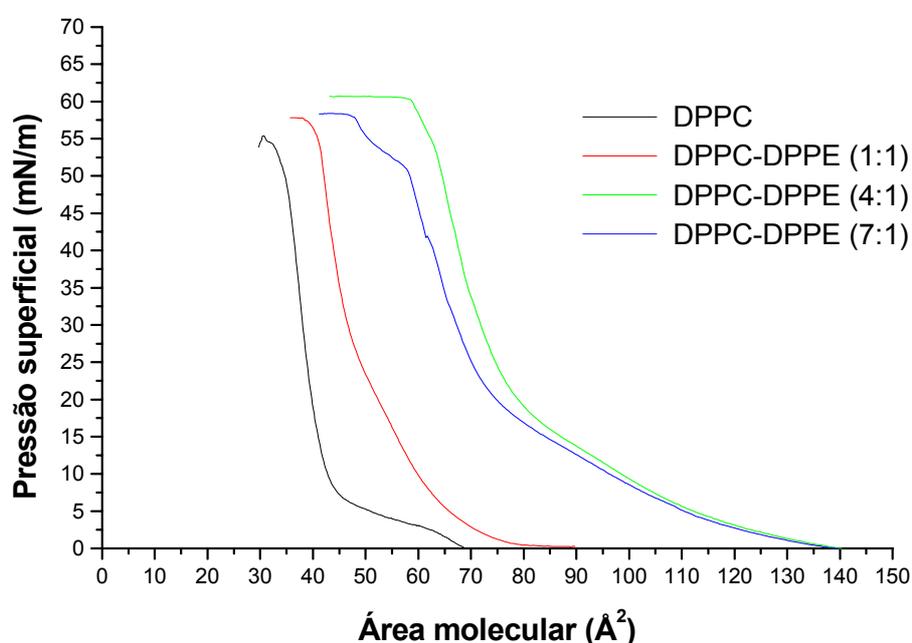


Figura 7: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPC; DPPC-DPPE (1:1); DPPC-DPPE (4:1) e DPPC-DPPE (7:1).

Tabela 2: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPC; DPPC-DPPE (1:1); DPPC-DPPE (4:1) e DPPC-DPPE (7:1).

FILMES	Área molecular (Å ² /mol.)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular (Δ Å ² /mol)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPC	32	55		
DPPC-DPPE (1:1)	40	57	8	2
DPPC-DPPE (4:1)	60	59	28	4
DPPC-DPPE (7:1)	49	57	17	2

3.3. Influência da presença de fosfolipídeos com carga em filmes de DPPE, DPPC e PC

3.3.1 Influência da presença de ácido fosfatídico (PA) ou estearilamina (SA) em filmes de DPPE

A análise das isotermas de compressão dos filmes mistos de DPPE-PA (1:1) e DPPE-SA (1:1) em comparação com a isoterma de DPPE demonstrou que há pequenas alterações nos valores de pressão superficial atingidos por estes filmes mistos no colapso em comparação ao filme puro de DPPE. Entretanto, ao nível de área molecular, estes filmes mistos apresentaram reduções, atingindo valores em torno de 32,5 Å²/mol. (DPPE-SA) e 17,5 Å²/mol. (DPPE-PA), em comparação ao filme puro de DPPE que apresenta, no colapso, valores em torno de 56 mN/m e 42 Å²/mol. para pressão superficial e área molecular, respectivamente [16]. O fenômeno de redução da área molecular do filme misto de DPPE-PA pode ser explicado por dessorção de moléculas de DPPE em função da presença de PA. Neste filme misto a redução da área molecular foi em torno de 23 Å²/mol. em comparação ao filme puro de DPPE. Nestes filmes, a presença de PA promove uma modificação no perfil da isoterma do filme DPPE-PA, onde há o surgimento de um pré-colapso em pressões superficiais superiores a 40 mN/m (figura 7, tabela 3).

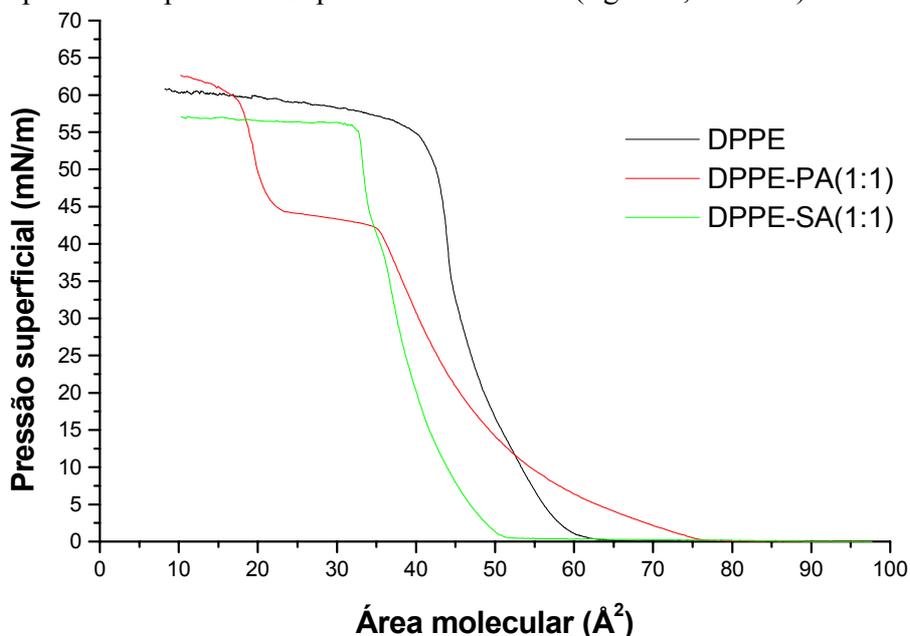


Figura 8: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPE; DPPE-PA (1:1) e DPPE-SA (1:1).

