

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Catedra de Chimie fizică

**MODELAREA INTERACȚIUNILOR
UNOR COMPUȘI CHIMICI ASUPRA
MEMBRANELOR LIPIDICE ȘI BIOMEMBRANELOR**

Teza de doctorat

REZUMAT

Ing. chim. VASILICA-DANIELA POP (TOADER)

Conducător Științific,
Prof. Univ. Dr. MARIA TOMOAI-A-COTIȘEL

Cluj-Napoca
2010

CUPRINS

Introducere	1
1. Metode și tehnici de studiu al unor structuri orientate (model de biomembrane) la interfețe.....	2
1.1. Tensiunea și presiunea interfacială.....	3
1.2. Balanța de film monomolecular (LBT).....	9
1.3. Microscopia de forță atomică (AFM).....	15
1.4. Bibliografie.....	32
2. Filme Gibbs de adsorbție la interfețe fluide.....	35
2.1. Dinamica de adsorbție.....	35
2.2. Modelare –Experiment.....	36
2.2.1. Film de acid stearic la interfața ulei/apă.....	41
2.2.2. Filme de anestezice la interfața ulei/apă.....	52
2.3. Bibliografie.....	56
3. Filme Langmuir – modele de membrane lipidice.....	57
3.1. Izoterme de compresiune a filmelor de acid stearic.....	57
3.2. Izoterme ale filmelor de dipalmitoil fosfatidilcolină.....	59
3.3. Izoterme ale filmelor de dimiristoil fosfatidilcolină și colesterol.....	62
3.4. Structuri ale fazelor din filmele Langmuir.....	65
3.5. Efectele subfazei asupra filmelor Langmuir	69
3.6. Modelarea interacțiunilor în filmele de acizi grași	72
3.7. Bibliografie.....	79
4. Modele matematice teoretice. Structuri orientate (biomembrane).....	82
4.1. Interpolare cu funcții spline a izotermelor de compresiune.....	82
4.1.1. Tranziții de fază în biomembrană	84
4.1.2. Compresibilitatea superficială a filmelor de acizi grași.....	87
4.2. Modelarea izotermelor de compresiune cu funcții spline cubice extinse	90
4.3. Bibliografie.....	101
5. Membrane (filme) Langmuir-Blodgett. Observații de microscopie de forță atomică.....	106
5.1. Bioingineria și optimizarea condițiilor de transfer al filmelor Langmuir-Blodgett.....	106
5.1.1. Viteza de transfer a filmelor Langmuir-Blodgett.....	107
5.1.2. Presiunea de transfer a filmelor Langmuir-Blodgett.....	107
5.2. Efectele subfazei asupra filmelor Langmuir-Blodgett formate din lipide.....	108
5.2.1. Influența procainei.....	108
5.2.2. Influența deferoxaminei.....	121
5.3. Structuri ale membranelor monostrat Langmuir-Blodgett.....	127
5.4. Structuri de colaps a membranelor la interfața aer-apă.....	136
5.5. Membrane lipidice monostrat formate din dimiristoil fosfatidilcolină și colesterol.....	143
5.6. Membrane proteice formate din colagen.....	146
5.6.1. Observații AFM pe asociate moleculare de colagen	146
5.6.2. Observații AFM asupra unor medicamente anticancer.....	151
5.6.3. Morfologia membranelor de colagen în prezența medicamentelor anticancer.....	153
5.7. Bibliografie.....	157
6. Membrane biologice. Observații AFM asupra eritrocitelor.....	160
6.1. Observații microscopice ale membranei eritrocitare.....	161

6.2.Observații AFM ale eritrocitelor tratate cu procaină.....	183
6.3.Observații AFM ale eritrocitelor tratate cu deferoxamină.....	195
6.4. Bibliografie.....	213
7. CONCLUZII.....	216
8. Bibliografie generală.....	221
9. Lista publicațiilor originale.....	229

Cuvinte cheie: dinamica de adsorbție, monostraturi, bistraturi, presiune superficială, izoterme de compresiune, tehnica Langmuir, compresibilitate superficială, ecuații de stare, funcții spline, LBT, AFM, acizi grași, lipide, colesterol, anestezice, medicamente anti-cancer, eritrocite, biomembrane.

