

TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO PARA INVESTIGAR INTERAÇÕES NO NÍVEL MOLECULAR EM FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT (LB)

Marystela Ferreira*

Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, CP 467, 19060-900 Presidente Prudente - SP

Wilker Caetano e Rosangela Itri

Departamento de Física Aplicada, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318, 05315-970 São Paulo - SP

Marcel Tabak

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos - SP

Oswaldo N. Oliveira Jr.

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos - SP

Recebido em 18/5/04; aceito em 27/8/04; publicado na web em 17/2/05

CHARACTERIZATION TECHNIQUES TO INVESTIGATE MOLECULAR-LEVEL INTERACTIONS IN LANGMUIR AND LANGMUIR-BLODGETT (LB) FILMS. This paper discusses fundamental concepts for the characterization of Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett (LB) films, with emphasis on investigations of material properties at the molecular level. By way of illustration, results for phospholipid monolayers interacting with the drug dipyrindamole are highlighted. These results were obtained with several techniques, including *in situ* grazing incidence X-ray diffraction, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, fluorescence microscopy, in addition to surface pressure and surface potential isotherms. Also mentioned are the difficulties in producing Langmuir and LB films from macromolecules, and how molecular-level interactions in mixed polymer LB films can be exploited in sensors.

Keywords: Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) films; characterization; air/water interface.

INTRODUÇÃO

Filmes nanoestruturados de materiais orgânicos são estudados extensivamente, principalmente devido ao possível controle de suas propriedades no nível molecular. Uma das técnicas empregadas para a fabricação de tais filmes é a de Langmuir-Blodgett (LB)¹, que permite a deposição de filmes camada por camada, em que cada camada pode ter espessura de uma única molécula. Nesta técnica, um filme monomolecular, em geral, é formado sobre uma superfície de uma subfase aquosa, denominado filme de Langmuir, e depois transferido para um substrato sólido, através da imersão e retirada do substrato, verticalmente, da subfase. A repetição dos processos de imersão e retirada permite deposição de multicamadas, que podem ser altamente organizadas. Os materiais tradicionais empregados com a técnica LB são os anfifílicos, com partes polares e apolares bem definidas, tais como os ácidos graxos, álcoois, ésteres e fosfolípidos de cadeias longas. Várias aplicações têm sido sugeridas para os filmes LB²⁻¹², quase sempre explorando suas características de filmes ultrafinos e com controle da arquitetura molecular. Para as aplicações, todavia, geralmente são usados materiais não anfifílicos e até macromoléculas. Para estes últimos, uma série de fatores novos precisa ser levada em conta, e os filmes de Langmuir geralmente não são monomoleculares.

A produção de filmes LB de boa qualidade requer a obtenção de filmes de Langmuir estáveis sobre a subfase aquosa, o que nem sempre é trivial, principalmente para as macromoléculas. Portanto, a caracterização de filmes de Langmuir passa a ser um tópico com importância própria. De fato, o estudo de monocamadas ou filmes de Langmuir é um ramo interessante da físico-química, com aplica-

ções em muitos campos da ciência e tecnologia. Devido à pequena quantidade de material no filme de Langmuir, técnicas de caracterização *in situ* muitas vezes são sofisticadas, como aquelas para verificar estrutura e propriedades espectroscópicas e morfológicas. Essas técnicas são utilizadas juntamente com os métodos tradicionais de análises de monocamadas, que são as medidas de pressão e potencial de superfície. Este processo de caracterização é também essencial para otimizar as condições de transferência da monocamada. Além disso, filmes de Langmuir constituídos de fosfolípidos representam um modelo simples para uma membrana celular, cujo arcabouço é formado por uma bicamada de fosfolípidos.

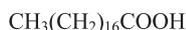
Neste artigo discutiremos técnicas experimentais que têm sido usadas para caracterizar filmes de Langmuir, principalmente com ênfase na interação no nível molecular. A título de ilustração, mostraremos como a interação de fármacos com os filmes de Langmuir pode ser estudada. Mencionaremos também as dificuldades de análise dos filmes de Langmuir de materiais não anfifílicos, como os polímeros. Já para os filmes LB, analisaremos resultados em que a interação em nível molecular de dois componentes em filmes mistos, também detectada nos filmes de Langmuir, confere propriedades especiais aos filmes LB.

FILMES DE LANGMUIR

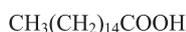
Moléculas anfifílicas podem se orientar na interface de uma subfase aquosa com uma fase gasosa ou uma fase líquida para minimizar sua energia livre. O filme interfacial resultante tem a espessura de uma molécula e é comumente chamado de “camada monomolecular” ou simplesmente “monocamada”^{1,13}. A denominação “monocamada de Langmuir” foi dada em homenagem ao cientista Irving Langmuir, cujo trabalho pioneiro foi fundamental para a

*e-mail: mstela@prudente.unesp.br

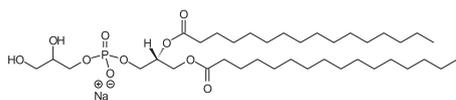
consolidação desta área de pesquisa¹⁴. As moléculas anfífilicas (Figura 1) são constituídas por uma parte hidrofílica e outra parte apolar hidrofóbica. A parte hidrofóbica, freqüentemente formada de cadeias alifáticas, diminui a solubilidade das moléculas na subfase aquosa. A parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento do filme na superfície da água devido à sua maior interação com a subfase aquosa.



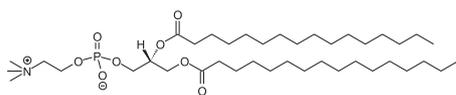
(1)



(2)



(3)



(4)

Figura 1. Alguns compostos anfífilicos: ácido esteárico (1), ácido palmítico (2), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)] (sal de sódio) (DPPG) (3), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidil colina (4) (DPPC)

As monocamadas ou filmes de Langmuir são geralmente obtidos através da dissolução da substância apropriada em um solvente apolar (de baixa constante dielétrica), volátil, seguida da sua distribuição sobre a superfície da subfase. Filmes de Langmuir são produzidos numa cuba, usualmente de forma retangular e feita de um material hidrofóbico, como o Teflon (poli(tetrafluoroetileno)), que contém a subfase aquosa. Para que o filme seja tão fino a ponto de se atingir a espessura de uma molécula, esta área superficial deve ser suficientemente extensa e/ou a quantidade de material espalhado suficientemente pequena. A solução é espalhada sobre toda a superfície e o solvente evapora em poucos minutos. Se a área disponível por molécula for elevada, o filme se encontra no estado denominado gasoso, onde as interações entre as moléculas do anfífilico são fracas e podem ser desprezadas. Se a área superficial para o filme for diminuída, através da compressão do filme com uma barreira móvel, as moléculas interagirão progressivamente à medida que a área média ocupada por molécula diminuir. A Figura 2 mostra a cuba de Langmuir com seus acessórios.

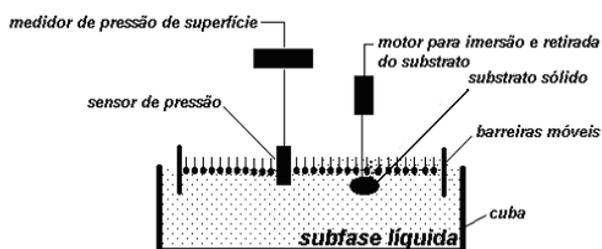


Figura 2. Cubo de Langmuir e acessórios utilizados na fabricação de filmes de Langmuir e LB

TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Uma grande variedade de técnicas experimentais tem sido empregada no estudo de filmes de Langmuir. Um apanhado de resultados obtidos com as várias técnicas é apresentado na ref. 15. Aqui trataremos apenas de algumas utilizadas para o estudo da interação de fármacos com filmes de Langmuir de fosfolipídios, que servem como modelos simples de uma membrana celular.