Tabela 3: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPE; DPPE-SA (1:1) e DPPE-PA (1:1).

FILMES	Área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular ($\Delta \text{\AA}^2/\text{mol}$)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPE	40,8	56		
DPPE-SA	32,5	56	8,3	0
DPPE-PA	17,5	59	23,3	3

3.3.2. Influência da presença de ácido fosfatídico (PA) ou estearilamina (SA) em filmes de DPPC

A análise das isotermas de compressão dos filmes mistos de DPPC-PA (1:1) e DPPC-SA (1:1) em comparação à isoterma do DPPC demonstra que não há alterações significativas nos valores das áreas moleculares atingidas por estes filmes mistos em comparação ao filme puro de DPPC no colapso. Entretanto, ambos os filmes mistos apresentaram semelhante acréscimo a nível de pressão superficial, atingindo valores em torno de 63 mN/m (DPPC-SA) e 62,8 mN/m (DPPC-PA), em comparação ao filme puro de DPPC (55 mN/m). Com base neste incremento de pressão superficial, observado nos filmes mistos, a presença de carga, tanto negativa (PA) quanto positiva (SA), contribui para um aumento na estabilidade, por aumento da resistência mecânica, dos filmes mistos DPPC-PA e DPPC-SA. A presença de cargas promoveu mudanças no perfil da isoterma do filme de DPPC (Figura 5). Tais mudanças foram mais significativas no filme DPPC-PA, principalmente na fase correspondente ao estado líquido expandido deste filme. De forma semelhante ao que ocorreu no filme DPPE-PA, a presença de um pré-colapso é também observado no filme de DPPC-PA em pressões superiores a 40 mN/m, porém este pré-colapso é menos intenso que o observado no filme misto DPPE-PA (Figura 8, tabela 4).

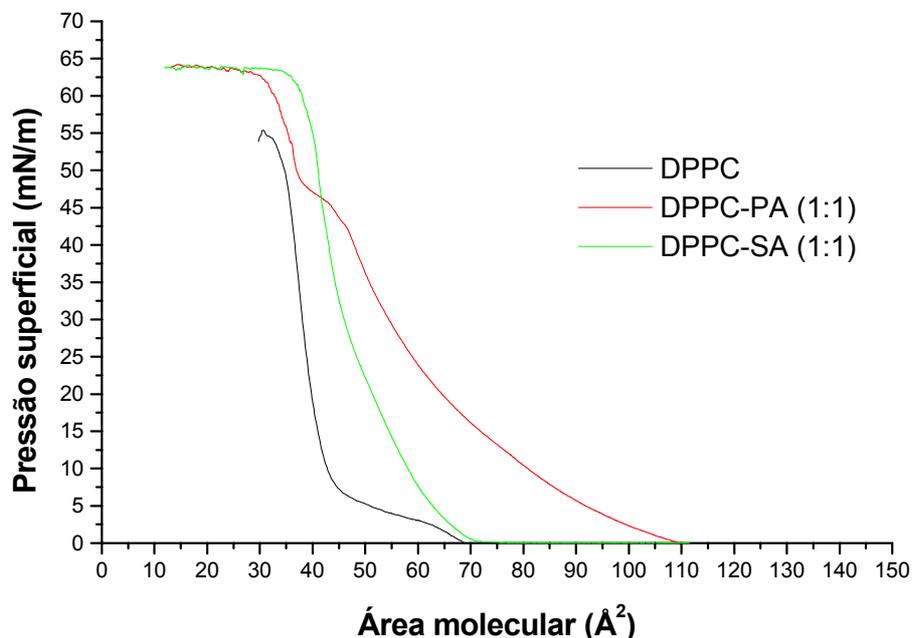


Figura 9: Isotermas de compressão pressão superficial-área molecular dos filmes de DPPC; DPPC-PA (1:1) e DPPC-SA (1:1).

Tabela 4: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPC; DPPC-SA (1:1) e DPPC-PA (1:1).

