

1. Introdução

1.1. Aerossóis Atmosféricos

O termo aerossol foi criado durante a Primeira Guerra Mundial pelo Físico-Químico Frederick George Donnan. De acordo com Schumauss (1920), os aerossóis atmosféricos podiam ser definidos como suspensões relativamente estáveis de partículas sólidas ou gotículas dispersas em um gás com dimensões inferiores a 100 μm (Tabela 1), mas com tamanhos superiores aos das moléculas individualizadas (Renoux e Boulaud, 1998) *apud* (Alves, 2005).

Tabela 1. Características de gases, aerossóis e partículas de hidrometeoros¹ para típicas condições de baixa troposfera. Adaptado de (Jacobson, 2002).

	Diâmetro típico (μm)	Concentração em massa ($\mu\text{g m}^{-3}$)
Moléculas de gás	0.0005	1.2×10^9
Partículas de aerossóis		
Pequenas	<0.2	<1
Médias	0.2-2.0	<250
Grandes	>2.0	<250
Partículas de hidrometeoros		
Gotas de chuva	10-200	10^4 - 10^7

Um aerossol é um conjunto de sólidos, líquidos ou partículas de fase mista em suspensão no ar, enquanto partícula de aerossol é uma unidade de partícula líquida, sólida ou de fase mista, entre um conjunto de partículas suspensas (Jacobson, 2002) e que participam de diversos fenômenos naturais, desde

¹ Hidrometeoros são meteoros aquosos, que podem se apresentar sob a forma de depósito ou de precipitação, como orvalho, geada, chuva, chuvisco, neve e granizo.

formação de nuvens, precipitação, até balanço radiativo, visibilidade, trocas entre oceano e atmosfera e modificações na camada de ozônio (Alves, 2005).

Podemos considerar como aerossóis atmosféricos poeiras, fumos, cinzas, nevoeiros e *sprays*, que são os principais poluentes monitorados em estudos da qualidade do ar, devido à sua abundância na atmosfera. Além da determinação qualitativa e quantitativa dos componentes dos aerossóis atmosféricos, é necessário estudar suas propriedades físico-químicas. Porém, devido à complexidade dos aerossóis, há grande dificuldade em produzi-los em condições laboratoriais.

Os aerossóis naturais são misturas de materiais provenientes de várias fontes, altamente heterogêneas em relação à composição química e propriedades físicas, dificultando sua caracterização (Alves, 2005). Em relação à composição química, pode-se dizer que os aerossóis atmosféricos são formados basicamente de sulfatos, sal marinho, poeira mineral e partículas carbonosas, as quais podem ser divididas em biogênica primária, produto de combustão ou compostos orgânicos secundários (Forster *et al.*, 2007; Pósfai e Buseck, 2010).

A classificação dos aerossóis atmosféricos, atualmente, diz respeito à sua origem e aos processos de formação, pois uma classificação de acordo com qualquer composição ou fonte torna-se muito arbitrária (Pósfai e Buseck, 2010). Assim, as partículas primárias são de origem natural ou antropogênicas (Griffith *et al.*, 2013), como os processos de combustão, as erupções vulcânicas, *spray* marinho etc e as secundárias, resultantes de mecanismos de nucleação e condensação de produtos gasosos.

Partículas de aerossóis na troposfera influenciam o clima na Terra, tanto direta quanto indiretamente, por vários mecanismos (Buseck e Pósfai, 1999; Kristensson *et al.*, 2010; Griffith e Vaida, 2013). Sendo importantes nos processos climáticos, os aerossóis atmosféricos possuem a capacidade de conduzir a formação de gotículas de chuva, agindo como núcleos de condensação de chuva (NCC) (Figura 1). Os NCC são partículas que, na presença de vapor supersaturado de água, se ativam para se tornarem nuvens e gotas de neblina (Sun e Ariya, 2006).

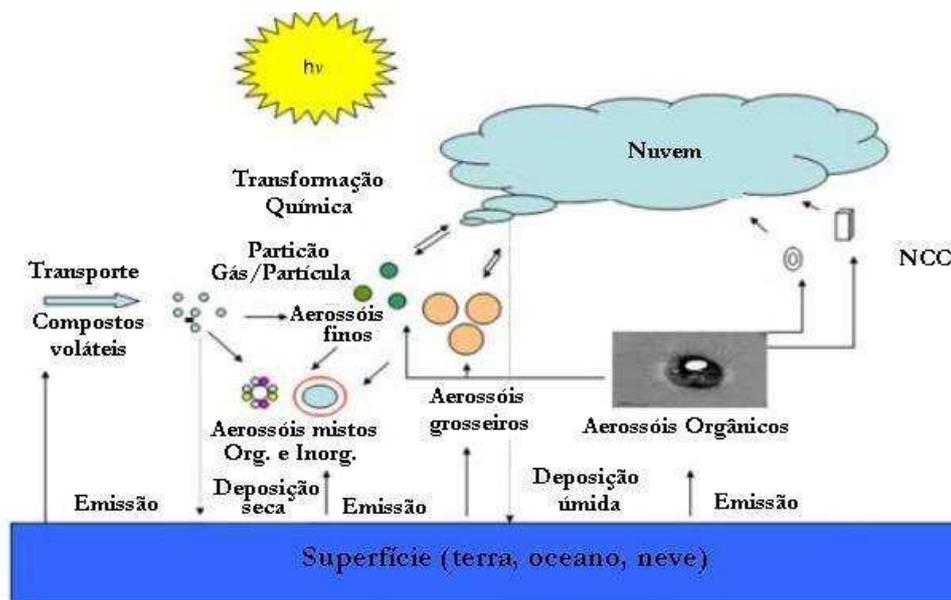


Figura 1. Esquema de formação dos núcleos de condensação de chuva (NCC). Adaptado de (Sun e Ariya, 2006).

Nesse contexto, é importante definir uma fração considerável do material orgânico particulado encontrado na atmosfera, chamada de carbono orgânico solúvel em água (Frka *et al.*, 2012), que inclui os aminoácidos e compostos orgânicos. Um estudo de Kristensson *et al.* (2010) mostrou que, em geral, as partículas contendo aminoácidos e alguns compostos orgânicos (Griffith *et al.*, 2013) em fração relevante na atmosfera são bons núcleos de condensação de chuva. Em geral, a capacidade de uma partícula ativar e agir como um NCC (e, em seguida como uma gota de chuva) depende de sua composição química e de suas propriedades físicas.

As nuvens desempenham um papel importante na incidência da radiação na Terra, através da absorção de radiação infravermelha terrestre e da reflexão da irradiação solar (Sun e Ariya, 2006). Entretanto, algumas variações no albedo da nuvem podem modificar significativamente o albedo do planeta e, assim, afetar o clima global (Lee *et al.*, 1997).

A morfologia das partículas de aerossóis atmosféricos pode influenciar suas propriedades óticas e sua habilidade de formar gotículas de chuva, modificando sua capacidade de captação e evaporação de água. A necessidade de compreender os aerossóis marinhos e continentais levou os pesquisadores a desenvolverem modelos que representassem a superfície de oceanos, lagos e partículas de aerossóis atmosféricos. Devido à complexidade e diversidade de

composição dos aerossóis, têm sido desenvolvidos experimentos com filmes mistos de Langmuir, a fim de representar as misturas de fases hidrofóbicas e hidrofílicas presentes nessas partículas.

Os aerossóis aquosos, como os marinhos e continentais, têm sido propostos como uma estrutura de micela invertida com um núcleo aquoso rodeado de camadas de compostos orgânicos (Griffith *et al.*, 2012). Reid *et al.* (2011) propuseram que alguns compostos orgânicos poderiam agir como surfactantes. Nessa dissertação, foram estudados filmes mistos formados por um surfactante de baixa solubilidade em água (ácido esteárico) e aminoácidos, pois alguns deles também possuem ação na superfície, buscando compreender a mudança na pressão de superfície e no potencial de superfície na presença dos mesmos.