PRESSÃO DE SUPERFÍCIE

A pressão de superfície (π) é definida como a diferença em tensão superficial entre uma subfase na ausência do material (γ_0) e uma subfase com a monocamada (γ), como representado na Equação 1:

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

Esta pressão pode ser obtida medindo-se a força por unidade de comprimento sobre uma barreira mantida fixa através de uma eletrobalança, ou medindo-se as tensões superficiais pelo método da placa de Wilhelmy, entre outras¹⁶. A mínima pressão medida é zero, e a máxima – para monocamadas bem estáveis – aproxima-se da tensão superficial da subfase, que é cerca de 73 mN/m (25 °C) para a água pura. Uma curva de pressão de superfície versus área por molécula é o análogo bidimensional de uma isoterma pressão-volume. Podem ser definidas várias fases para a monocamada. Para ilustrar discutiremos a isoterma de um fosfolipídio, dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), mostrada na Figura 3.

Como já mencionado, para áreas superficiais extensas, as moléculas encontram-se na fase gasosa (G). A fase líquida (L) ocorre quando as moléculas se aproximam umas das outras e a área por molécula diminui. Dependendo da molécula a ser estudada, podem estar presentes as fases líquido-expandida (LE) e/ou a líquido-condensada (LC),

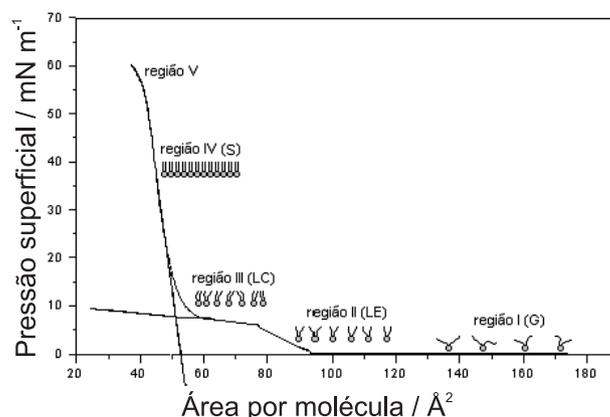


Figura 3. Isoterma de pressão de superfície para uma monocamada de DPPC puro. Representação esquematizada das fases de uma monocamada de Langmuir com as diferentes regiões de compressão do filme: região I: fase gasosa, as moléculas estão muito longe umas das outras, não há interação entre elas e a pressão superficial é zero; região II: fase líquido-expandida (LE), as moléculas se aproximam, de tal modo que uma pode sentir sua vizinha mais próxima, mais ou menos entre 100 e 80 Å²; região III: fase líquido-condensada (LC), aqui a proximidade entre as moléculas aumenta e algumas se tocam, aproximadamente entre 60 e 50 Å². A região IV (mais ou menos entre 50 e 45 Å²) equivale à fase condensada ou sólida (S) em que as moléculas estão empacotadas de tal modo que se a monocamada for comprimida um pouco mais ocorre colapso. Esta é a região V, em que o colapso do filme pode dar lugar a agregados, dissolução na subfase, bicamadas e multicamadas, abaixo de aproximadamente 45 Å²

onde a compressibilidade (C), definida por $C = -1/A (\partial A/\partial \pi)_{T, P, ni}$ (onde n é o número de moles do material), é alta. Nesta última, a compressibilidade é menor que no caso LE, mas ainda não se tem o empacotamento molecular da fase sólida. Pode também ocorrer coexistência das fases LE e LC, como mostrado na Figura 3. Para áreas ainda menores, a compressibilidade da monocamada diminui drasticamente, atingindo uma fase “sólida” (S) ou melhor denominada como “condensada” (C), própria de um cristal bi-dimensional. O colapso ocorre quando o ordenamento cristalino é destruído, a monocamada forma estruturas diferentes daquela monomolecular. Uma linha traçada na região da fase sólida pode ser extrapolada ao eixo x, sendo esta interseção conhecida como a área limite da dispersão molecular e representada como a área ocupada por uma molécula que não pode ser mais comprimida em uma monocamada de Langmuir.

Fatores que afetam as isotermas de pressão de superfície

Para um composto tradicional, como o ácido esteárico, a contribuição mais importante para a pressão de superfície medida é a repulsão estérica entre as caudas, uma vez que o filme é bastante condensado – ou seja, a pressão de superfície só começa a aumentar significativamente para pequenas áreas por molécula, em cerca de 25 \AA^2 . Isso significa que não há interações de longo alcance contribuindo para a pressão, que só aumenta consideravelmente quando se aproxima da área mínima (de máximo empacotamento) ocupada por uma cauda (20 \AA^2). A isoterma para o ácido oléico, ácido carboxílico com uma ligação dupla no início da cauda hidrofóbica, próximo do COOH, por outro lado, é consideravelmente mais expandida, uma vez que a pressão de superfície deixa de ser nula para áreas superiores a 40 \AA^2 . Isto se deve às interações de alcance mais longo entre o grupo levemente polar introduzido pela ligação dupla com as moléculas da água. Efeitos ainda mais drásticos, com pressões não nulas para áreas superiores a 100 \AA^2 em compostos com uma única cadeia hidrofóbica, são observados em casos em que um grupo polar, como um sulfóxido, é colocado no final da cadeia¹⁷.

Já a inserção de substâncias num filme de Langmuir pode trazer efeitos variados, dependendo da localização da substância e também de se elas estão carregadas negativa ou positivamente, ou se são neutras no pH da água. A maioria dos filmes tradicionais, de fosfolípidos como o DPPG e o DPPC, tem sua área – no estado condensado – ditada pelas caudas. É por isso que as áreas por molécula sob altas pressões são em geral múltiplos de 20 \AA^2 (para compostos de uma única cadeia a área por molécula na fase condensada é de 20 \AA^2 , para um lípido de cadeia dupla esta área passa a ser da ordem de 40 \AA^2). Assim, se uma dada substância é inserida na região das caudas de um filme de lípido, deve-se esperar que a área por molécula de lípido aumente (o filme se expande). Se a incorporação se der nas vizinhanças do grupo polar, é mais difícil prever os resultados. A incorporação tanto pode gerar um aumento de área por lípido como simplesmente não afetar esta área. Uma outra possibilidade é que a incorporação da substância afete as próprias interações entre as moléculas do lípido, e neste caso até mesmo uma condensação do filme pode ocorrer, isto é, a área por molécula de lípido diminui na presença da substância.

Um exemplo de expansão da isoterma é a incorporação de dipiridamol (DIP), um fármaco vasodilatador¹⁸, a um fosfolípido (DPPC). A Figura 4a mostra que o filme de DPPC é mais afetado para concentrações em torno de 0,3 – 0,5 mol%. Analisando inicialmente os resultados de pressão, notam-se dois regimes: para concentrações menores que 0,5 mol%, o filme misto apresenta uma área por molécula de DPPC menor do que para o filme puro. Ou seja, há condensação da monocamada, mais evidente na região compreendida entre as fases LE/LC. Isso indica que o DIP já altera o estado da monocamada na razão de 1 molécula de DIP para > 100 moléculas

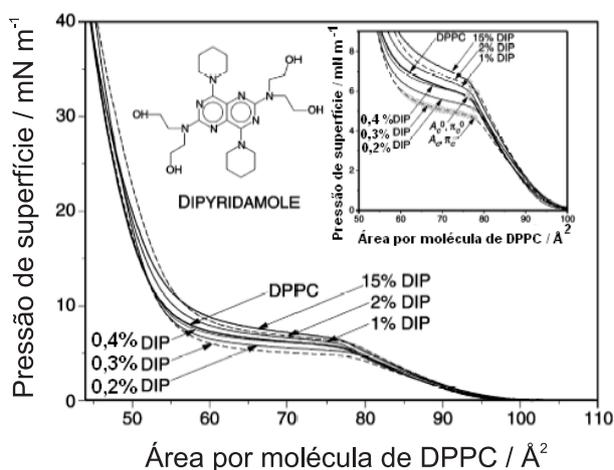


Figura 4a. Isotermas pressão-área para monocamadas ($T=21^\circ\text{C}$) de DPPC puro sobre subfase aquosa e na presença de dipiridamol (1 a 15 mol%). Reproduzida da ref. 18 com permissão da Elsevier

de DPPC. Nas concentrações a partir de 0,3-0,4 mol% um efeito de reexpansão da monocamada começa a ser discretamente observado. Com 2 mol% de DIP, é possível notar um efeito de saturação da monocamada na presença do fármaco^{18,19}. A partir desta concentração até cerca de 15 mol% DIP, nenhum efeito adicional de expansão é observado nas isotermas. É importante salientar que a condição necessária para a existência de camadas monomoleculares é a de que a substância se espalhe na interface.