FILMES	Área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$)	Pressão de colapso π (mN/m)	Variação da Área molecular ($\Delta \text{\AA}^2/\text{mol}$)	Variação da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPC	32	55		
DPPC-SA	35,4	63	3,4	8
DPPC-PA	30,8	62,6	1,2	7,4

3.3.3. Influência da presença de ácido fosfatídico (PA) ou estearilamina (SA) em filmes de PC

A análise das isotermas de compressão dos filmes mistos de PC-PA (1:1) e PC-SA (1:1) em comparação à isoterma de PC demonstra que não há alterações significativas nos valores de pressão superficial atingidas por estes filmes mistos em comparação ao filme puro de PC no colapso. Em termos de área molecular, o filme misto PC-SA não apresentou

redução significativa em comparação ao filme puro de PC. Entretanto, o filme misto PC-PA apresentou redução significativa em seu valor de área molecular, atingindo valores em torno de 28 Å²/mol. em comparação ao filme puro de PC (62 Å²/mol.). Com base na redução mencionada acima, em torno de 34 Å²/mol., ocorre dessorção de moléculas de PC em função da presença de PA. Portanto, uma interação mais favorável foi verificada nos filmes mistos PC-SA em comparação com o filme misto PC-PA (Figura 9, tabela 5).

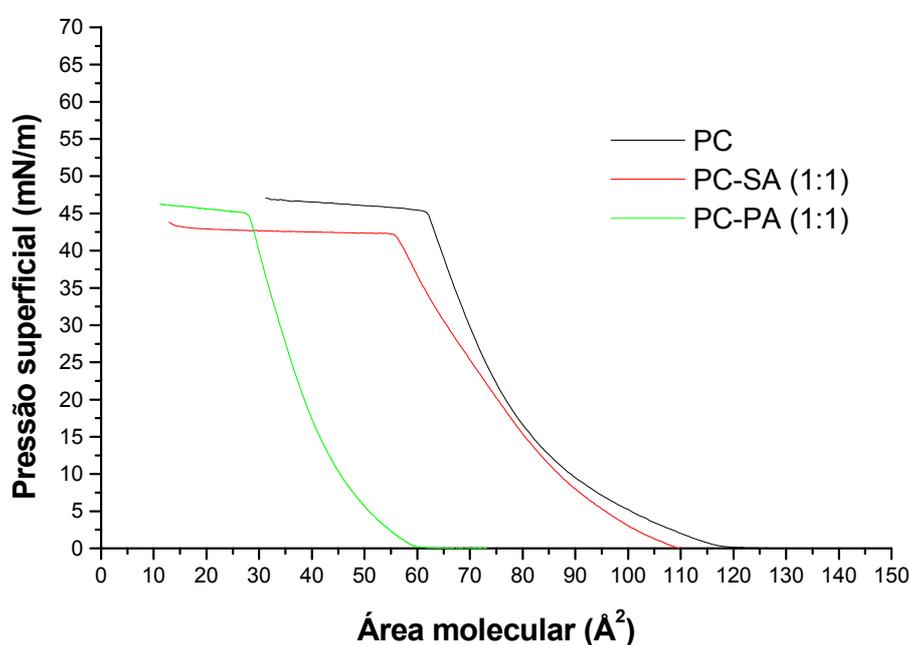


Figura 10: Isotermas de compressão pressão superficial-área molecular dos filmes de PC; PC-PA (1:1) e PC-SA (1:1).

Tabela 5: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de PC; PC-SA (1:1) e PC-PA (1:1).

FILMES	Área molecular (Å ² /mol.)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular (Δ Å ² /mol)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
PC	62,5	45		
PC-SA	56	42,5	6,5	2,5
PC-PA	28	45	34,5	0

3.4. Estudo da adsorção do ácido úsnico em filmes de fosfolipídeos

3.4.1. Influência da presença de ácido úsnico em filmes de DPPE

Em ambas as proporções estudadas, DPPE-UA 4:1 e 7:1, o ácido úsnico interagiu com o filme de DPPE, promovendo a dessorção de moléculas de DPPE. Este fenômeno pode ser uma explicação para a redução significativa da área molecular em ambos os filmes mistos de DPPE-UA, onde os valores de área molecular ficaram em torno de $16,5 \text{ \AA}^2/\text{mol}$. para ambos os filmes mistos de DPPE-UA, em comparação à área molecular do filme puro de DPPE ($40,8 \text{ \AA}^2/\text{mol}$).

Embora tenha ocorrido perda significativa de DPPE para a sub-fase, os valores de pressão superficial, em ambos os nos filmes mistos de DPPE-UA, não sofreram alterações significativas, nas proporções estudadas, em comparação aos valores de pressão superficial atingidas pelo filme puro de DPPE no colapso. Este fenômeno pode ser explicado pela permanência, na superfície, de moléculas de DPPE livres de interações com Ácido úsnico formando um filme que comporta-se de maneira semelhante ao filme puro de DPPE (Figura 10, tabela 6).