Abrevieri

AFM – microscopie de forță atomică
AL – acid linoleic
ALP –acid lipoic
AO – acid oleic
AS – acid stearic
CHOL – colesterol
COL – colagen
D - dibucaină
DFO – deferoxamină (desferal)
DPPC – dipalmitoil fosfatidil colină
DMPC - dimiristoil fosfatidil colină
DOX – doxorubicină
ECS – funcții spline cubice extinse
FLU - 5-fluorouracil
G – gaz
L - lichid
LBT – tehnica Langmuir – Blodgett
LC – lichid condensat
LE- lichid expandat
P – procaină
PEE – presiunea de etalare la echilibru
RMS – rădăcina medie pătratică
RT – raport de transfer
S - solid
SC – solid condensat
SD – deviație standard
T - tetracaină

INTRODUCERE

Dezvoltările care au loc în chimie și fizică, în industria chimică, în biofizică, în industria medicamentelor, implică cunoașterea proceselor ce caracterizează termodinamica și hidrodinamica filmelor subțiri.

Abordările moderne ale științei suprafețelor au deschis posibilități largi în domenii diferite incluzând concepte și teorii fundamentale privind descifrarea nanosistemelor coloidale care conțin surfactanți, dispersiilor coloidale, electroliților coloidali, spumelor, filmelor subțiri, filmelor Langmuir-Blodgett și modelelor de biomembrane.

A existat un interes continuu în ceea ce privește monostraturile încă de la pioneratul acestor cercetări, interes motivat de dorința de a înțelege natura forțelor de interacțiune din structurile orientate. S-au analizat cu preponderență monostraturile de acizi grași sau alcooli și fosfolipide, deoarece acestea sunt cele mai simple sisteme și au fost de-a lungul anilor subiectul multor studii.

Sistemelor lipidice constituie în prezent un domeniu de graniță, intens studiat în cercetarea biomembranelor. Aceste sisteme lipidice, bine definite chimic și accesibile pentru investigarea cu diferite tehnici, au devenit un model de studiu al proprietăților fizice și fizico-chimice ale membranei biologice.

Teza este alcătuită din șapte capitole urmate de bibliografia generală și lista de publicații. Primul capitol, teoretic descrie metodele și tehnicile folosite pentru studiul modelelor de biomembrană. Rezultatele originale sunt cuprinse în cinci capitole și am cercetat următoarele aspecte:

- Studiarea dinamicii de adsorbție a filmelor Gibbs la interfețe fluide a acizilor grași și anestezicelor cu ajutorul măsurărilor experimentale ale presiunilor interfaciale dinamice și a unor modele teoretice de cinetică de adsorbție, propunând o nouă ecuație cinetică controlată de difuziune.
- Caracterizarea izotermelor de compresiune ale filmelor insolubile Langmuir de acizi grași și lipide și căutarea unor modele matematice care să descrie cât mai exact comportamentul acestor filme. În acest sens, am folosit trei metode matematice de fitare a izotermelor de compresiune și de calcul a compresibilităților superficiale ale filmelor monomoleculare; programul de interpolare cu metoda celor mai mici pătrate și a funcțiilor spline cubice extinse dovedindu-se cel mai performant.
- Combinarea tehnicii Langmuir-Blodgett cu observațiile de microscopie atomică pentru studierea comportamentului filmelor de acizi grași, lipide și proteine, precum și pentru studierea și modelarea interacțiunilor unor compuși chimici (anestezice, colesterol, medicamente anti-cancer ș.a.) asupra lipidelor și proteinelor membranei celulare.
- Elucidarea nanostructurii membranei eritrocitare și a modificărilor acesteia în prezența unor medicamente prin observații de microscopie de forță atomică. Modelarea interacțiunilor unor medicamente cu membrana eritrocitară și vizualizarea lor cu ajutorul microscopului de forță atomică (AFM –JEOL 4210).