O ácido esteárico foi escolhido por ser um dos principais surfactantes encontrados nos aerossóis atmosféricos, capaz de formar uma monocamada flutuante, devido à sua baixa solubilidade em água (3 mg L^{-1} , a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), além de ter a capacidade de dificultar a transferência de água para dentro e para fora da partícula, afetando o crescimento do aerossol. Isotermas de ciclos de compressão - expansão podem ser usadas como um modelo da dinâmica complexa na superfície do oceano e de processos que partículas de aerossol sofrem ao longo do tempo de vida na atmosfera (Griffith *et al.*, 2012).

Todos os aminoácidos estudados nessa dissertação são aminoácidos essenciais, ou seja, necessários para o bom funcionamento do nosso organismo, porém, este não é capaz de sintetizá-los. Além disso, são encontrados em aerossóis atmosféricos (Kristensson *et al.*, 2010; Scalabrin *et al.*, 2012; Barbaro *et al.*, 2014). Os principais aminoácidos que constituem as proteínas nos seres vivos são normalmente encontrados em pequenas concentrações nos compartimentos ambientais, devido à sua rápida absorção pelos organismos (Milne e Zika, 1993). Em geral, os aerossóis continentais possuem concentrações mais elevadas de aminoácidos, quando comparados aos aerossóis marinhos. Este fato ocorre devido a presença de um número maior de fontes de aminoácidos provenientes de fontes como pólen, esporos, matéria vegetal, bactérias e leveduras (Matsumoto e Uematsu, 2005).

O transporte de longa distância de material particulado, a partir de fontes continentais de aminoácidos, pode contribuir significativamente para o

enriquecimento destes compostos nos aerossóis marinhos (Yamashita e Tanoue, 2003). Em um estudo de Coury e Dillner (2008), aminoácidos foram quantificados em aerossóis da cidade de Phoenix, Estado do Arizona (EUA), e as concentrações encontradas estavam abaixo da concentração de $0,01 \mu\text{g m}^{-3}$ em amostras de aerossóis das áreas rural e urbana. Em estudos de filmes de Langmuir contendo aminoácidos, utiliza-se uma concentração acima da concentração dos mesmos na atmosfera, de forma a viabilizar os experimentos, sendo que estes são apenas modelos das interações físico-químicas que ocorre em aerossóis.

1.2. Surfactantes

Surfactantes (do inglês, *surface active agents*) são moléculas anfífilas, ou seja, constituídas por uma parte hidrofílica e outra parte apolar hidrofóbica (Figura 2), que diminuem a tensão superficial de um líquido, a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis, ou a tensão interfacial entre um líquido e um sólido. Além disso, os surfactantes tendem a se acumular na interface, apresentando atividade na superfície (Pavinatto, 2010). As moléculas anfífilas tendem a se acumular na interface devido ao ganho de energia do sistema que ocorre em consequência da manutenção do grupo hidrofóbico no exterior da solução (Myers, 1998).

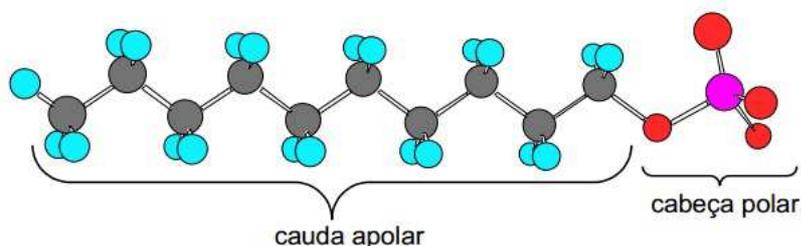


Figura 2. Representação estrutural de um surfactante e suas regiões com diferentes polaridades.
Fonte: (Tondo *et al.*, 2010).

No caso dos filmes de Langmuir, a parte hidrofóbica diminui a solubilidade das moléculas na subfase aquosa e a parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento do filme na superfície da água, devido à sua maior interação com a subfase aquosa (Ferreira *et al.*, 2005).

Em geral, os filmes de Langmuir são formados a partir de moléculas anfifílicas, como a molécula de ácido esteárico (Figura 3), entretanto já são conhecidos estudos em que são utilizadas moléculas semi-anfifílicas e não-anfifílicas (Dynarowicz-Latka *et al.*, 2001). Para formar um filme de Langmuir, é preciso que a cadeia carbônica da substância utilizada na monocamada seja grande o suficiente (possuindo mais que 12 carbonos) para formar uma camada insolúvel.

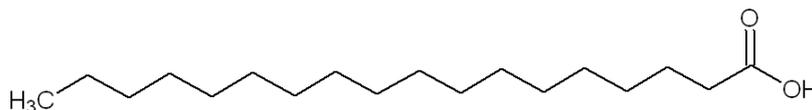


Figura 3. Representação estrutural do ácido esteárico, um surfactante utilizado em filmes de Langmuir.

De acordo com as características da “cabeça” polar dos surfactantes, eles podem ser classificados como: aniônicos, catiônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (Daltin, 2011), como será detalhado a seguir:

- *Aniônicos*: quando um sal de ácido carboxílico entra em contato com a água, o contraíon positivo se dissolve e a molécula adquire uma carga negativa verdadeira (ou seja, originada de sal dissociado), decorrente da dissociação do sal em água. Como a região polar da molécula adquire carga negativa, os surfactantes são chamados de aniônicos. Exemplo: dodecanoato de sódio (Figura 4), que possui ação espumante e pode ser utilizado como formulação em pó.

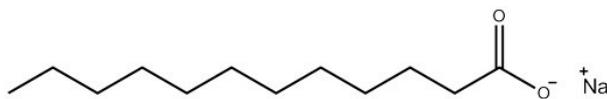
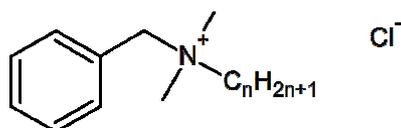


Figura 4. Fórmula estrutural do surfactante dodecanoato de sódio.

- *Catiônicos*: quando um sal quaternário de uma amina graxa entra em contato com a água, o contraíon negativo se dissolve e a molécula adquire uma carga positiva verdadeira, decorrente da dissociação do sal em água. Como a região polar da molécula, adquire carga positiva, os surfactantes são chamados de catiônicos. Exemplo: cloreto de alquil dimetil benzil amônio (Figura 5), que é usado como antisséptico, espermicida e descongestionante nasal.



$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

Figura 5. Fórmula estrutural do surfactante cloreto de alquil metil benzil amônio.

- *Não-iônicos*: são surfactantes que não apresentam cargas verdadeiras, possuem apenas concentração de cargas decorrentes das ligações polares das moléculas. Exemplo: monoestearato de glicerila (Figura 6), surfactante usado como emulsificante, sendo aplicado em cremes, loções e pomadas.

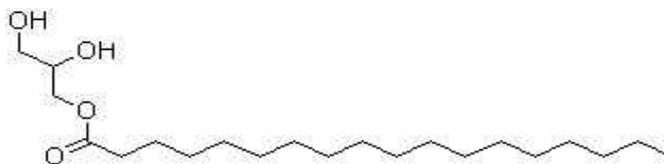


Figura 6. Fórmula estrutural do surfactante monoestereato de glicerila.

- *Zwitteriônicos*: são surfactantes que apresentam, na mesma molécula, grupos hidrofílicos positiva e negativamente carregados, sendo a carga positiva proveniente de um grupo amônio e a carga negativa é oriunda de grupos carboxilatos ou sulfonatos (Beber, 2005). Exemplo: n-decil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (Figura 7), utilizado como desinfetante.