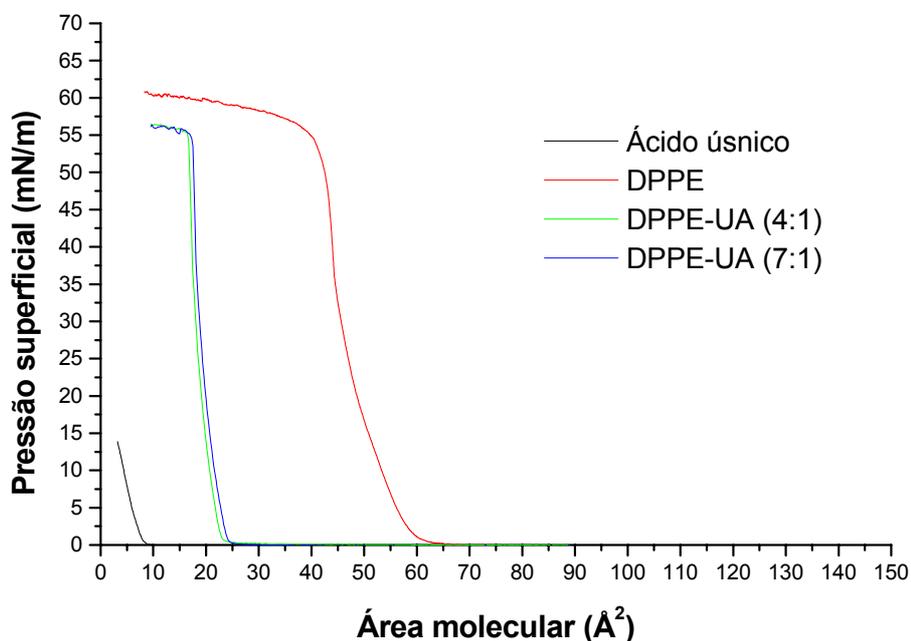


Figura 11: Isoterma de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de ácido úsnico, DPPE, DPPE-UA (4:1) e DPPE-UA (7:1).

Tabela 6: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPE; DPPE-UA (4:1) e UA (7:1).

FILMES	Área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular ($\Delta \text{\AA}^2/\text{mol}$)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPE	40,8	56		
DPPE-UA (4;1)	16,5	55	24,5	1
DPPE-UA (7;1)	16,5	55	24,3	1

3.4.2 Influência da presença de ácido úsnico em filmes de DPPC

Em ambas as proporções estudadas, DPPC-UA 4:1 e 7:1, o ácido úsnico interagiu com o filme de DPPC de tal forma que um acréscimo nos valores de pressão superficial pôde ser evidenciado em ambas as proporções. Este acréscimo ocorreu de forma diretamente proporcional a quantidade de ácido úsnico presente nos filmes: o filme misto DPPC-UA (7:1) atingiu valores de pressão superficial em torno de 63,5 mN/m, enquanto que o filme misto DPPC-UA (4:1) atingiu valores de pressão superficial em torno de 68,5 mN/m, em comparação com o filme puro de DPPC que apresentou valores em torno de 55 mN/m. Esses resultados indicam que a presença de ácido úsnico contribui para aumentar a resistência mecânica dos filmes puros de DPPC. Em termos de área molecular, ambos os filmes mistos de DPPC-UA apresentaram valores em torno de $32 \text{\AA}^2/\text{mol.}$, coincidindo com os valores de área molecular do filme puro de DPPC ($32 \text{\AA}^2/\text{mol.}$) (Figura 11, tabela 7).

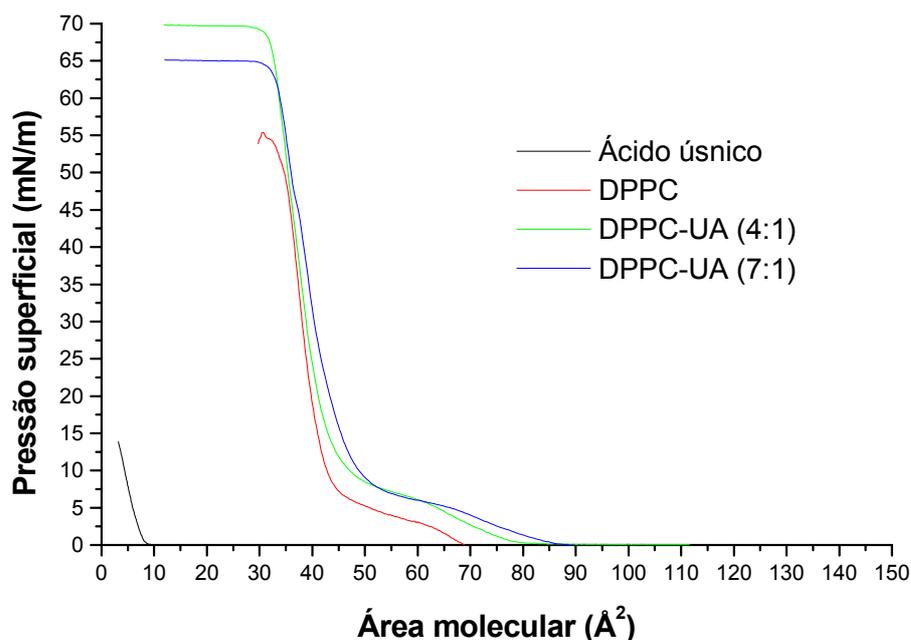


Figura 12: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de ácido úsnico, DPPC, DPPC-UA (4:1) e DPPC-UA (7:1).

Tabela 7: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPC; DPPC-UA (4:1) e DPPC-UA (7:1).