Înțelegerea modului în care se autoasamblează biomoleculele la interfețe fluide este esențială în elucidarea structurii și funcției acestor biomolecule. Pentru descifrarea acestor structuri am beneficiat de tehnici de vârf care furnizează informații științifice la nivel nanometric. Microscopia de forță atomică (AFM) și tehnica Langmuir-Blodgett (LBT) prezintă o combinație unică care permite cercetarea detaliată a suprafeței moleculelor individuale atât din structurile Langmuir-Blodgett cât și din structurile biologice.

2. Filme Gibbs de adsorbție la interfețe fluide

2.2. Modelare - experiment

Am studiat dinamica de adsorbție a acidului stearic din benzen la interfața benzen/apă (pH 2) și a unor anestezice locale (dibucaina și tetracaina) din soluții apoase (pH 2) la interfața benzen/apă. Tensiunea dinamică interfacială a fost măsurată prin metoda picăturii atârinate și prin metoda inelului pentru concentrații diferite de surfactant. Aceste măsurători ne dau informații despre cinetica de adsorbție și despre structura stratului de biosurfactant adsorbit la interfața lichidă. Constantele relative de viteză obținute independent din datele de dinamică de adsorbție (tabel 2.2.5) sunt rezonabile pentru sistemele investigate. Valorile relative ale constantei de viteză sunt în concordanță cu datele din literatură [98-100] și cu structura moleculară a biosurfactanților.

Tabelul 2.2.5. Constantele relative de viteză ale adsorbției (k_1/Γ_∞) și desorbției (k_2/Γ_∞).

Biosurfactant	k_1/Γ_∞ , $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$	k_2/Γ_∞ , min^{-1}	k_1/k_2 , $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$
Dibucaina	7,25	0,159	45,6
Tetracaina	4,99	0,149	33,5
Acidul stearic	0,212	0,0392	5,4

unde k_1 și k_2 sunt constantele de viteză pentru procesul de adsorbție, respectiv desorbție; Γ_∞ este coeficientul de adsorbție la echilibru, la saturarea interfeței cu molecule de biosurfactant.

Am evidențiat efectele adsorbției asupra fazei de volum în care este solubil biosurfactantul la interfața ulei/apă. Astfel, s-a observat dependența constantelor relative de viteză de structura moleculară a biosurfactanților și de natura fazei de volum în care surfactantul este solubil. Constantele cinetice sunt mai mari pentru anestezice față de cea corespunzătoare AS. Raportul k_1/k_2 este mai mare în cazul adsorbției dibucainei și tetracainei din faza apoasă la interfața ulei/apă decât raportul corespunzător adsorbției AS din benzen la aceeași interfață ulei/apă.

Aceasta se poate datora unei mari flexibilități a moleculelor lungi de AS cu lanțuri carboxilice saturate și o grupare terminală carboxilică care poate forma agregate atât în faza benzenică cât și în straturile adsorbite la interfața benzen/apă. Reorientarea moleculelor și formarea auto-asamblatelor la suprafață în timpul adsorbției monostraturilor poate explica, cel puțin parțial, coeficientul de difuziune scăzut al AS în faza benzenică.

Au fost testate ecuații cinetice controlate de difuziune sau controlate de transfer și s-a propus o nouă *ecuație cinetică controlată de difuziune* (ec. 2.2.28) pornind de la ecuația de difuziune a lui Ward și Tordai [97] asociată cu ecuația de stare bidimensională de tip van der Waals [111-115] pentru monostraturile de biosurfactant adsorbite la interfața benzen/apă.