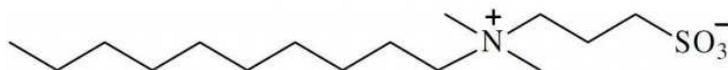


Figura 7. Fórmula estrutural do surfactante n-decil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato.

Os surfactantes zwitteriônicos que se comportam como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH da solução são chamados por alguns autores de anfóteros (Beber, 2005). Exemplo: cocoamidopropil betaína (Figura 8), substância utilizada como shampoo, espumas de banho, géis de banho, sabonetes antissépticos e produtos de limpeza (Rossi, 2006), além dos aminoácidos como o L-Triptofano (Figura 9), apresentados nessa dissertação.

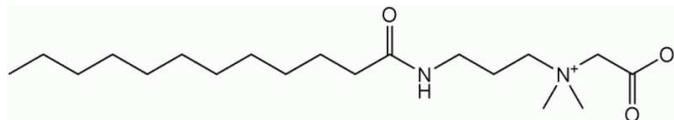


Figura 8. Fórmula estrutural do surfactante cocoamidopropil betaína.

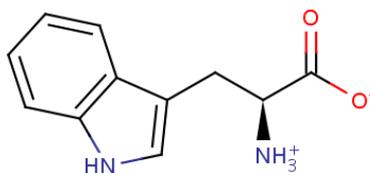


Figura 9. Fórmula estrutural do surfactante L-Triptofano, na sua forma zwitteriônica.

1.2.1. Adsorção superficial

Se moléculas anfifílicas se localizarem em uma superfície de separação, ou seja, em uma interface, que pode ser do tipo ar-água, tal como nos Filmes de Langmuir do presente trabalho, elas se orientam de maneira a manter os grupos hidrofílicos na fase aquosa e as cadeias carbônicas lipofílicas na fase orgânica ou no vapor. A forte adsorção destes materiais em superfícies de líquidos ou em uma interface de dois líquidos imiscíveis, formando camadas monomoleculares orientadas é denominada atividade superficial. Esta pode ser entendida como um fenômeno dinâmico, visto que o estado final de uma superfície ou interface representa um equilíbrio entre essa tendência à adsorção e a tendência a uma mistura ou dissolução completa, devida ao movimento térmico das moléculas.

A tendência dos surfactantes em se acumularem em uma interface favorece uma expansão da mesma. Esta deve, portanto, ser equilibrada ou balanceada frente à tendência da interface se contrair sob a ação de forças normais de tensão superficial. Se π for a pressão responsável pela expansão (ou pressão superficial) de uma camada na qual houve adsorção de um surfactante, a tensão superficial ou interfacial será reduzida em um valor, expresso na eq. (1), igual a:

$$\gamma = \gamma_0 - \pi \quad (1)$$

A equação da adsorção de Gibbs, eq. (2), permite calcular o grau de adsorção existente em uma superfície líquida a partir de dados de tensão superficial (Shaw, 1975).

$$\Gamma_s = -\frac{c_s}{RT} \cdot \frac{d\gamma}{dc_s} \quad (2)$$

onde: Γ_s é a concentração superficial em excesso do solvente, c_s é a concentração do soluto, $d\gamma/dc_s$ é a mudança da tensão superficial com a concentração do soluto, R é a constante universal dos gases ideais e T é a temperatura absoluta.

No caso de filmes de Langmuir, as concentrações superficiais de filmes insolúveis são conhecidas diretamente a partir da quantidade de material espalhado e da área superficial em questão. Neste caso, torna-se desnecessário recorrer a esta equação.

1.2.2. Formação de micelas

McBain, em 1913, sugeriu que o comportamento aparentemente anômalo dos surfactantes poderia ser explicado em termos de formação de agregados organizados, ou micelas, dos íons de surfactantes, sendo as cadeias carbônicas lipofílicas orientadas para o interior da micela, deixando assim os grupos polares em contato com o meio aquoso. A formação destes agregados constitui outro mecanismo, ao lado da adsorção, que pode reduzir a energia interfacial de uma solução de surfactantes.

1.2.3. Espalhamento de um líquido sobre outro

Quando uma gota de uma substância lipofílica é colocada sobre uma superfície limpa de água, ela se comportará de acordo com uma das três situações (Shaw, 1975):

- 1- Permanecerá na superfície como uma lente sem se espalhar;
- 2- Irá se espalhar como um filme fino, até que esteja uniformemente distribuído sobre a superfície como um filme “duplex”, o qual pode ser entendido como um filme superficialmente espesso para que as duas interfaces (líquido-filme e filme-ar) sejam independentes uma da outra e apresentem tensões superficiais características;
- 3- Sofrerá espalhamento em uma monocamada, sendo que o excesso de óleo permanece como “lentes” em equilíbrio, como filmes de Langmuir.

1.3. Aminoácidos

São compostos que apresentam, simultaneamente, os grupos amina e carboxila ligados a um átomo de carbono denominado carbono α (Figura 10). Estas moléculas constituem a menor unidade das proteínas, sendo possível encontrar até 20 diferentes aminoácidos nas estruturas proteicas. Para formar uma proteína, cada resíduo de aminoácido se liga a um aminoácido vizinho através de uma ligação covalente específica, a qual é denominada ligação peptídica (Nelson e Cox, 2005).

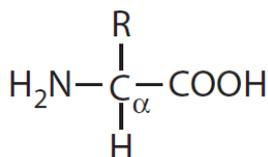


Figura 10. Representação estrutural geral de um aminoácido.

Os aminoácidos diferem entre si devido às cadeias laterais, que são representadas pela letra “R”. Estas cadeias laterais podem apresentar diferentes solubilidades em água e características, tais como variados tamanhos, estruturas químicas e cargas elétricas (Berg *et al.*, 2004). Os resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas são exclusivamente esteroisômeros L. As células são capazes de sintetizar exclusivamente os isômeros L, visto que os sítios ativos das

enzimas são assimétricos e isso faz com que as reações catalisadas sejam estereoespecíficas (Meierhenrich, 2008).

Segundo o estudo de (Buch *et al.*, 2007), baseado em modelagem molecular e evidências experimentais, a interface ar-água é ácida, pois apresenta pH menor que 4,8. A pesquisa de (Mishra *et al.*, 2012) mostra que esse valor é menor que 4 e maior que 3. Assim, para esses valores de pH, todos os aminoácidos utilizados nessa dissertação estão sob a forma zwitteriônica, ou seja, desprotonados em seu grupo carboxila e protonados no (s) grupo (s) amino (s). Os aminoácidos estudados estão representados na Figura 11.