As isotermas de pressão de superfície de materiais não anfífilos são mais difíceis de analisar. Em primeiro lugar, porque o filme de Langmuir pode não ser monomolecular devido à tendência de agregação do material na interface ar/água. Os polímeros, por exemplo, quando espalhados na superfície da água possuem um empacotamento que é determinado, principalmente, pelas forças coesivas da cadeia com a água. Assumem uma conformação bem diferente das moléculas anfífilas, devido à tendência de enovelamento²⁰. A análise das fases das isotermas é prejudicada pela polidispersividade (diferentes tamanhos de cadeia das macromoléculas) e pelas diferentes estruturas terminais que as cadeias podem possuir, resultando em uma composição não homogênea do sistema. Utiliza-se normalmente a massa do monômero como a unidade para os cálculos da área somente para padronização dos experimentos. A Figura 4b mostra a isoterma obtida para o filme de polianilina, cuja estrutura está mostrada numa inserção da Figura 4b.

Problemas experimentais durante as medidas de pressão de superfície podem ocorrer devido a impurezas na monocamada, na cuba ou na subfase; solubilidade do material espalhado ou excesso de material espalhado. Esses problemas se refletem na irreprodutibilidade das isotermas.

POTENCIAL DE SUPERFÍCIE

Uma técnica de medida utilizada há várias décadas para filmes de Langmuir é a da medida do potencial de superfície, ΔV . Este potencial é definido como a diferença de potencial entre uma superfície aquosa recoberta com o filme de Langmuir e uma superfície sem monocamada. O potencial pode ser medido empregando-se uma prova de Kelvin ou prova do capacitor vibrante. Nesta técnica, uma das placas do capacitor vibra acima da superfície da água e a outra é a própria superfície da água. Esta última serve como referência, cujo potencial é determinado por uma placa metálica imersa na subfase. A diferença de potencial (ΔV) surge devido à presença de dipolos elétricos permanentes do material que compõe o filme ou da dupla

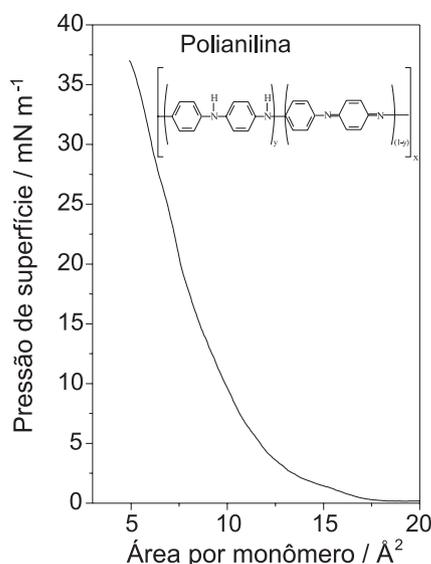


Figura 4b. Isotermas pressão-área para a polianilina. A estrutura da polianilina está mostrada na inserção. Reproduzida da ref. 35 com permissão da ACS

camada formada na interface filme/água. Modelos teóricos têm sido empregados para relacionar os potenciais medidos com os momentos de dipolo das moléculas constituintes do filme. O mais utilizado é o de Demchak e Fort (DF)²¹, no qual o filme é tratado como um capacitor de três camadas, cada qual com um momento de dipolo efetivo e uma constante dielétrica local (ver Figura 5). O potencial de superfície no modelo DF é escrito como:

$$\Delta V = 1/A\epsilon_0 (\mu_1/\epsilon_1 + \mu_2/\epsilon_2 + \mu_3/\epsilon_3) + \Psi_0 \quad (2)$$

onde A é a área média por molécula. μ_1 , μ_2 e μ_3 são, respectivamente, as contribuições dos dipolos da água reorientada na interface da monocamada com a subfase, dos dipolos na interface água – filme e dos dipolos na interface ar-filme. Ψ_0 é a contribuição da dupla camada de Gouy-Chapman^{22,23}, que aparece quando se forma uma dupla-camada para filmes parcial ou totalmente ionizados.

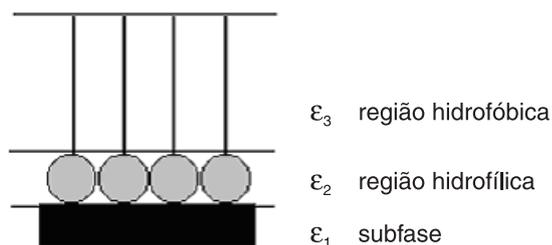


Figura 5. Modelo de Demchak e Fort para explicar o potencial de superfície da monocamada, onde a monocamada é tratada como um capacitor de três camadas

Para grandes áreas por molécula o potencial de superfície devido ao filme é geralmente zero, ou seja, as interações entre as moléculas são razoavelmente ‘fracas’ para que a ponta de prova detecte alguma variação significativa no potencial da subfase líquida. Com o filme não estruturado, os dipolos das moléculas estão imersos em um meio de constante dielétrica muito alta (basicamente água), o que também contribui para um potencial muito pequeno ou nulo. Durante a compressão do filme, existe uma área crítica na qual o

potencial deixa de ser nulo e aumenta, muitas vezes abruptamente, com a diminuição da área por molécula. Em alguns casos, o potencial atinge um patamar, característico de um filme mais organizado. A área crítica é invariavelmente maior que aquela em que a pressão de superfície deixa de ser nula, ou seja, o potencial de superfície é mais sensível à organização do filme de Langmuir. A Figura 6 mostra uma curva típica de potencial de superfície para ácido esteárico. Esta curva pode ser explicada com o modelo de Demchak e Fort²⁴, a partir de hipóteses de como as constantes dielétricas efetivas das 3 camadas se alteram com a área por molécula.

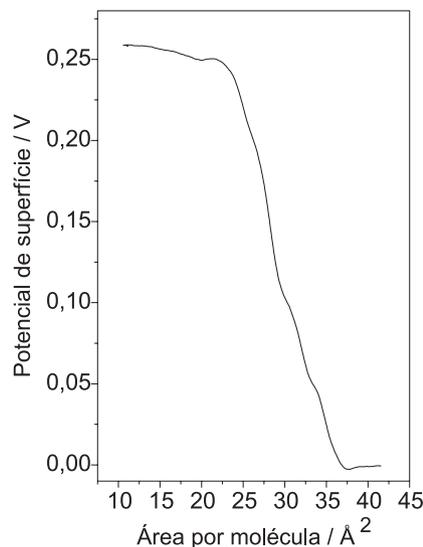


Figura 6. Isoterma de potencial para o ácido esteárico

No caso de filmes de Langmuir de moléculas maiores ou polímeros, não é possível fazer um tratamento quantitativo do potencial de superfície, pois não se sabe a orientação precisa dos grupos que contribuem para a componente vertical do momento de dipolo. As curvas de potencial de superfície são então usadas para comparação entre materiais diferentes ou mesmo para filmes obtidos do mesmo material sob condições diferentes. Por exemplo, quando há agregação de moléculas mesmo em grandes áreas por molécula, o potencial de superfície é não nulo. Alterações consideráveis da orientação das moléculas também causam mudanças detectáveis na curva de potencial.

DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM ÂNGULO RASANTE NA INTERFACE AR-ÁGUA (GIXD)

As técnicas convencionais utilizadas na caracterização das propriedades estruturais de monocamadas e filmes LB (pressão, potencial de superfície, FTIRRAS, etc.) não são capazes de fornecer informação direta do seu grau de ordenamento na interface (ar-água ou ar-sólido). O advento de fontes de raios X com alta intensidade de fótons, obtidos em vários comprimentos de onda, gerada nos grandes laboratórios de luz síncrotron, em conjunto com o desenvolvimento da técnica de difração de raios X específica para os estudos na superfície (GIXD), revolucionou o estudo de filmes de Langmuir na última década. É possível, agora, investigar a estrutura cristalina desses filmes com uma resolução próxima do nível atômico²⁵⁻²⁷.

Nos experimentos de GIXD (abreviação de “grazing incidence X-ray diffraction”), o princípio da reflexão total de raios X é empregado^{25,26}. Resumidamente, o aparato experimental e o princípio da técnica são representados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Quando um feixe de raios X atravessa uma monocamada, depositada so-

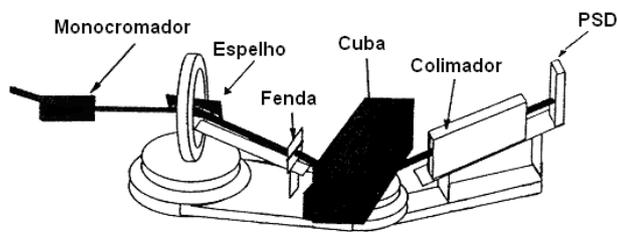


Figura 7. Diagrama esquemático de uma cuba de Langmuir acoplada ao aparato de GIXD. Um detector linear sensível à posição move-se horizontalmente para medir o perfil de difração em função do vetor de transferência de momento no plano q_{xy} . PSD: detector sensível à posição

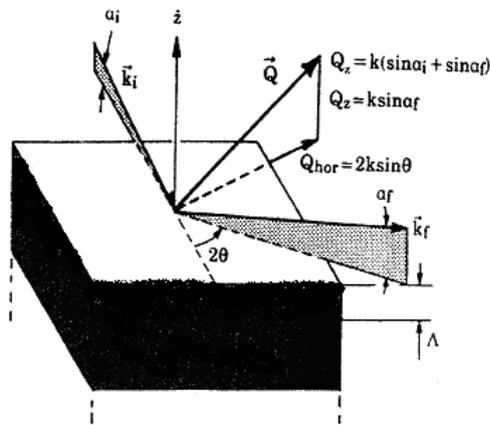


Figura 8. Geometria GIXD. A penetração Λ pode ser limitada em algumas dezenas de Ângstroms. Reproduzida da ref. 29 com permissão da Biophysical Society

bre um substrato sólido ou líquido, o espalhamento do substrato é dominante, uma vez que seu volume é muito maior que o da monocamada. Para reduzir a intensidade espalhada do substrato, um pré-requisito fundamental é diminuir a “profundidade” de penetração Λ da onda evanescente (Figura 8). Isto requer que o feixe de raios X incida sobre a superfície da água ou substrato em ângulos muito baixos ($\alpha_i \sim 0,1^\circ$), onde o ângulo de incidência $\alpha_i = 0,85\alpha_c$ (ângulo crítico para a reflexão total)^{25,26,28,29}. Uma vez que o índice de refração para raios X é ligeiramente menor que 1, o feixe incidente praticamente sofre reflexão total e apenas uma onda refratada evanescente penetra na subfase ($\sim 50 \text{ \AA}$), decaindo exponencialmente com Λ ^{25,26,28,29}.

Os fótons espalhados são detectados acima da superfície em várias direções, em termos de espaço recíproco, em vários valores de componentes no plano e na direção normal ao plano da transferência de momento do vetor de espalhamento. Qualquer periodicidade nas posições das moléculas origina um pico da intensidade de radiação espalhada. O feixe de raios X atinge a interface ar/água em um ângulo α_i sobre a monocamada e é refletido num ângulo α_r com um ângulo de difração 2θ em relação ao plano, como mostra a Figura 8. O vetor da radiação espalhada é dividido em uma componente no plano q_{xy} (igual a $(q_x^2 + q_y^2)^{1/2}$) e outra componente fora do plano $q_z (= k(\sin\alpha_i + \sin\alpha_r) \sim k\sin\alpha_i)$. A componente horizontal da estrutura no plano, enfatizada neste trabalho, pode ser definida²⁵ como:

$$Q_{\text{hor}} = q_{xy} = (q_x^2 + q_y^2)^{1/2} = k(\cos^2\alpha_i + \cos^2\alpha_r - 2\cos\alpha_i\cos\alpha_r\cos 2\theta)^{1/2} \quad (3)$$

portanto:

$$q_{xy} \sim 2k\sin\theta, \quad \text{onde } k = 2\pi/\lambda \quad (4)$$

Nos experimentos convencionais a difração de um conjunto de planos em cristais 3D possuindo espaço interplanar de distância d ocorre apenas quando a lei de Bragg é obedecida. Portanto, o vetor de espalhamento $|q| = |k_r - k_i| = (4\pi/\lambda)\sin\theta = 2\pi/d^*$, onde $d^* = ha^* + kb^* + lc^*$. d^* é o recíproco de d e os termos a^* , b^* e c^* são os vetores recíprocos da cela unitária a, b e c ; h, k, l são números inteiros que representam os índices de Miller. Para um cristal 2D (bidimensional) não existe restrição sobre o componente do vetor de espalhamento q_z , normal ao filme. Assim, o espalhamento de Bragg estende-se como “bastões” contínuos (denominados “Bragg rods”²⁵) além dos pontos do retículo 2D. O vetor q_z estende-se sobre um intervalo finito pois a espessura do cristal 2D é finita. Portanto, uma monocamada condensada que apresenta uma periodicidade no plano pode ser considerada como um “pó” bidimensional, consistindo de pequenos cristais 2D aleatoriamente orientados na interface²⁵. É necessária apenas uma varredura em q_{xy} ou 2θ no plano da monocamada para medir o seu padrão de difração, fazendo com que a análise dos dados seja similar à de um padrão de pó 3D convencional. As reflexões podem ser indexadas por dois índices de Miller, h e k . Suas posições angulares $2\theta_{hk}$ correspondem a $q_{hk} = (4\pi/\lambda)\sin\theta_{hk}$ levando às distâncias repetidas $d_{hk} = 2\pi/q_{xy-\text{máx}}$ da estrutura do retículo 2D, onde $q_{xy-\text{máx}} = q_{hk}$ representa o valor do vetor de transferência de momento na posição máxima em que os picos de Bragg são determinados¹⁹.

Como um exemplo da aplicação da técnica de GIXD, mostramos as alterações observadas em monocamadas de DPPC devido à presença de DIP¹⁹, com a posterior comparação com os efeitos nas isotermas de pressão (Figura 4a). Uma informação direta do empacotamento molecular utilizando medidas de GIXD nas monocamadas de lipídio na interface líquida pode ser útil para avaliar se a expansão observada na fase LE-LC é principalmente devida a uma expansão real do empacotamento do DPPC devido à interação droga-lipídio, e não apenas devido à partição de DIP em uma certa fração de área na monocamada. As Figuras 9 e 10 mostram os picos de difração no plano (integradas em q_z) para DPPC puro e para as monocamadas mistas com 2 e 10% de DIP, respectivamente, adquiridos respectivamente em 20 e 45 mN/m¹⁹. Os valores de q_{xy} estimados dos máximos dos picos para DPPC em diversas pressões e concentrações de DIP são apresentados na Tabela 1. Pela posição do máximo dos picos, os valores de distâncias do retículo 2D podem ser diretamente calculados e sua simetria de retículo estimada. Os dois picos obtidos em todas as regiões de pressão (ver Tabela 1) podem ser indexados como um pico degenerado contendo as reflexões $1,1 + 1,1'$, e $0,2$ para um empacotamento com retículo retangular centrado descrito na literatura^{19,27}. Um pico máximo em $q_z > 0$ para o pico contendo as reflexões $1,1 + 1,1'$, indicando inclinação da cadeia em relação ao vizinho próximo (NN) é observado para todas as pressões^{26,28,29}.