$$\Pi = a \left[\frac{\tau^{1/2}}{1 - b\tau^{1/2}} - c\tau^{3/4} \right] = a\varphi(\tau) \quad (2.2.28)$$

cu parametrii:

$$a = 2kT(c_0 - c_s) \left(\frac{Dt_m}{\pi} \right)^{1/2}, \quad b = 2A_0(c_0 - c_s) \left(\frac{Dt_m}{\pi} \right)^{1/2}, \quad c = \frac{2^{1/2}\alpha(c_0 - c_s)^{1/2}}{kT} \left(\frac{Dt_m}{\pi} \right)^{1/4}$$

unde: Π este presiunea interfacială, A_0 aria monostratului, k constanta lui Boltzmann, T temperatura absolută, $x = 2(c_0 - c_s)(D/\pi)^{1/2}$, c_0 reprezentând concentrația surfactantului în volum, c_s concentrația surfactantului în subsuprafață, D coeficientul

de difuziune, $\pi = 3,1415\dots$, τ este o variabilă de la zero la t , t_m timpul maxim, $\tau = t/t_m$ timpul redus, α parametru de interacțiune.

În tabelul 2.2.11 și 2.2.15 sunt dați parametri ecuației (2.2.28) care ne permit construirea curbelor teoretice Π versus t . Aceste curbe sunt date în fig. 2.2.3a, 2.2.12a și 2.2.13a ca și curbe *pline*.

Tabel 2.2.11. și 2.2.15. Parametri ecuației (2.2.28) obținuți din datele experimentale ale dinamicii de adsorbție pentru cei trei biosurfactanți la interfața benzen/apă (pH 2).

Biosurfactant	C_0 , mol/l	t_m , min	Π_m , mN/m	a	b	c	$(SD)_m$, mN/m
Dibucaina	0,001	15	8,2	13,84	0	0,407	0,0028
	0,005	15	15,5	31,87	0,0039	0,518	0,0029
	0,01	15	18,9	46,14	0	0,590	0,0014
Tetracaina	0,001	15	5,2	10,31	0,0697	0,571	0,0047
	0,005	15	8,7	20,10	0,0465	0,616	0,0025
	0,01	15	11,0	26,60	0	0,586	0,0028
Acidul stearic	0,001	90	4,5	11,78	0,0813	0,706	0,0060
	0,0018	90	6,4	15,62	0	0,590	0,0046
	0,0057	90	12,1	32,86	0,0039	0,635	0,0019
	0,012	90	15,6	44,50	0	0,649	0,0019
	0,018	90	18,1	53,76	0,0019	0,665	0,0022
	0,051	90	22,0	85,43	0,163	0,937	0,0054

Se observă că ecuația (2.2.28) poate să descrie foarte bine curbele experimentale Π versus t . De asemenea, permite calcularea coeficienților de difuziune, concentrațiile subsuprafeței și parametru de interacțiune α dintre moleculele de surfactant din monostraturile adsorbite la interfața benzen/apă (tabel 2.2.12 și 2.2.16).

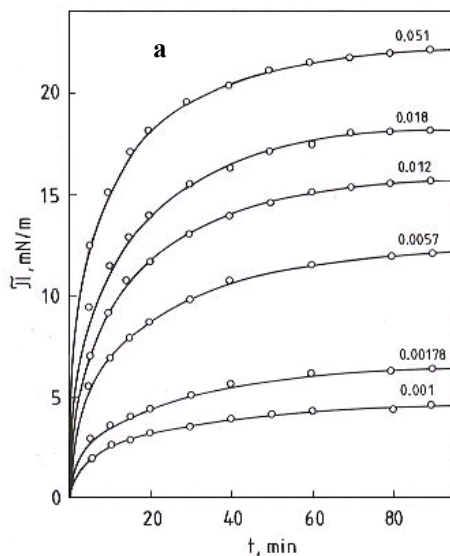


Fig. 2.2.3. Presiunea dinamică interfacială (Π , în mN/m) a soluțiilor benzenice ale acidului stearic la interfața benzen/apă (pH 2) în funcție de timp (t , min) (a). Cifrele indică concentrația în volum a AS, C_0 (mol/l), în faza benzenică.