FILMES	Área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular ($\Delta \text{\AA}^2/\text{mol}$)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPC	32	55		
DPPC-UA (4;1)	32	68,5	0	13,5
DPPC-UA (7;1)	32	63,5	0	8,5

3.4.3. Influência da presença de ácido úsnico em filmes de PC

Em ambas as proporções estudadas, PC-UA 4:1 e 7:1, o ácido úsnico interagiu com o filme de PC de forma a promover a desorção de PC em quantidades diretamente proporcionais às quantidades de ácido úsnico utilizadas nos filmes. Este fenômeno pode ser uma explicação para a redução significativa da área molecular em ambos os filmes mistos de PC-UA, onde os valores de área molecular ficaram em torno de $37,5 \text{\AA}^2/\text{mol.}$ para o filme misto PC-UA (7:1) e $40 \text{\AA}^2/\text{mol}$ para o filme misto PC-UA (4:1) em comparação à área molecular do filme puro de PC ($62,5 \text{\AA}^2/\text{mol.}$).

A análise das isotermas de compressão dos filmes mistos de PC-UA demonstram a ocorrência de reduções, também diretamente proporcionais às quantidades de ácido úsnico presente nos filmes, nos valores de pressão superficial em ambos os filmes mistos em comparação ao filme puro de PC. Os filmes mistos PC-UA apresentaram valores de pressão superficial em torno de $38,8 \text{ mN/m}$ (PC-UA, 7:1) e 24 mN/m (PC-UA, 4:1) em comparação ao filme puro de PC ($62,5 \text{ mN/m}$). Com base nos valores acima, o ácido úsnico contribui negativamente para a estabilidade dos filmes de PC, pois ambos os filmes mistos apresentaram perdas significativas de resistência mecânica, diretamente proporcional a quantidade de ácido úsnico presente, em comparação a resistências mecânicas do filme puro de PC (Figura 12, tabela 8).

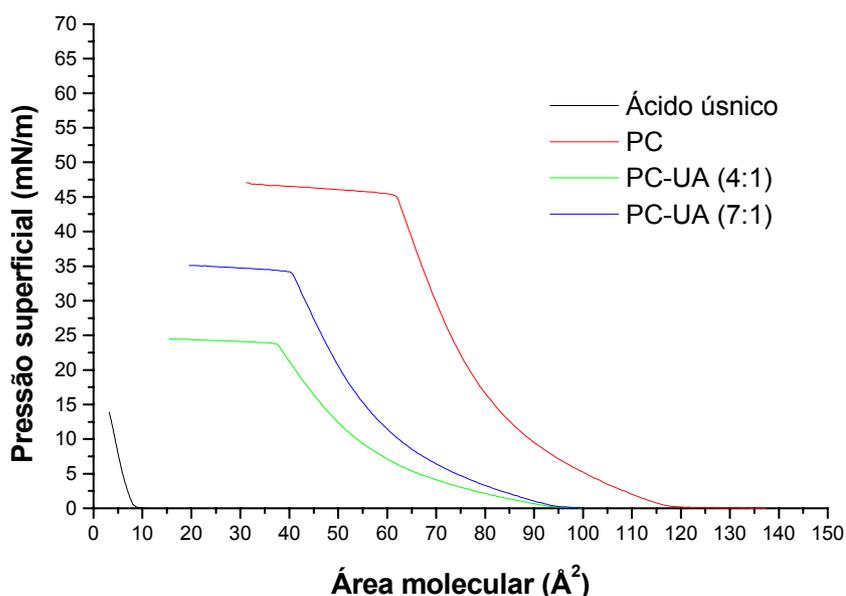


Figura 13: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de ácido úsnico, PC, PC-UA (4:1) e PC-UA (7:1).

Tabela 8: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de PC; PC-UA (4:1) e PC-UA (7:1).

FILMES	Área molecular (Å²/mol.)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular (Δ Å²/mol)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
PC	62,5	45		
PC-Ác. Úsnico (4;1)	37,5	24	25	21
PC- Ác. Úsnico (7;1)	40	38,8	22,5	6,2

3.5. Influência da presença de ácido úsnico em filmes mistos com carga positiva

3.5.1. Influência da presença de ácido úsnico em filmes mistos de PC-DPPE-SA

A análise da isoterma de compressão do filme de PC-DPPE-SA-UA demonstrou não haver mudanças nos valores de pressão superficial e de área molecular em comparação aos valores de pressão superficial e de área molecular do filme de PC-DPPE-SA. Em ambos os filmes, foi verificado a presença de um pré-colapso em valores de pressão superficial superiores a 40 mN/m, provavelmente este pré-colapso é decorrente não da presença de Ácido úsnico, mas sim da presença de SA, visto que o mesmo é observado tanto no filme com Ácido úsnico quanto no filme sem Ácido úsnico (Figura 13, tabela 9).