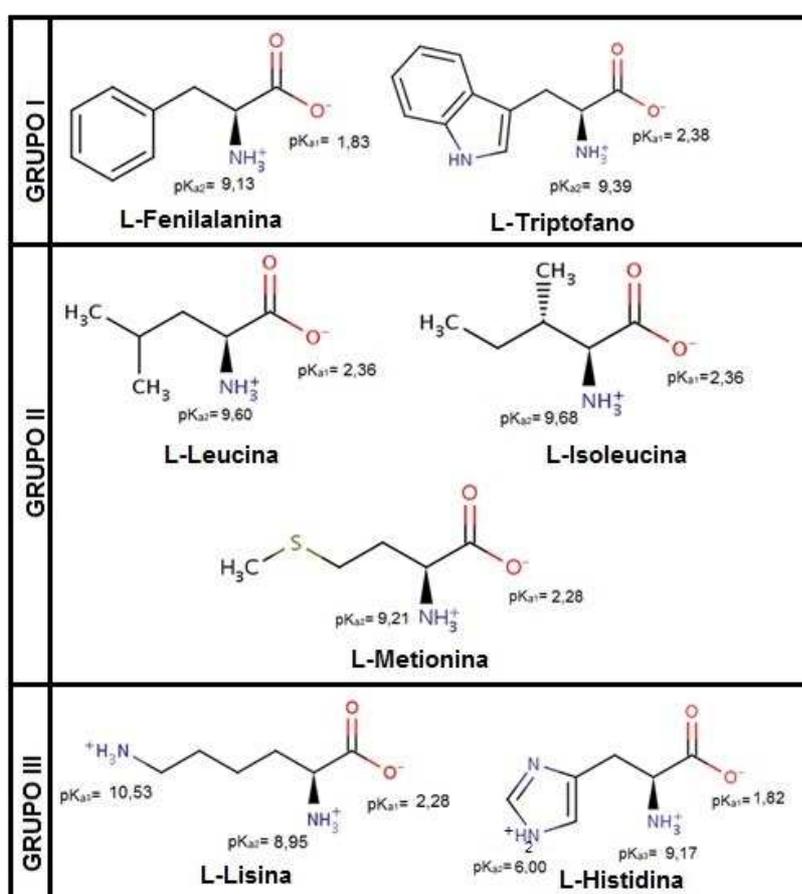


Figura 11. Estruturas químicas dos aminoácidos estudados nos experimentos de pressão de superfície e potencial de superfície e seus respectivos valores de pKa.

Estes aminoácidos possuem funções muito importantes nos organismos vivos e também estão presentes em aerossóis atmosféricos, sejam eles marinhos ou continentais. As principais aplicações e funções desses aminoácidos são:

- *L-Fenilalanina*: em grandes concentrações, desempenha papel importante como analgésico e antidepressivo no nosso organismo. É um dos componentes do aspartame, que é utilizado como adoçante em diversos alimentos. Além disso, é encontrado em aerossóis atmosféricos marinhos (Kristensson *et al.*, 2010; Barbaro *et al.*, 2014);

- *L-Triptofano*: precursor bioquímico da serotonina (Schaechter e Wurtman, 1990), que é um neurotransmissor que controla a liberação de alguns hormônios, regula o sono e o apetite. Atualmente, existem fármacos que controlam a ação da serotonina no tratamento de patologias como ansiedade, depressão, obesidade e esquizofrenia. Assim, o L-Triptofano é um aminoácido de grande importância para as sensações de bem estar e felicidade (Young, 2007). Além disso, o L-Triptofano é encontrado em aerossóis marinhos (Barbaro *et al.*, 2014);

- *L-Leucina*: essencial componente da dieta. Ela desempenha um papel importante na síntese de hemoglobina e é apontada erroneamente como suplemento alimentar com finalidade de aumentar a massa magra, em um processo de ganho muscular. A L-Leucina é um dos aminoácidos encontrados em aerossóis marinhos (Kristensson *et al.*, 2010; Barbaro *et al.*, 2014);

- *L-Isoleucina*: encontrada em várias proteínas. Possui papel importante na síntese da hemoglobina e na regulação do açúcar no sangue (U.S.N.L.M., 2014). É encontrado também em aerossóis marinhos (Barbaro *et al.*, 2014);

- *L-Metionina*: aminoácido intermediário na biossíntese de alguns fosfolipídios. Uma conversão inadequada da L-Metionina pode ocasionar a aterosclerose, que é uma doença inflamatória crônica que leva à formação de várias placas de gordura, cálcio e outros elementos na parede das artérias do coração. Além disso, esse aminoácido é encontrado em aerossóis marinhos (Barbaro *et al.*, 2014);

- *L-Lisina*: encontrado em pequena quantidade em alguns gêneros alimentícios em particular, na maioria dos grãos de cereais, mas é abundante na maior parte dos legumes (Young e Pellett, 1994). É um importante bloco construtor de todas as proteínas do nosso corpo e desempenha um papel importante na absorção do

cálcio e na produção de hormônios. Há estudos que relatam os benefícios da L-Lisina para pacientes que apresentam *herpes simplex*. A L-Lisina é encontrada em aerossóis continentais (Kristensson *et al.*, 2010);

- *L-Histidina*: aminoácido essencial para os recém-nascidos e se torna não-essencial para os adultos (Ghosh *et al.*, 2010). A L-Histidina participa do processo de produção de Histamina, que é uma substância química envolvida nos processos bioquímicos de resposta imunológica e é um importante neurotransmissor. Esse aminoácido é encontrado, também, em aerossóis continentais (Kristensson *et al.*, 2010).

O estudo da composição química e das propriedades gerais dos grupamentos R dos aminoácidos permite o agrupamento em cinco classes distintas, as quais são baseadas em suas polaridades e tendência a interagir com a água em valores de pH biológico (aproximadamente 7,0). Os cinco grupos estão presentes na Tabela 2, assim como os valores do índice de hidropatia, que é uma escala proposta por Kyte e Doolittle (1982), que combina hidrofobicidade e hidrofiliabilidade. Nesta escala, valores negativos indicam a tendência do aminoácido em buscar sistemas aquosos e, para valores positivos, os aminoácidos tenderiam aos sistemas hidrofóbicos.

Tabela 2. Convenções associadas aos aminoácidos padrões. Adaptado de (Nelson e Cox, 2005).

Aminoácido	Abreviação	Símbolo	Índice de hidropatia
Grupos R alifáticos não-polares			
Glicina	Gly	G	- 0,4
Alanina	Ala	A	1,8
Prolina	Pro	P	1,6
Valina	Val	V	4,2
Leucina	Leu	L	3,8
Isoleucina	Ile	I	4,5
Metionina	Met	M	1,9
Grupos R aromáticos			
Fenilalanina	Phe	F	2,8
Tirosina	Tyr	Y	- 1,3
Triptofano	Trp	W	- 0,9
Grupos R polares não-carregados			
Serina	Ser	S	- 0,8
Treonina	Thr	T	- 0,7
Cisteína	Cys	C	2,5
Asparagina	Asn	N	- 3,5
Glutamina	Gln	Q	- 3,5

Grupos R positivamente carregados			
Lisina	Lys	K	- 3,9
Histidina	His	H	- 3,2
Arginina	Arg	R	- 4,5
Grupos R negativamente carregados			
Aspartato	Asp	D	- 3,5
Glutamato	Glu	E	- 3,5

A escala de hidrofobicidade mais popular foi desenvolvida pela medição da tensão superficial para os 20 aminoácidos de ocorrências naturais em soluções de cloreto de sódio (NaCl) (Bull e Breese, 1974). Outra metodologia muito comum para a medição da hidrofobicidade dos aminoácidos é aquela que relaciona a partição entre duas fases líquidas imiscíveis, onde geralmente uma é aquosa e outra se apresenta como um solvente orgânico. Neste caso, diferentes solventes orgânicos são utilizados para simular as condições no interior de uma proteína. Assim, Nozaki e Tanford (1971) propuseram uma escala de hidrofobicidade contendo oito aminoácidos, nas quais foram utilizados como solventes orgânicos etanol e dioxano, permitindo o cálculo da energia livre de transferência dos solutos da água para os solventes, variando-se as proporções dos solventes orgânicos.

As escalas de hidrofobicidade propostas por Wimley e White (1996) são importantes, porque incluem as contribuições das ligações peptídicas e das cadeias laterais, gerando valores absolutos de ΔG de transferência dos aminoácidos da fase aquosa para o solvente orgânico. Assim, duas escalas baseadas na hidrofobicidade dos aminoácidos foram medidas: uma relacionando a transferência de aminoácidos da água para a interface da bicamada; e outra para a transferência destas cadeias da água para o octanol. Estas escalas, representadas pela Figura 12, permitem comparar a partição na interface da bicamada com a partição no interior da solução.