As distâncias estimadas do retículo hexagonal distorcido d_{02} e d_{11} ^{25,26} e a área ($2A_{xy}$) da cela unitária para o sistema DIP/DPPC são também apresentadas na Tabela 1. O valor de área para a cela unitária obtida dos experimentos de difração é de 45 \AA^2 , em ótima concordância com os valores de área de DPPC puro²⁹, e também com o valor de $44,5 \text{ \AA}^2$ para uma monocamada condensada de DPPC obtida das isotermas π -A na fase condensada C (40 mN/m). Além disso, os dados obtidos de GIXD apresentam o mesmo valor de área por cela unitária para as monocamadas condensadas acima de 30 mN/m (Tabela 1), mesmo na presença de 2 ou 10% de DIP, o que sugere que as moléculas de droga não afetam o empacotamento do DPPC na monocamada na sua fase condensada.

Os dados de GIXD permitiram construir um modelo no qual a expansão observada na fase LE-LC é principalmente devida a uma expansão real do empacotamento do DPPC, e não apenas devida à partição de DIP. Levando-se em conta os dados de GIXD e das isotermas, pode-se observar que a expansão do retículo ocorreu atra-

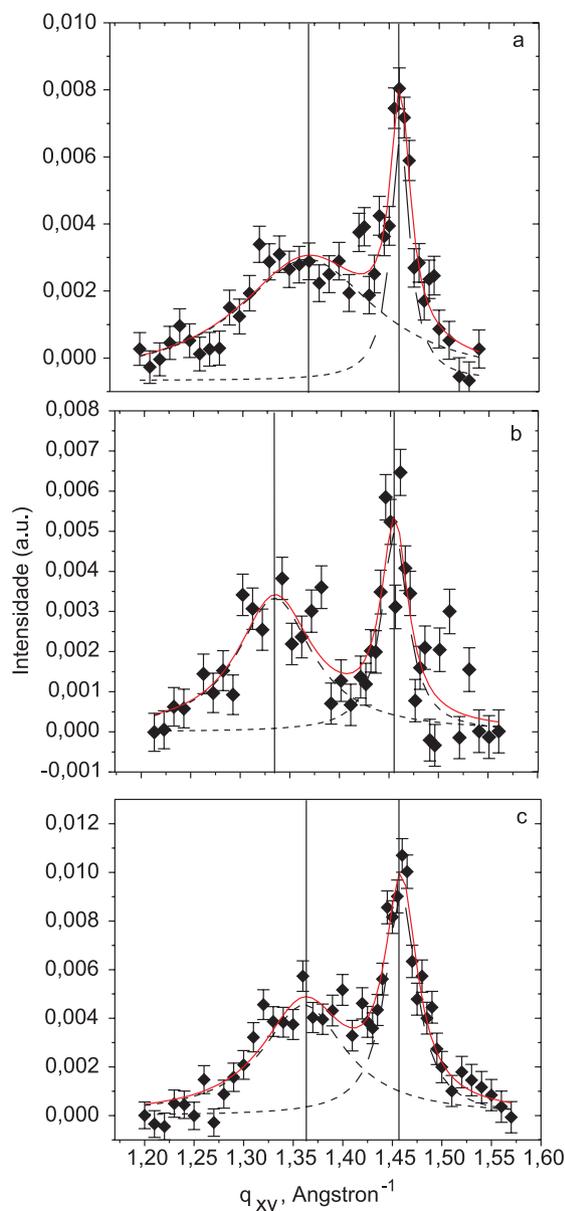


Figura 9. Intensidade de espalhamento no plano de monocamadas mistas DIP/DPPC em função de q_{xy} em $\pi = 20$ mN/m: (a) DPPC puro, (b) DPPC mais DIP 2% e (c) DPPC mais DIP 10%. As linhas cheias representam o ajuste dos pontos experimentais por duas lorentzianas ($\lambda=1.488\text{\AA}$). Reproduzida da ref. 19 com permissão da Elsevier

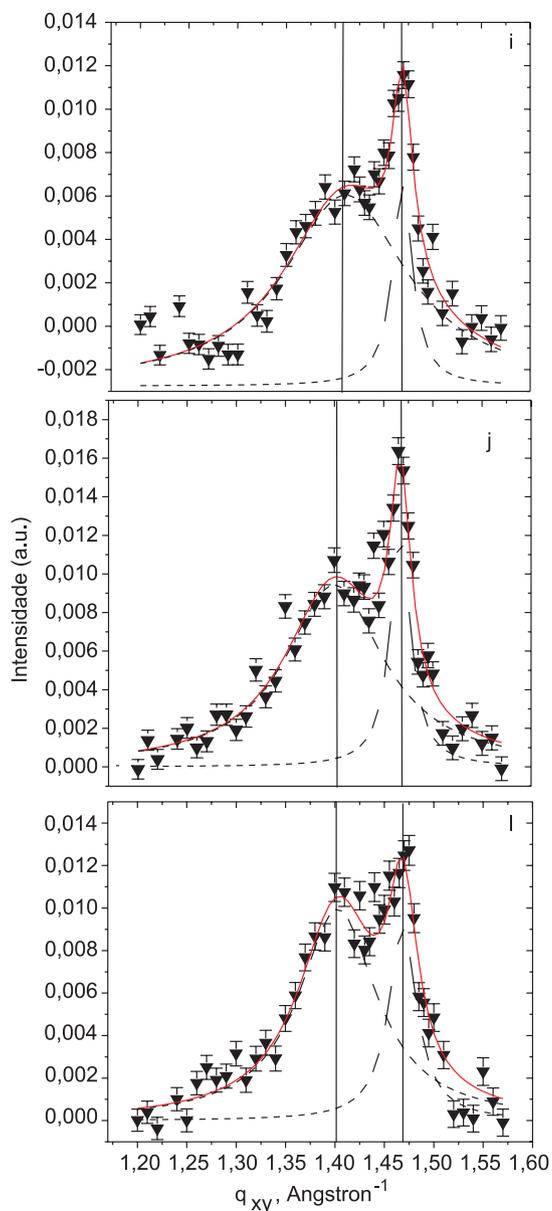


Figura 10. Intensidade de espalhamento integrado em q_z de monocamadas mistas DIP/DPPC em função de q_{xy} em $\pi = 45$ mN/m: (i) DPPC puro, (j) DPPC mais DIP 2% e (l) DPPC mais DIP 10%

Tabela 1. Parâmetros do retículo recíproco q_{xy} e real d_{hk} , respectivos valores de área molecular total $2A_{xy}$ para DPPC, obtidos de medidas de GIXD em monocamadas mistas DIP-DPPC em vários valores de pressão de superfície: a. DPPC puro; b. na presença de 2% de DIP; c. na presença de 10% de DIP

π (mN/m)	$q_{xy1}[\text{\AA}^{-1}]$	$q_{xy2}[\text{\AA}^{-1}]$	$d_{02}[\text{\AA}]$	$d_{11}[\text{\AA}]$	$2A_{xy}[\text{\AA}^2]^*$
20	^a 1.461 ± 0.001	1.37 ± 0.01	4.30	4.60	46.4
	^b 1.457 ± 0.003	1.32 ± 0.01	4.31	4.82	49.9
	^c 1.459 ± 0.001	1.36 ± 0.01	4.30	4.61	47.3
30	^a 1.463 ± 0.001	1.379 ± 0.005	4.29	4.56	46.2
	^b 1.464 ± 0.001	1.384 ± 0.008	4.29	4.54	46.0
	^c 1.461 ± 0.001	1.369 ± 0.005	4.30	4.58	46.5
45	^a 1.472 ± 0.001	1.396 ± 0.002	4.27	4.50	45.2
	^b 1.470 ± 0.001	1.399 ± 0.003	4.27	4.49	45.2
	^c 1.471 ± 0.001	1.396 ± 0.005	4.27	4.50	45.2