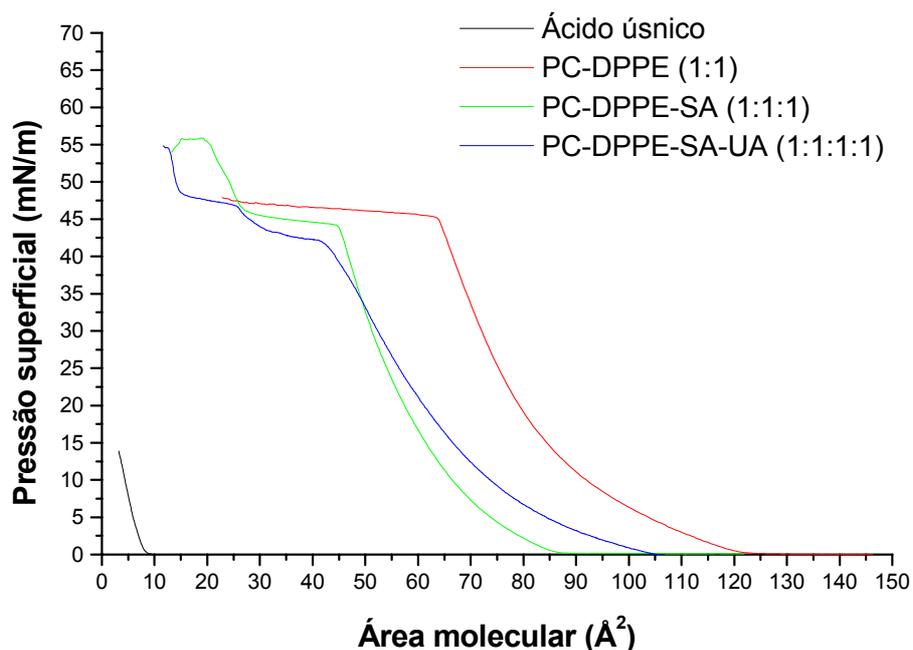


Figura 14: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de ácido úsnico, PC-DPPE-UA (1:1:1) e PC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).

Tabela 9: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de PC-DPPE-SA (1:1:1) e PC-DPPE-SA-UA (1:1:1).

FILMES	Área molecular (Å ² /mol.)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular (Δ Å ² /mol)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
PC-DPPE-SA (1:1:1)	20	55,5		
PC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1)	14	54,8	6	0,7

3.5.2. Influência da presença de ácido úsnico em filmes mistos de DPPC-DPPE-SA

A isoterma de compressão do filme de DPPC-DPPE-SA-UA apresentou mudanças em seu perfil em comparação ao perfil da isoterma de compressão do filme de DPPC-DPPE-SA (figura 14, tabela 10). Ao nível de pressão superficial, não houve mudança nos valores atingidos pelo filme de DPPC-DPPE-SA-UA em comparação ao filme de DPPC-DPPE-SA. Em termos de área molecular, houve uma redução da área molecular do filme de DPPC-DPPE-SA-UA, a qual atingiu valores em torno de 30 Å²/mol., em comparação ao filme de DPPC-DPPE-SA (55 Å²/mol.). Correlacionando esta redução da área molecular com os resultados obtidos das isotermas de compressão dos filmes mistos DPPE-UA

(Figura 10), onde ocorreu dessorção de DPPE, e DPPC-UA (Figura 11), onde ocorreu adsorção de ácido úsnico, portanto o ácido úsnico promove a dessorção de DPPE, mesmo quando este se encontra em filmes mistos com o DPPC.

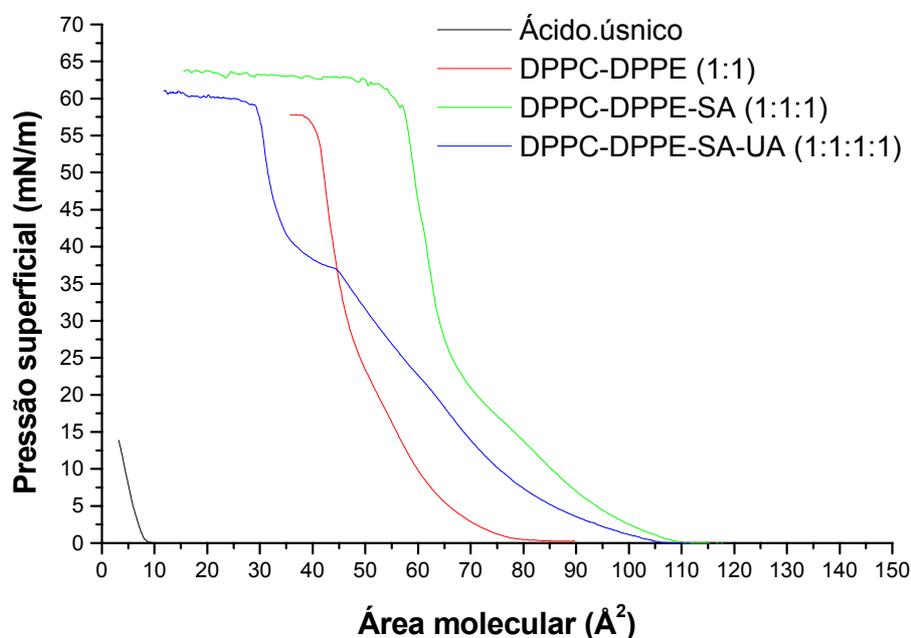


Figura 15: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de Ácido úsnico, DPPC-DPPE-SA (1:1:1) e DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).

Tabela 10: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPC-DPPE-SA (1:1:1) e DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).