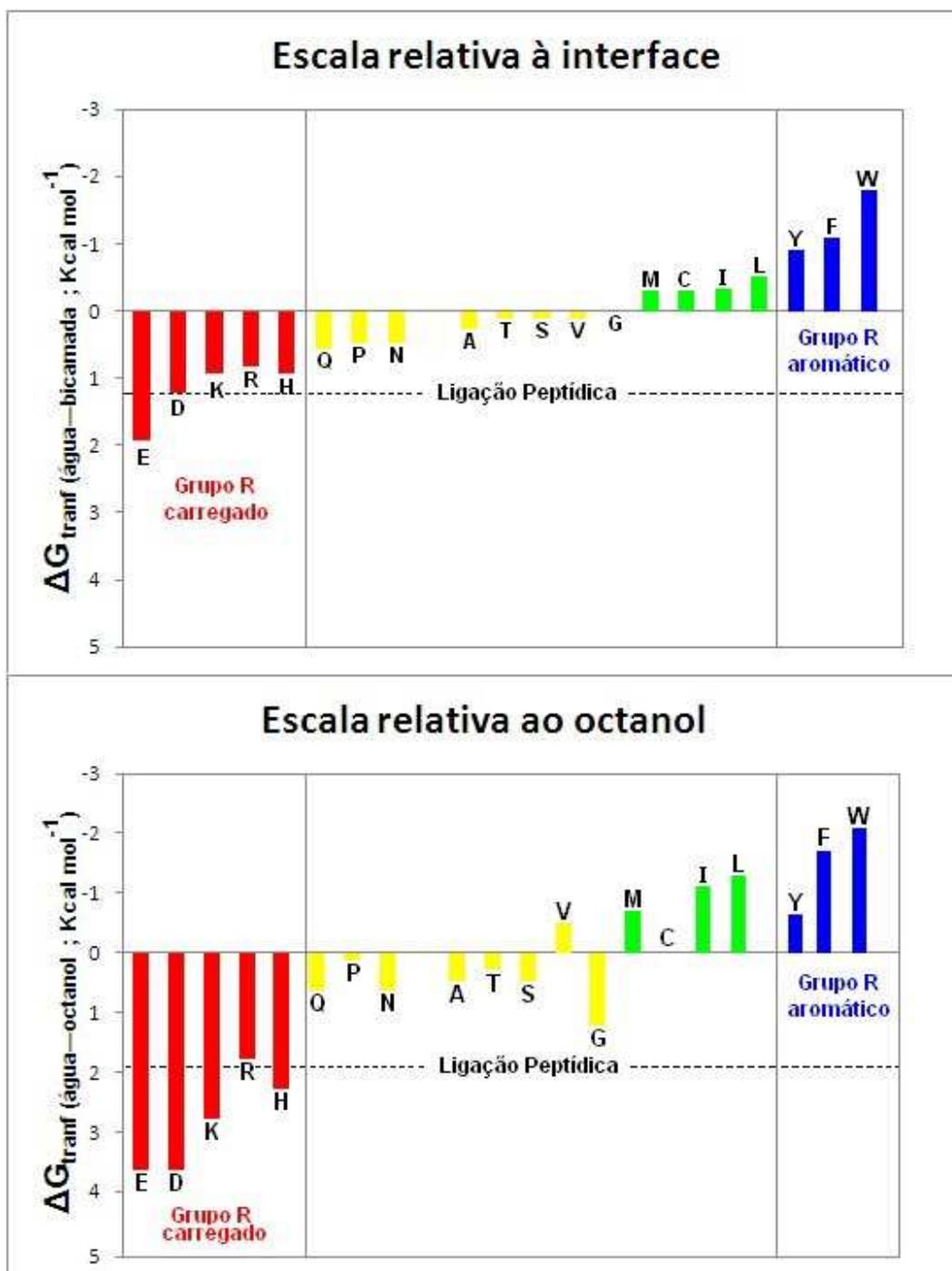


Figura 12. Representação das escalas de hidrofobicidade de Wimley e White. As letras são os símbolos padrões para os aminoácidos, ácido glutâmico (E), ácido aspártico (D), lisina (K), arginina (R), histidina (H), glutamina (Q), prolina (P), asparagina (N), histidina (H), alanina (A), treonina (T), serina (S), valina (V), glicina (G), metionina (M), cisteína (C), isoleucina (I), leucina (L), tirosina (Y), fenilalanina (F), e triptofano (W).

Langmuir simulando o comportamento da membrana celular, pois esta técnica é capaz de demonstrar o comportamento da matéria orgânica e inorgânica ao ser espalhada sobre uma subfase aquosa análoga a um ambiente biológico com a formação na interface ar-água do filme.

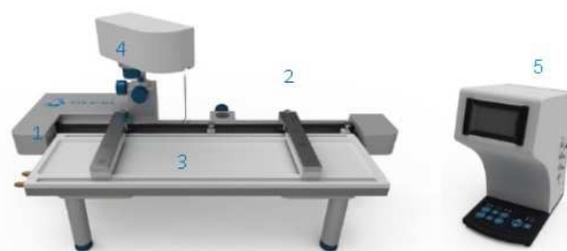
Outra aplicação recente para esta técnica está associada ao estudo das interações que ocorrem na insulina, visto que a forma ativa deste hormônio é caracterizada por duas cadeias peptídicas: uma cadeia hidrofílica composta por 30 resíduos de aminoácidos e outra hidrofóbica, constituída por 21 resíduos aminoácidos (Brange *et al.*, 1988). Perez-Lopes, Blanco-Vila e Vila-Romeu (2011) realizaram um estudo baseado na dispersão de monocamadas contendo insulina na interface ar-água contendo, com o objetivo de entender a miscibilidade nestas fases e as interações existentes entre os componentes desta proteína.

Geraldo *et al.* (2013) realizaram uma pesquisa relacionada à aplicação de Filmes de Langmuir para observar melhor a ação farmacológica do ibuprofeno, pois este medicamento, quando utilizado a longo prazo, provoca complicações gastrointestinais severas, tais como úlceras e hemorragias em até 30% dos pacientes. Com isso, as interações do ibuprofeno com a membrana celular foram analisadas, variando-se as concentrações do fármaco e o tipo de substância hidrofóbica na interface ar-água, com o intuito de simular diferentes membranas celulares.

Outro exemplo atual pode ser o estudo da estrutura da água interfacial, assim como as interações de diferentes biomoléculas, tais como o DNA, com as membranas celulares apresenta grande relevância para o projeto e desenvolvimento de lipídios utilizados em terapias genéticas (Giner-Casares *et al.*, 2014). O estudo de membranas possui grande importância para o estudo do desenvolvimento e evolução de diversas doenças em seres humanos, tais como o Alzheimer. Os peptídios responsáveis pelo aparecimento desta doença apresentaram “dobras” nas interfaces dos filmes de Langmuir, ou seja, demonstram um comportamento semelhante ao apresentado nas membranas (Engel *et al.*, 2012).