* $2A_{xy}$ é estimado de $(a \times b)$ [19], $b=2d_{02}$ e $a^2=1/(d_{11}^{-2} - b^{-2})$.

vés da interação do DIP basicamente na região de cabeça polar. Além disso, um efeito menor sobre o empacotamento do retículo do lipídio foi observado para frações molares mais altas de droga.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO-REFLEXÃO DE INFRAVERMELHO (FT-IRRAS)

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho (λ na região de 1-100 μm) fornece informações a respeito dos modos de vibração das ligações químicas de uma molécula. O número de modos vibracionais associados com as moléculas poliatômicas pode ser significativo. Uma molécula de N átomos pode conter $3N-5$ modos normais de vibração se ela é linear e $3N-6$ se é não-linear³⁰. A forma destas vibrações pode ser obtida do conhecimento dos comprimentos das ligações e ângulos, e das constantes de força do estiramento e de flexão (deformação) dos ângulos da ligação (outros modos de vibração também podem estar presentes além destes dois). Por outro lado, nem todas as partes da molécula são caracterizadas por vibrações de grupos ligados. Muitos modos normais envolvem fortes acoplamentos entre modos de estiramento ou flexão de átomos em cadeias lineares ou anéis. Tais vibrações são denominadas vibrações do esqueleto e tendem a ser específicas para uma molécula particular. Por esta razão, a região do espectro onde estas vibrações ocorrem para uma molécula, geralmente abaixo de 1400 cm^{-1} , é denominada de região de “impressão digital” da molécula.

No estudo de filmes de Langmuir e LB têm sido empregadas três variedades da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): medidas de absorção em transmissão (FTIR), reflexão-absorção em ângulo rasante (FT-IRRAS ou RAIRS) e refletância total atenuada (FT-ATR), mais comum em filmes LB. No modo de FTIR – transmissão, o filme LB é atravessado pelo feixe e as intensidades das bandas de absorção informam a possível quantidade relativa e conformação de vários grupos químicos presentes nas moléculas do filme. As outras técnicas fornecem informação adicional a respeito da orientação dos grupos moleculares no substrato: a técnica de FT-IRRAS, com feixe polarizado, é sensível ao componente de um momento de dipolo perpendicular ao substrato. A técnica de FT-ATR com feixe polarizado, que envolve a reflexão interna múltipla do feixe da radiação dentro do substrato, pode fornecer valores de razões dicróicas de várias bandas de absorção, que podem ser analisadas para se obter a orientação média de um dado grupo químico. Apesar do seu potencial no estudo estrutural das monocamadas, a aplicação da técnica de FT-IRRAS *in situ* na interface ar-água apresenta algumas dificuldades inerentes. Em primeiro lugar, os momentos de transição são relativamente fracos; os coeficientes de absorção são, tipicamente, cerca de 20 a 1000 vezes menos intensos que os momentos de transição eletrônica. Um outro fator é que a refletividade do infravermelho na água é pequena. Além disso, há um efeito significativo do “background” nas medidas, pois a intensidade de absorção ou reflexão resultante da interação da radiação IV com a monocamada ou filme LB é muito baixa, devido ao pequeno número de moléculas na amostra (filme). Contribuem para este “background” as bandas intensas de água líquida e vapor de água e CO_2 , que costumam interferir na região do infravermelho-médio.

A utilização de FT-IRRAS em filmes de Langmuir de DPPC com dipiridamol permitiu que se determinasse a localização exata da interação do fármaco com o filme¹⁸, observando-se quais regiões do filme eram afetadas. A Figura 11 mostra uma comparação das bandas referentes aos diferentes modos de vibração da região da cabeça polar do DPPC^{31,32}. Estas incluem a banda de estiramento da carbonila ($\nu_s(\text{C}=\text{O})$ em 1735 cm^{-1}); as bandas dos modos de estiramento do grupo fosfato ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$ e $\nu_s(\text{PO}_2)$ em ~ 1228 e 1085 cm^{-1} , respectivamente) e a banda atribuída ao modo de estiramento do grupo C-N⁺-C na

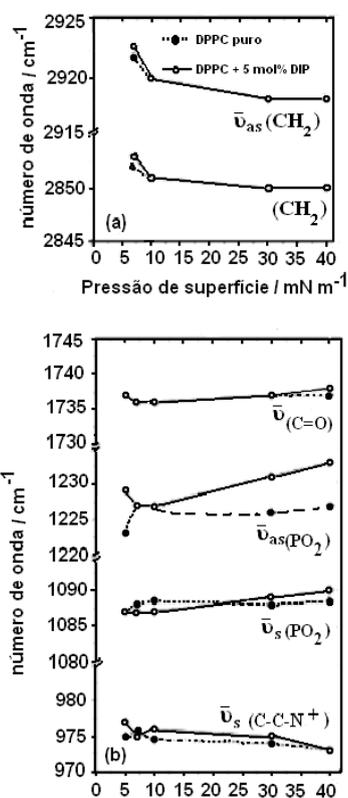


Figura 11. Comparação entre as frequências de vários modos de vibração do lipídio, determinada por FT-IRRAS, em monocamadas de DPPC puro (símbolos cheios) e DPPC com 5% de DIP (símbolos vazios) $T = 21 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Reproduzida da ref. 18 com permissão da Elsevier

colina ($\nu_s(\text{CN}^+\text{C})$ em $\sim 975\text{ cm}^{-1}$). As bandas menos intensas foram atribuídas ao modo de flexão das cadeias acila ($\delta(\text{CH}_2)$ em $\sim 1470\text{ cm}^{-1}$) e a de absorção do grupo éster C-O-C ($\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ em $\sim 1170\text{ cm}^{-1}$), que se apresentaram com baixa intensidade e resolução. Diferenças significativas em relação ao lipídio puro na associação do DIP com a interface foram observadas em valores altos de pressão de superfície ($> 30\text{ mN/m}$), e somente para o grupo fosfato, o que é consistente com o fato de os modos de estiramento do fosfato terem se mostrado sensíveis à associação periférica de moléculas adsorventes³³. Variações de $\Delta\nu \sim 7$ e 2 cm^{-1} (com uma resolução de 4 cm^{-1} e aquisição de 1024 espectros) foram observadas respectivamente para $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$ e $\nu_s(\text{PO}_2)$ no estado ordenado LC. As bandas dos outros estados vibracionais apresentaram-se idênticas dentro da resolução experimental das medidas com e sem DIP. Também não foram afetadas as bandas características das caudas do DPPC. Com estes resultados, foi possível concluir que o DIP se associa ao grupo fosfato do dipolo iônico do DPPC.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A análise da fluorescência emitida com a excitação de filmes de Langmuir pode fornecer informações estruturais bem como a dinâmica de possíveis mudanças químicas ou estruturais. Quando as moléculas constituintes dos filmes contêm corantes ou cromóforos que emitem luz, o filme pode ser estudado por microscopia de fluorescência. A fluorescência de um material ou de um corante incorporado na monocamada pode ser excitada pela incidência de luz tanto da água como do ar no modo de transmissão ou reflexão. Uma vez que a solubilidade da sonda de fluorescência depende do estado da monocamada, o contraste gerado nas imagens indica as mudanças desses estados. As informações obtidas por estas técnicas são,

em geral, associadas à formação de agregados moleculares e de domínios nos diversos estágios de compressão do filme. A Figura 12 mostra uma micrografia de fluorescência para um fosfolípido, DPPC, com o filme de Langmuir em diferentes estágios de compressão, com e sem a presença de DIP. Filmes de DPPC apresentam uma transição de fase nas isotermas de pressão, que corresponde ao estágio em que o filme passa de um empacotamento líquido-expandido para um líquido-condensado. Como o DPPC não é fluorescente, as micrografias são obtidas em filmes de DPPC que contêm uma sonda fluorescente, usualmente rodamina. A sonda tem preferência pelos domínios com moléculas na fase líquido-expandida gerando, portanto, o contraste visualizado nas micrografias, em que os domínios escuros correspondem a moléculas no estado líquido-condensado. A evolução da morfologia mostra, assim, como o arranjo molecular evolui do estado líquido-expandido para o líquido-condensado. Os domínios bem definidos consistem basicamente de estruturas quirais que se apresentam na forma de 'braços' ou 'hélices' e que se orientam na direção anti-horária. Esta orientação preferencial assumida pelos domínios está diretamente relacionada ao tipo de quiralidade da molécula de lipídio empregada nos experimentos^{18,34}. Nos valores de pressão de cerca de 9 mN/m e maiores (c-d), as micrografias de fluorescência revelam a transição para a fase LC e LC-C da monocamada. A visualização da fusão dos domínios, ou transição para a fase condensada pelo microscópio, resulta em um ambiente mais homogêneo sentido pela sonda, principalmente observada através de perda significativa do contraste, com supressão parcial ou total da fluorescência, dependente do anfifílico.