FILMES	Área molecular (Å ² /mol.)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular (Δ Å ² /mol)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPC-DPPE-SA (1:1:1)	55	64		
DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1)	30	59	25	5

3.6. Influência da presença de ácido úsnico em filmes mistos com carga negativa

3.6.1. Influência da presença de ácido úsnico em filmes mistos de PC-DPPE-PA

A análise da isoterma de compressão do filme de PC-DPPE-PA-UA não demonstrou variação em seu perfil em comparação ao perfil da isoterma de compressão do filme de PC-DPPE-PA. A nível de pressão superficial, não houve mudança significativa nos valores atingidos pelo filme de PC-DPPE-PA-UA em comparação ao filme de PC-DPPE-PA. Em termos de área molecular, houve uma considerável redução da área molecular do filme de PC-DPPE-PA-UA, que atingiu valores em torno de $41 \text{ \AA}^2/\text{mol.}$, em comparação ao filme de PC-DPPE-PA ($51 \text{ \AA}^2/\text{mol.}$) (figura 15, tabela 11). Correlacionando esta redução da área molecular com os resultados obtidos das isotermas de compressão dos filmes mistos DPPE-UA (Figura 10) e PC-UA (Figura 12), onde a presença de ácido úsnico levou a dessorção tanto do DPPE quanto do PC, conclui-se, portanto, que o ácido úsnico promove a dessorção de DPPE e de PC, mesmo quando estes se encontram em filmes mistos PC-DPPE

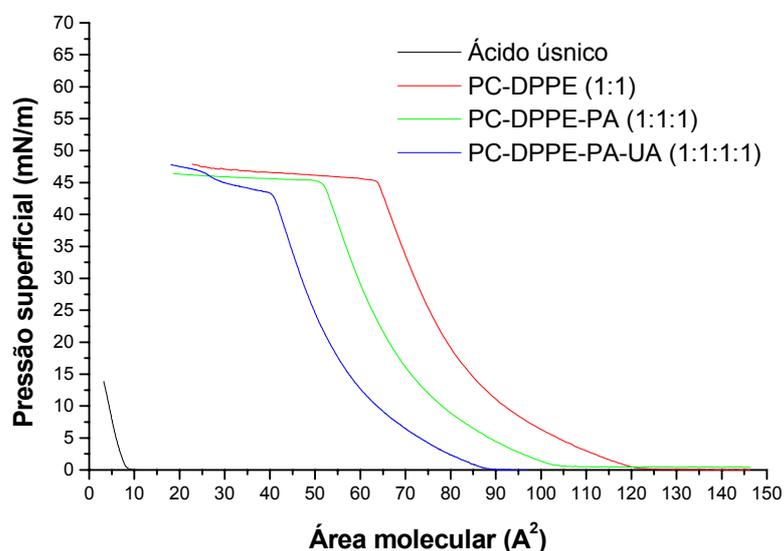


Figura 16: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de ácido úsnico, PC-DPPE (1:1), PC-DPPE-PA (1:1:1) e PC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1).

Tabela 11: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de PC-DPPE-PA (1:1:1) e PC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1).

FILMES	Área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular ($\Delta \text{\AA}^2/\text{mol}$)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
PC-DPPE-PA (1:1:1)	51	45		
PC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1)	41	42,5	10	2,5

3.6.2. Influência da presença de ácido úsnico em filmes mistos de PC-DPPE-PA

A análise da isoterma de compressão do filme de DPPC-DPPE-PA-UA apresentou uma pequena variação em seu perfil em comparação ao perfil da isoterma de compressão do filme de DPPC-DPPE-PA (figura 16, tabela 12). A nível de pressão superficial, o filme de DPPC-DPPE-PA-UA atingiu valores em torno de 62 mN/m em comparação ao filme de DPPC-DPPE-PA (50 mN/m). Em termos de área molecular, houve uma redução da área molecular do filme de DPPC-DPPE-PA-UA, que atingiu valores em torno de 25 $\text{\AA}^2/\text{mol.}$, em comparação ao filme de DPPC-DPPE-PA (36 $\text{\AA}^2/\text{mol.}$).

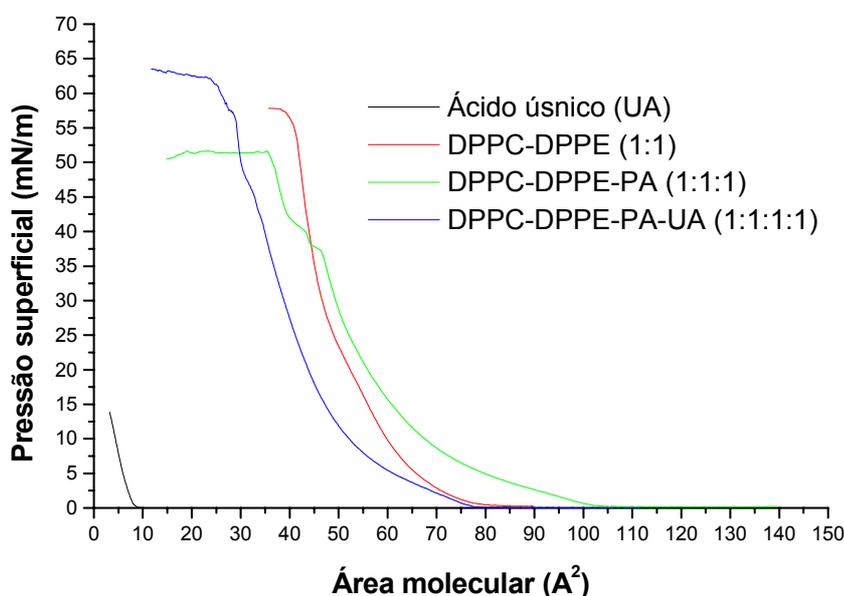


Figura 17: Isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de ácido úsnico, DPPC-DPPE-PA (1:1:1:1) e DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1).