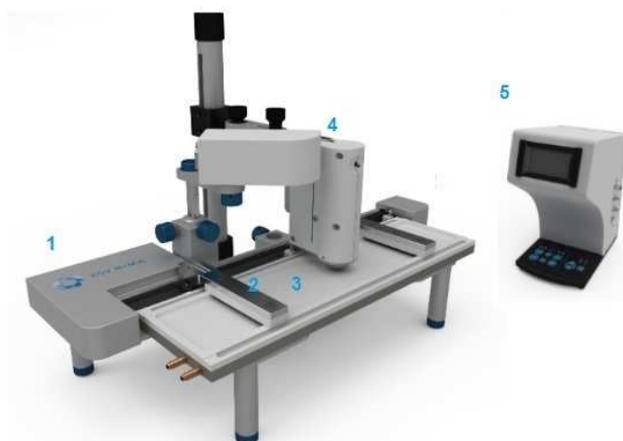
Os filmes de Langmuir são caracterizados em um equipamento, chamado de cuba de Langmuir (Dynarowicz-Latka *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005), ilustrada nas Figuras 14 e 15. Ela consiste em um aparato normalmente retangular,

feito de um material hidrofóbico e resistente à maioria das substâncias químicas, como o politetrafluoretileno (PTFE, ou Teflon®), onde é espalhada a subfase. Suas barreiras móveis são de Delrin, que é um material hidrofílico, devem ser pesadas o suficiente para deslizar sobre a superfície da água e sobre as bordas da cuba, quando iniciada a compressão do filme (Dynarowicz-Latka *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005). Além disso, não devem permitir que a monocamada passe por baixo da barreira, modificando a área superficial. A utilização de barreiras hidrofílicas confere vantagem ao sistema, pois dessa forma a cavidade da cuba não precisa estar cheia até quase transbordar, o que evita um eventual derramamento quando a pressão de superfície torna-se muito alta.



1 - Armação da cuba 2 - Barreira 3 - Cavidade da cuba
4 - Sensor de pressão de superfície 5 - Interface

Figura 14. Cuba de Langmuir (*KSV Instruments*) – montagem para medição de pressão de superfície. Adaptado de (K.S.V., 2013).



1 - Armação da cuba 2 - Barreira 3 - Cavidade da Cuba
4 - Sensor de potencial de superfície 5 - Interface

Figura 15. Cuba de Langmuir (*KSV Instruments*) - montagem para medição de potencial de superfície. Adaptado de (K.S.V., 2013).

A compressão das moléculas realizada pelas barreiras da cuba pode ser simétrica ou unilateral. Nessa dissertação foi utilizada a compressão simétrica, em

que a monocamada é comprimida/expandida por duas barreiras que se movem simultaneamente em sentido contrário. Dessa forma, é possível medir a pressão de superfície com maior exatidão, favorecer a orientação uniforme da monocamada e permitir uma mesma taxa de redução de área da cuba com a metade da velocidade de compressão, favorecendo a formação mais organizada da monocamada (Bonardi, 1995). Além disso, deve-se realizar a compressão com taxas não muito altas, pois a velocidade pode comprometer a reorganização das moléculas na interface.

Para que os resultados obtidos sejam reprodutíveis, é importante otimizar as condições experimentais, tais como a limpeza da cuba, ausência de vibração, pureza dos reagentes utilizados e utilização de água ultrapura, entre outros. A qualidade da água é um aspecto muito importante, que pode afetar fortemente os resultados, como observado por Oliveira (1990). A água deve ser ultrapura, ou seja, deve estar livre de compostos orgânicos, coloides e bactérias. Para que essa pureza seja obtida, a água passa por um sistema de ultrapurificação, em que ela é tratada inicialmente com carvão ativado para remoção de cloretos e compostos orgânicos, seguida de um pré-filtragem para remoção de partículas e passagem por uma membrana semipermeável de osmose reversa. Dessa forma, a água passa a ter baixos níveis de sais orgânicos, matéria orgânica, coloides e bactérias (Bonardi, 1995). Além disso, a água é novamente submetida a um tratamento com carvão ativado, passa por uma resina de troca iônica até que sua resistividade chegue a um valor de 18 M Ω cm (Gehaka, 2012), através de um filtro que remove compostos orgânicos até a concentração de 10 ppb. Por fim, a água é submetida à radiação ultravioleta, a fim de oxidar substâncias orgânicas residuais, além de destruir bactérias.

A limpeza da cuba é outro aspecto importante no processo de fabricação dos filmes de Langmuir. A cuba deve ser limpa com um solvente orgânico de alta pureza, com o auxílio de um lenço de papel, por exemplo, a fim de remover possíveis vestígios de materiais utilizados anteriormente, além de impurezas do ar. Após a limpeza, deve-se preencher a cavidade da cuba com água ultrapura e esvaziá-la várias vezes para que outras partículas finas possam ser retiradas.

Para a fabricação do filme, é necessário que o material a ser estudado seja dissolvido em um solvente orgânico volátil e insolúvel em água, como o

clorofórmio, e seja colocado sobre a superfície da subfase com o auxílio de uma micropipeta ou uma microsseringa, de forma a garantir o espalhamento da solução por toda a superfície e a evaporação do solvente em poucos minutos. Para uma melhor formação do filme, é recomendável pipetar a solução gota a gota, lentamente

A caracterização dos filmes pode ser feita por medidas de pressão de superfície e de potencial de superfície. A pressão de superfície (π) pode ser definida como a diferença entre a tensão superficial de uma subfase na ausência de um material (γ_0) e a tensão superficial de uma subfase com uma monocamada desse mesmo material (γ) (Ferreira *et al.*, 2005), eq. (1), sendo uma pressão em duas dimensões (força por unidade de comprimento), exercida pelas moléculas do surfactante entre si (Pavinatto, 2010).

Muitas vezes a pressão de superfície é confundida com a tensão superficial. Apesar disso, não se tratam de conceitos iguais e, por isso, deve-se entender o que é, de fato, a tensão superficial. Quando se tem um líquido, como a água, as moléculas que se encontram na interface estão sob um desequilíbrio de forças, pois não possuem outras moléculas acima e sofrem atração das moléculas que estão localizadas abaixo delas. O que acontece é que a resultante das forças que agem sobre as moléculas da interface líquido/ar está voltada para dentro do líquido, permanentemente “puxando” as moléculas do líquido para seu interior (Daltin, 2011). Assim, a força que é originada para aumentar a superfície do líquido é proporcional a tensão superficial. Quanto maiores são as forças de interação intermoleculares, maior será a tensão superficial.

A pressão de superfície é medida em força por unidade de comprimento, em mN m^{-1} ou dina cm^{-1} , através de um tensiômetro ou por uma balança de Wilhelmy, em que a pressão mínima medida é zero e a máxima é próxima ao valor da tensão superficial da subfase (para a água, $72,7 \text{ mN m}^{-1}$, aproximadamente, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) (I.A.P.W.S., 1994). Pelo método de Wilhelmy, uma eletrobalança mede a força exercida pelo filme sobre um sensor, que pode ser uma placa de platina ou um papel de filtro. O sensor é imerso parcialmente na subfase (Figura 16), e a força exercida sobre ele, resultante do peso, da tensão superficial e do empuxo, é dada pela eq. (3).

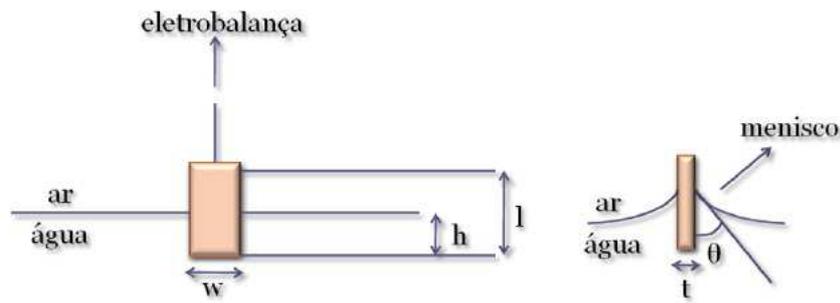


Figura 16. Ilustração de um sensor de papel de filtro imerso parcialmente na água, como no método de Wilhelmy. Fonte: (Pavinatto, 2010).

$$F = l_p w_p t_p \rho_p g + 2(w_p t_p)(\cos \theta) \gamma_a - h_a w_a t_a \rho_a g \quad (3)$$

Onde: l = comprimento; w = largura; t = espessura; ρ = densidade; g = aceleração da gravidade; θ = ângulo de contato entre a água e a placa; γ = tensão superficial; h = comprimento da parte da placa submersa na água; os índices “p” e “a” se referem à placa e água, respectivamente.