Para as monocamadas contendo a droga DIP (Figuras 12 b-d), as estruturas dos domínios são afetadas e mais bem visualizadas na região de transição de fase LE-LC. Na concentração de 0,2 mol% de DIP, os domínios possuem uma maior quantidade de estruturas na forma de braços ou multi-hélices que o observado nos domínios de lipídio puro. As mudanças visuais causadas pela droga na morfologia dos domínios progredem com a compressão para formas de estruturas alongadas e finas, espiraladas ou na forma 'helicoidal' surgindo nas regiões de fronteira e centros de nucleação dos domínios e que, em todos os casos, sempre parecem se orientar na direção anti-horária. A quiralidade dos fosfolípidos é, portanto, preservada nas monocamadas mistas DIP/DPPC.

O DIP possui uma intensa fluorescência centrada em 500 nm (emissão de luz verde, $\lambda_{exc} \sim 415$ nm), porém foi necessário o uso de

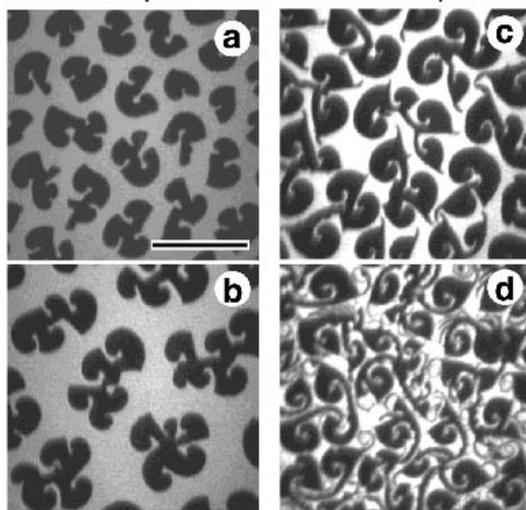


Figura 12. Micrografias de filmes de Langmuir de DPPC puro (a), e misto com 0,2 mol% de DIP (b-d). A pressão de superfície aumentou da micrografia "b" para a "d". Reproduzida da ref. 18 com permissão da Elsevier

uma sonda fluorescente devido à impossibilidade de visualização dos domínios do DPPC monitorado pela fluorescência da própria droga. Este efeito poderia ser atribuído a uma partição da droga igualmente nas duas fases coexistentes da monocamada.

FILMES LANGMUIR-BLODGETT (LB)

A organização das moléculas em filmes LB (nanoestruturados) pode gerar propriedades bastante distintas daquelas observadas para o mesmo material em outras formas, como em filmes mais espessos ou em pastilhas. No caso de filmes mistos, o contato íntimo das moléculas dos componentes diferentes pode provocar interações que também não ocorrem em outros tipos de filmes. Não é incomum que as propriedades dos filmes mistos difiram consideravelmente das propriedades dos materiais em separado. A interação ainda no filme de Langmuir, sobre subfase aquosa, pode ser identificada mesmo para compostos macromoleculares. Há duas possibilidades principais para filmes mistos com 2 componentes: i) separação de fases entre os componentes, caso em que a área por molécula varia linearmente com a concentração relativa dos componentes. Neste caso, não há interação no nível molecular entre os componentes ii) com interação no nível molecular, e não havendo miscibilidade ideal, a área por molécula não varia linearmente com a concentração relativa. Os valores experimentais serão maiores ou menores que os previstos numa dependência linear se a interação for repulsiva ou atrativa, respectivamente. A Figura 13 mostra que para filmes de Langmuir de polianilina (PANI) e um complexo bifosfínico denominado Rupy, a área por molécula aumenta não linearmente com a porcentagem de Rupy adicionada à PANI, indicando a interação em nível molecular³⁵.

A interação entre os componentes no filme de Langmuir também se manifesta nos filmes LB depositados sobre substratos sólidos. Para PANI-Rupy a condutividade varia com a concentração de Rupy, como mostra a Figura 14. A explicação para uma diferença tão grande com o comportamento esperado se houvesse separação

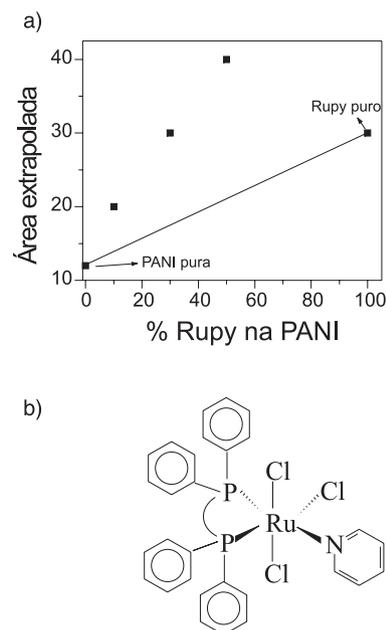


Figura 13. Área extrapolada para vários filmes de Langmuir versus % em mol de Rupy no filme. Os valores de 0 e 100% em mol representam Pani pura e Rupy puros, respectivamente. A linha corresponde ao comportamento esperado para componentes imiscíveis (a). Estrutura do Rupy (b). Reproduzida da ref. 35 com permissão da ACS

de fases, marcado pela linha na Figura 13, é que o Rupy contribui para a oxidação da PANI, como foi observado através dos espectros Raman e voltametrias cíclicas^{36,37}.

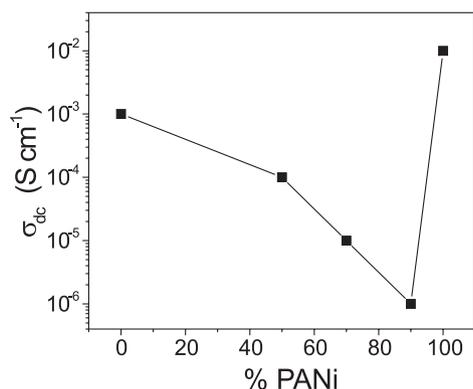


Figura 14. Medidas de condutividade para um filme LB com 31 camadas de PANI, Rupy puros e filmes mistos de PANI/Rupy 90, 70 e 50% em mol de PANI com Rupy. Os filmes foram depositados sobre eletrodos interdigitados de Au. Reproduzida da ref. 36 com permissão da Elsevier

A obtenção de propriedades distintas em filmes LB mistos alterando-se a concentração relativa dos componentes pode ser explorada em aplicações. Em primeiro lugar, pode-se otimizar uma propriedade de interesse. Além disso, pode-se obter filmes com resposta elétrica diferenciada, a partir dos mesmos componentes. Este foi o caso do sensor de paladar produzido com filmes LB mistos de PANI com Rupy²⁻⁶ ou filmes LB de polipirrol (py) mistos com Rupy. Note-se, também, que a própria capacidade de sensoriamento dos filmes LB está diretamente relacionada à interação com os analitos. No caso dos sensores de paladar, a interação entre as moléculas do filme e o analito não é específica. Há casos, entretanto, que a interação pode ser específica, o que é conseguido quando o filme LB é formado por materiais com capacidade de reconhecimento molecular. Por exemplo, filmes LB de enzimas imobilizadas, tais como glicose oxidase (GOX)^{38,39} e urease⁴⁰, têm sido amplamente utilizados como biosensores para a detecção de glicose e uréia, respectivamente.