Tabela 12: Parâmetros das isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) dos filmes de DPPC-DPPE-PA e DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1)

FILMES	Área molecular ($\text{\AA}^2/\text{mol.}$)	Pressão de colapso π (mN/m)	Varição da Área molecular ($\Delta \text{\AA}^2/\text{mol}$)	Varição da Pressão colapso $\Delta\pi$ (Δ mN/m)
DPPC-DPPE-PA (1:1:1)	36	50		
DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1)	25	62	11	12

Uma correlação entre as isotermas de compressão (pressão superficial-área molecular) de todos os filmes estudados foi realizada na tentativa de se conhecer qual desses filmes apresenta uma organização estrutural ao nível de superfície mais compatível com os sistemas estruturais existentes nos mecanismos de liberação controlada de fármacos, mais especificamente, nos lipossomas.

De acordo com todos os resultados obtidos, o DPPC demonstra ser mais eficiente em termos de interações com o ácido úsnico, sendo, portanto, este fosfolipídeo o mais indicado, dentre os aqui estudados, para ser o constituinte predominante em sistemas lipossomais contendo ácido úsnico.

4. Conclusões

- O ácido úsnico puro não forma filmes organizados.
- O ácido úsnico, nos filmes de DPPE-UA (4:1) e DPPE-UA (7:1), promove semelhante dessorção de moléculas de DPPE, em comparação com o filme puro de DPPE.
- Nos filmes de PC-UA (4:1) e PC-UA (7:1), ocorreu dessorção de moléculas de PC de forma diretamente proporcional a quantidade de ácido úsnico presente nestes filmes, em comparação ao filme puro de PC.
- Nos filmes de DPPC-UA (4:1) e DPPC-UA (7:1), ocorreu acréscimos de pressão superficial diretamente proporcionais a quantidade de ácido úsnico presente nestes filmes, em comparação com o filme puro de DPPC.
- O filme misto de DPPC-DPPE-PA (1:1:1) interage melhor com ácido úsnico do que o filme misto de DPPC-DPPE-SA (1:1:1).
- O filme misto DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1) é mais estável, em termos de resistência mecânica, que o filme misto de DPPC-DPPE-SA-UA (1:1:1:1).
- No filme misto DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1) ocorre maior adsorção de ácido úsnico do que no filme misto de DPPC-DPPE-PA-UA (1:1:1:1).

Referências

- [1] K. Muller Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 9-16, 2001.
- [2] K. Ingólfssdóttir, *Phytochemistry* 61:729-736 2002.
- [3] M. Cardarelli, G. Serino, L. Campanella, P. Ercole, F. O. Alesiani, F. Rossiello, *Cel. Mol. Life Sci.*, 53(8) 667-672, 1997.
- [4] M. Takai, Y. Uehara, J.A. Beisler, Usnic Acid Derivatives as Potential Antineoplastic Agents. *J. Med. Chem.* 22(11): 1380-1384, 1979.
- [5] Y. Yamamoto, Y. Kinoshita, H. Matsubara, K. Kinoshita, K. Koyama, K. Takahashi, T. Kurokawa, I. Yoshimura, Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. *Recent Res. Develop. Phytochem.* 2:23-33. 1998.
- [6] L. Campanella, M. Delfini, P. Ercole, A. Iacoangeli, G. Risuleo, *Biochemistry*, 84: 329-334, 2002.
- [7] J.I. Kroschwitz, *Electrical and Electronic Properties of Polymers: A State-of-the-Art Compendium* (John Wiley & Sons, New York, 1900).
- [8] J.G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Interscience, New York, 1990.
- [9] T. Miyasaka, T. Watanabe, A. Fujishima, K. Honda, *Am. Chem. Soc.* 100, 6657-61, 1978.
- [10] G. Ponchel, *Irache, J. Adv. Drug Deli. Rev.* 34 (1998) 191-219.
- [11] F. Dalençon, V. Rosilio, A. Baszkin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15 195-201, 1999.
- [12] C.P. Melo, M.I. Mosquera-sáchez, *Langmuir* 14 490-496, 1998
- [13] M. Cocchietto, N. Skert, P.L. Nimis, A review on usnic acid, an interesting natural compound. *N. Naturwissenschaften*, 89:137-149, 2002.
- [14] S. Daewon, N. J. Kim, Y. Choi, H. Y. Bull. *Korean Chem. Soc.* 24, 3, 2003.
- [15] A. W. Neumann, H. Mohwald, R. Miller, D. Y. Kwok, D. Vollhardt, J. Li, R. M. Prokop, A. Jyoti. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 116, 173-180, 1996
- [16] R. Linton, V. Guarisco, J. J. Lee, B. Hagenhoff, A. Benninghoven. *Thin solids films*, 210-211, 565-570, 1992.