Para uma placa estacionária, a pressão de superfície pode ser calculada pela variação da força medida na eletrobalaça (Pavinatto, 2010), como pode ser visto na eq. (4).

$$\pi = -\Delta\gamma = -\Delta F / [2(W_p t_p)(\cos \theta)] \quad (4)$$

Uma forma de avaliar as propriedades de um filme de Langmuir é pela medida da pressão de superfície em função da área de superfície de água disponível por cada molécula (Dynerowicz-Latka *et al.*, 2001) que, por ser feita à temperatura constante, é chamada de isoterma de pressão de superfície por área (isotermas π -A), ou isoterma de Langmuir. A isoterma é obtida através da compressão do filme, pela redução da área pela ação das barreiras móveis, a uma taxa constante, enquanto é monitorada a pressão de superfície.

A curva de pressão de superfície *versus* área por molécula (curva π -A) é uma isoterma que pode ser um importante indicador das propriedades termodinâmicas e eletrostáticas, da estabilidade e da mudança de fases da monocamada, além de comportamento de colapso e interação das espécies na

interface da subfase com a monocamada. Além disso, as curvas π -A apresentam as transições de fase que acontecem no filme, no decorrer da compressão do mesmo, quando há diminuição da área superficial. Deve-se tomar muitos cuidados para obter reprodutibilidade nos experimentos em que se planeja obter isothermas π -A. Impurezas na monocamada, na cuba ou na subfase, solubilidade inadequada ou excesso do material espalhado podem causar erros experimentais, refletindo na reprodutibilidade das isothermas (Pavinatto, 2010).

Em isothermas do tipo π -A são observadas regiões diferenciadas, correspondentes às fases distintas do filme e que podem ser identificadas pelos pontos de inflexão na isoterma. Essas fases são resultado das mudanças na pressão de superfície decorrentes da compressão do filme e se relacionam com as propriedades físicas e químicas da espécie anfifílica, ou seja, são características para essa espécie. Em muitos casos, o tamanho da cadeia carbônica da espécie anfifílica e a magnitude de forças coesivas e repulsivas entre os grupos polares influenciam a presença dessas fases. As diferentes fases presentes em uma isoterma do fosfolípido dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) estão representadas na Figura 17.

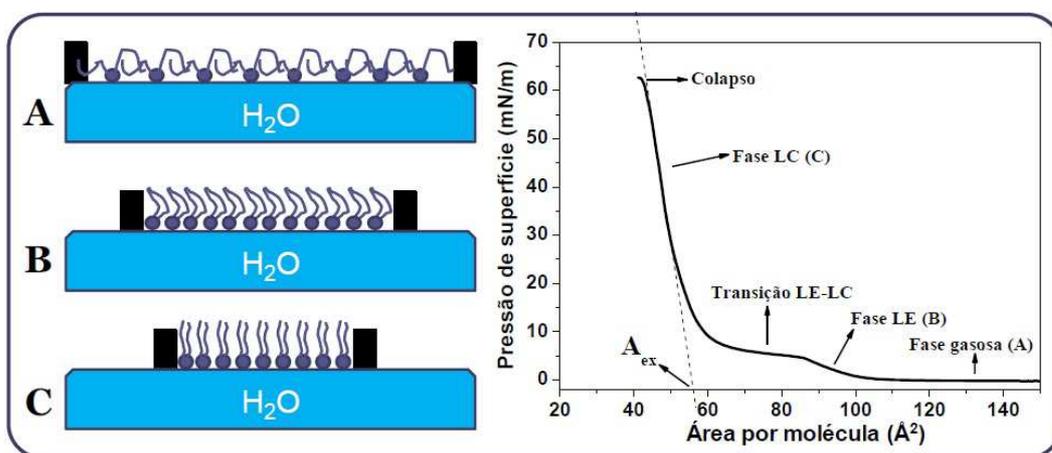


Figura 17. Ilustração da estruturação das moléculas no filme nos diferentes estágios de compressão e isoterma π -A do fosfolípido dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC). Fonte: (Pavinatto, 2010).

Pode-se explicar as regiões da isoterma da seguinte forma: enquanto as moléculas se encontram “livres” de forças intermoleculares na interface, elas estão na fase gasosa, ou seja, totalmente dispersas e desordenadas. Conforme é realizada a compressão do filme, há um aumento na densidade de moléculas

formando arranjos regulares no filme, aumentando progressivamente as interações intermoleculares e a organização do mesmo. Consequentemente, surge uma fase líquido-expandida (LE) e uma fase líquido-condensada (LC). Finalmente, tem-se a fase sólida, que nem sempre é observada, pois, em alguns filmes, não se atinge essa fase. A área ocupada por uma molécula pode ser obtida pela extrapolação no eixo x, representada no gráfico por A_{ex} .

Pode ocorrer uma compressão além do ponto de máxima compactação, fazendo com que as moléculas se agrupem desordenadamente, ocorrendo o fenômeno chamado de colapso do filme, que pode ser observado por um decréscimo (que pode ser lento ou rápido, dependendo da substância) da pressão de superfície. Assim, a pressão de colapso pode ser definida como a pressão máxima ao qual o filme pode ser submetido sem que ocorra a expulsão de moléculas do mesmo.

Para moléculas como as de ácido esteárico (Figura 18), é observado um comportamento diferente do observado para o fosfolipídio DPPC. O filme apresenta-se muito condensado, ou seja, a pressão de superfície só começa a aumentar de forma significativa para pequenos valores de área por molécula, em torno de 25 \AA^2 por molécula, que corresponde a área mínima e máximo empacotamento (Ferreira *et al.*, 2005). Em filmes de ácido esteárico, é observada histerese, que tem relação com a perda do material na interface ao longo das compressões (Peltonen e Yluri).

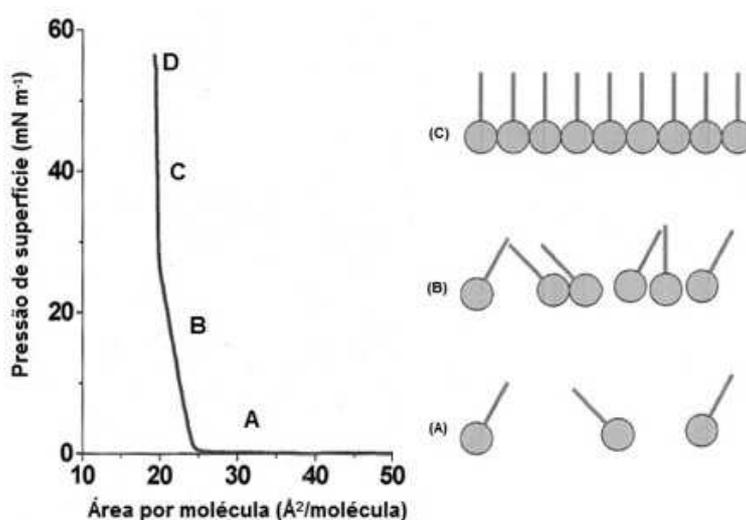


Figura 18. (a) Isoterma π - A de um filme de ácido esteárico em água, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, com diferentes regiões correspondentes às diferentes fases indicadas por A (fase gasosa), B (fase líquido expandida) e C (fase condensada). D representa o colapso do filme. (b) Representação esquemática das fases. Adaptado de (Dynarowicz-Latka *et al.*, 2001).