COMENTÁRIOS FINAIS

Neste artigo procuramos mostrar que a evolução recente de técnicas de caracterização de superfícies beneficiou enormemente a capacidade de pesquisadores em estudar interações no nível molecular em filmes de Langmuir. Tomando como exemplo principal a interação de fármacos com filmes de fosfolipídios, que representam modelos simples de membranas celulares, enfatizamos como tais técnicas podem ser empregadas para determinar a localização do fármaco e os efeitos causados sobre o filme. As técnicas mais sofisticadas abordadas aqui foram a microscopia de fluorescência, difração de raios X com radiação síncrotron e espectroscopia infravermelho *in situ*. Foram mencionadas também as técnicas de pressão e potencial de superfície, que são as mais empregadas na caracterização de filmes de Langmuir. Como a caracterização de filmes de Langmuir é essencial para obter filmes LB de alta qualidade, discutimos as dificuldades de formação de filmes de Langmuir e LB de polímeros, cujo potencial de aplicações é enorme. Isto foi ilustrado com a menção ao emprego de filmes LB em sensores, em que se explora a interação em nível molecular de componentes dos filmes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- Petty, M. C.; *Langmuir-Blodgett Films – An Introduction*, Cambridge University Press: Cambridge, 1996.
- Ferreira, M.; Dinelli, L. R.; Wohnrath, K.; Batista, A. A.; Oliveira Jr., O. N.; *Thin Solid Films* **2004**, *446*, 301.
- Ferreira, M.; Riul Jr., A.; Wohnrath, K.; Fonseca, F. J.; Oliveira Jr., O. N.; Mattoso, L. H. C.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 953.
- Riul Jr., A.; Santos Jr., D. S.; Wohnrath, K.; Di Tommazo, R.; Carvalho, A. C. P. L. F.; Fonseca, F. J.; Oliveira Jr., O. N.; Taylor, D. M.; Mattoso, L. H. C.; *Langmuir* **2002**, *18*, 239.
- Borato, C. E.; Riul Jr., A.; Ferreira, M.; Oliveira Jr., O. N.; Mattoso, L. H. C.; *Instrum. Sci. Tech.* **2004**, *32*, 21.
- Riul Jr., A.; Sousa, H. C.; Malmegrim, R. R.; Santos, D. S.; Carvalho, A. C. P. L. F.; Fonseca, F. J.; Oliveira Jr., O. N.; Mattoso, L. H. C.; *Sens. Actuators, B* **2004**, *98*, 77.
- Singhal, R.; Gambhir, A.; Pandey, M. K.; Annapoorani, S.; Malhotra, B. D.; *Biosen. Bioelectron.* **2002**, *17*, 697.
- Tsuji, H.; Mitsubayashi, K.; *Electroanal.* **1997**, *9*, 161.
- Méndez-Rodríguez, M. L.; Gorbunova, Y.; Saja, J. A.; *Langmuir* **2002**, *18*, 9560.
- Babudri, F.; Farinola, G. M.; Giancane, S.; Naso, F.; Rella, R.; Scarpa, A.; Valli, L.; *Mater. Sci. Eng., C* **2002**, *22*, 445.
- Kalina, D. W.; Crane, S. W.; *Thin Solid Films* **1985**, *134*, 109.
- Cook, M. J.; Dumm, A. J.; Daniel, M. F.; Hart, R. C. O.; Richardson, R. M.; Roser, S. J.; *Thin Solid Films* **1988**, *159*, 395.
- Oliveira Jr., O. N.; *Ciência Hoje* **1990**, *12*, 18.
- Davies, J. T.; Rideal, E. K.; *Interfacial Phenomena*, San Diego, Acad. Press: EUA, 1962.
- Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira Jr., O. N.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *91*, 221.
- Schwartz, D. K.; *Surf. Sci. Rep.* **1997**, *27*, 241.
- Oliveira Jr., O. N.; Taylor, D. M.; Lewis, T. J.; Salvagno, S.; Stirling, C. J. M.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1989**, *85*, 1009.
- Caetano, W.; Ferreira, M.; Tabak, M.; Sanchez, M. I. M.; Oliveira, O. N.; Kruger, P.; Schalkke, M.; Losche, M.; *Biophys. Chem.* **2001**, *91*, 21.
- Haas, H.; Caetano, W.; Borissevitch, G. P.; Tabak, M.; Mosquera Sanchez, M. I.; Oliveira Jr., O. N.; Scalas, E.; Goldmann, M.; *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *335*, 510.
- Oliveira Jr., O. N.; Raposo, M.; Dhanabalan, A. Em *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*; Nalwa, H. S., ed.; Academic Press, 2001, vol. 4, chapter 1, p. 1.
- Demchak, R. J.; Fort Jr., T. J.; *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, *46*, 191.
- Davies, J. T.; *Proc. R. Soc. London A* **1951**, *208*, 224.
- Davies, J. T.; *J. Colloid. Sci.* **1956**, *11*, 377.
- Oliveira Jr., O. N.; Taylor, D. M.; Morgan, H.; *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 76.
- Kjaer, K.; Als-Nielsen, J.; Helm, C. A.; Laxhuber, L. A.; Mohwald, H.; *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *58*, 2224.
- Jacquemain, D.; Wolf, S. G.; Leveiller, F.; Deutsch, M.; Kjaer, K.; Als-Nielsen, J.; Lahav, M.; Leiserowitz, L.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1992**, *31*, 130.
- Kaganer, V. M.; Möhwald H.; Dutta, P.; *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779.
- Möhwald, H.; *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 441.
- Böhm, C.; Möhwald, H.; Leiserowitz, L.; Als-Nielsen, J.; Kjaer, K.; *Biophys. J.* **1993**, *64*, 553; Helm, C. A.; Tippmann-Krayer, P.; Möhwald, H.; Als-Nielsen, J.; Kjaer, K.; *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1457.
- Hollas, J. M.; *Modern Spectroscopy*, Wiley ed.: Chichester, 1992.
- Mendelson, R.; Brauner, J. W.; Gericke, A.; *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 305.
- Binder, H.; Anikin, A.; Lantzsch, G.; Klose, G.; *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 461.
- Flach, C. R.; Brauner, J. W.; Mendelsohn, R.; *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1994.
- Weis, R. M.; McConnell, H. M.; *Nature* **1984**, *310*, 47.
- Ferreira, M.; Wohnrath, K.; Torresi, R. M.; Constantino, C. J. L.; Aroca, R. F.; Giacometti, J. A.; Oliveira Jr., O. N.; *Langmuir* **2002**, *18*, 540.
- Ferreira, M.; Constantino, C. J. L.; Riul Jr., A.; Wohnrath, K.; Aroca, R. F.; Giacometti, J. A.; Oliveira Jr., O. N.; Mattoso, L. H. C.; *Polymer* **2003**, *44*, 4205.
- Ferreira, M.; Wohnrath, K.; Oliveira Jr., O. N.; *Synth. Met.* **2003**, *135*, 455.
- Singhal, R.; Takashima, W.; Kaneto, K.; Samanta, S. B.; Annapoorani, S.; Malhotra, B. D.; *Sens. Actuators, B* **2002**, *86*, 42.
- Singhal, R.; Chaubey, A.; Kaneto, K.; Takashima, W.; Malhotra, B. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *85*, 277.
- Singhal, R.; Gambhir, A.; Pandey, M. K.; Annapoorani, S.; Malhotra, B. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *17*, 697.