Em filmes mistos de compostos aromáticos e ácido esteárico pode ocorrer o fenômeno de colapso hidrofóbico prematuro, recentemente relatado nos ciclos de compressão-expansão (Griffith *et al.*, 2012; Griffith *et al.*, 2013). A estabilidade e o mecanismo de colapso de uma monocamada são geralmente devido a interações entre cabeças polares das moléculas de surfactante na interface (Angelova *et al.*, 1996; Lee, 2008), através de ligações de hidrogênio que geram “pontes” ou “cinturões” estáveis que previnem a perturbação da ordem dos grupos através do colapso (Ries, 1979; Lee, 2008). Esse fenômeno pode ser observado quando, ao longo da compressão do filme, as isothermas do filme misto se assemelham ao do filme formado apenas por ácido esteárico, devido à remoção de moléculas de L-Fenilalanina da interface.

O colapso hidrofóbico ocorre devido ao rompimento de redes de ligações de hidrogênio estáveis, como as que são formadas por cabeças hidrofílicas das moléculas de surfactante, contribuindo para a formação de estruturas de colapso hidrofóbicas na interface. No caso da interação de L-Fenilalanina com ácido esteárico, o rompimento das ligações de hidrogênio é facilitado pelo grupo fenil, forçando o espaço entre as cadeias carbônicas, causando a distorção das monocamadas por uma interação hidrofóbica (Figura 19).

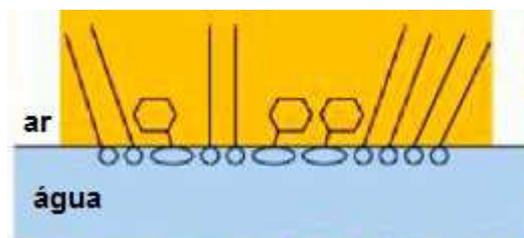


Figura 19. Esquema representando a orientação das moléculas quando ocorre o fenômeno do colapso hidrofóbico. Adaptado de (Griffith *et al.*, 2012).

O potencial de superfície é definido como a diferença de potencial entre uma superfície aquosa recoberta de filme de Langmuir e uma superfície sem monocamada (Ferreira *et al.*, 2005) e é decorrente da assimetria eletrônica intrínseca da interface, proveniente da polaridade de átomos e moléculas (Pavinatto, 2010).

A interface entre o ar e a superfície da subfase aquosa é naturalmente polarizada devido à orientação espontânea das moléculas de água nas proximidades da interface e a diferença de potencial gerada nessa circunstância é

modificada na presença de um filme de Langmuir. Isso ocorre devido a componente normal à interface do momento de dipolo médio das moléculas do filme e também a orientação da polarização das moléculas da subfase.

O potencial de superfície pode ser medido utilizando o método de capacitor de placa vibrante (Figura 20), no qual uma das placas do capacitor vibra sobre a superfície da água, gerando uma variação de capacitância e a corrente alternada pode ser medida por um circuito externo, compensada por uma fonte variável conectada a um eletrodo de referência imerso na subfase.

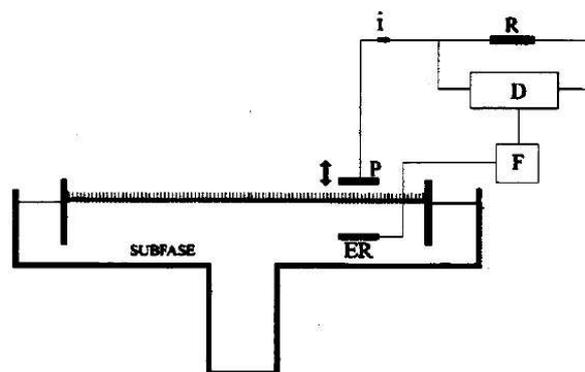


Figura 20. Esquema representativo da medida do potencial de superfície de filmes de Langmuir, sendo P= placa metálica, i = corrente alternada, R= resistência, D= detector, F= fonte, ER= eletrodo de referência (Bonardi, 1995).

No método do capacitor de placa vibrante, a superfície da subfase funciona como uma das placas do capacitor; a segunda placa (metálica) se encontra sobre e paralela à superfície, vibrando. Essa vibração da placa **P** causa uma variação na capacitância. Assim, uma corrente alternada i flui através de uma resistência de carga **R**. A corrente do resistor é amplificada e medida por um detector, **D**. Na ausência de monocamada, a fonte dc, variável (**F**), conectada ao eletrodo de referência **ER**, é ajustada para a corrente ser zero, de forma que o campo elétrico entre a placa **P** e a subfase se anula, e o potencial em **P** é igual ao potencial da superfície limpa. Esse valor (V_{ref}), que anula o potencial de superfície da água limpa, é usado como referência para as medidas. Repete-se o processo na presença do filme de Langmuir, obtendo-se um novo valor V e o potencial de superfície é dado pela diferença entre V e V_{ref} , visto na eq. (5).

$$\Delta V = V - V_{ref} \quad (5)$$

Alguns modelos teóricos têm sido empregados para relacionar os potenciais medidos com os momentos de dipolo das moléculas constituintes do filme (Ferreira *et al.*, 2005). No modelo de Demchak e Fort (DF), um dos mais utilizados, o filme é tratado como um capacitor de três camadas, cada uma com um momento de dipolo efetivo e uma constante dielétrica local (Ferreira *et al.*, 2005), como pode ser visto na Figura 21.

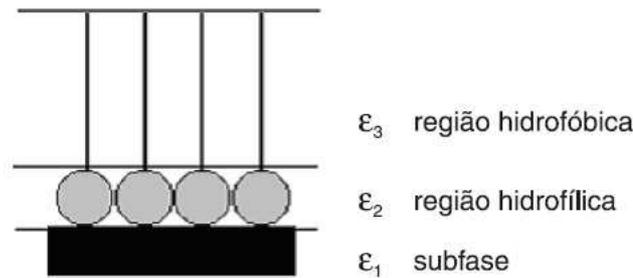


Figura 21. Modelo de Demchak e Fort para explicar o potencial de superfície da monocamada. Fonte: (Ferreira *et al.*, 2005).

Assim, o potencial de superfície no modelo DF é dado pela eq. (6)

$$\Delta V = \frac{1}{A\varepsilon_0} \left[\frac{\mu_1}{\varepsilon_1} + \frac{\mu_2}{\varepsilon_2} + \frac{\mu_3}{\varepsilon_3} \right] + \psi_0 \quad (6)$$

onde:

A = área medida por molécula; ε_0 = permissividade no vácuo; ε_n = constante dielétrica local para cada uma das regiões da interface; μ_1 = contribuição do dipolo da água reorientada na interface da monocamada com a subfase; μ_2 = contribuição do dipolo na interface água – filme; μ_3 = contribuição dos dipolos na interface ar-filme; ψ_0 é a contribuição da dupla camada de íons descrita por Gouy- Chapman. No modelo de Gouy-Chapman, a concentração do eletrólito é levada em consideração, onde a maior quantidade de espécies estaria imediatamente ao lado do eletrodo, de forma que a atração eletrostática seria superior aos efeitos térmicos.

A placa metálica para potencial de superfície é colocada sobre a cuba em uma posição fixa, normalmente no centro, se a compressão for simétrica, como foram feitos nos experimentos dessa dissertação. Além disso, a placa vibrante deve estar muito próxima à superfície, aumentando a sensibilidade da medida.

Enquanto as moléculas são comprimidas e o filme vai se formando, são registradas as mudanças no potencial de superfície, observados na curva $\Delta V-A$.

As isotermas de potencial de superfície ($\Delta V-A$) mostram a variação do potencial de superfície (ΔV) com a diminuição da área superficial ocupada pelo filme (Å^2 por molécula), utilizando o método de capacitor de placa vibrante (Ferreira *et al.*, 2005), explicado anteriormente.