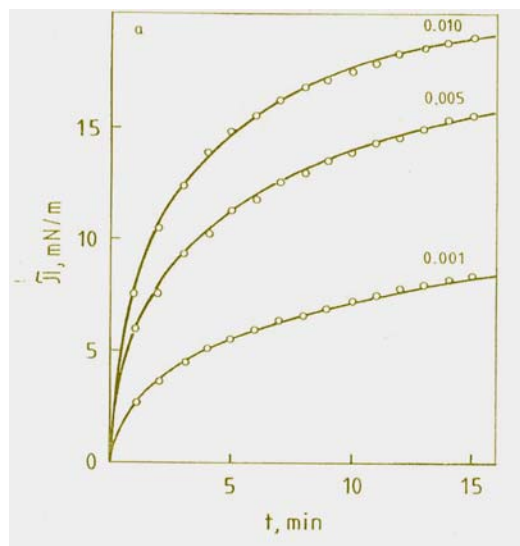


Fig.2.2.12 Presiunea superficială dinamică experimentală (Π în mN/m) pentru soluțiile apoase de dibucaină (pH2) la interfața benzen/apă, în funcție de timp (t , min)(a). Concentrația dibucainei în volum este C_0 în mol/l. Liniile continue din varianta a sunt calculate cu ec. (2.2.28).

Tabel 2.2.12 și 2.2.16. Coeficienții de difuziune D și D_0 , concentrațiile subsuprafeței C_s și parametri de interacțiune α .

Biosurfactant	$C_0, \text{mol/l}$	$D \cdot 10^{10}, \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	$D_0 \cdot 10^{10}, \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	$C_s, \text{mol/l}$	$*\alpha \cdot 10^{22}, \text{dyn cm}^2$
Dibucaina	0,001	2,84	2,84	0	8,90
	0,005	0,602		2,70	7,46
	0,01	0,316		6,67	7,07
Tetracaina	0,001	1,58	1,58	0	14,4
	0,005	0,240		3,05	11,2
	0,01	0,105		7,42	9,25
Acidul stearic	0,001	0,343	0,343	0	16,7
	0,0018	0,190		0,45	12,1
	0,0057	0,0821		2,91	9,02
	0,012	0,0840		8,22	7,92
	0,018	0,0220		13,4	7,38
	0,051	0,0069		43,7	8,24

* $\alpha \cdot 10^{28} \text{ mN m}^2$ in SI

În concluzie, caracterizarea fizico-chimică a monostraturilor de biosurfactant adsorbit la interfața lichidă este importantă și poate avea mare impact asupra unor fenomene cum sunt, turbulența interfacială, procese de spumare și umectare. De asemenea, comportamentul dinamic al biosurfactanților joacă un rol major în procesele biochimice și biologice, precum și în cele tehnologice.

3. Filme Langmuir – modele de membrane lipidice

Caracterizarea izotermelor de compresiune, presiune superficială (π) în funcție de aria moleculară (A) ale filmelor de acizi grași, fosfolipide și colesterol, este esențială pentru studierea și înțelegerea proceselor biologice care implică sisteme multicomponente.

3.1. Izoterme de compresiune a filmelor de acid stearic

Acidul stearic este un exemplu de biocompus amfifil, insolubil în apă care se auto-asamblează în monostrat Langmuir stabil la interfața aer/apă. Datorită stabilității ridicate la interfață, AS este considerat un model adecvat pentru cercetarea nanostraturilor [13-17]. Se pot obține informații valoroase privind organizarea moleculară a monostraturilor de AS și mecanismul de colaps al acestora din izotermele de compresiune [119].

Studii anterioare ale mecanismului de colaps ale monostraturilor Langmuir insolubile la interfața aer/apă au dus la dezvoltarea unor modele teoretice de colaps [120-124]. Stările proceselor de colaps pentru un monostrat Langmuir supracomprimat sunt prezentate în fig. 3.1.2 [3].

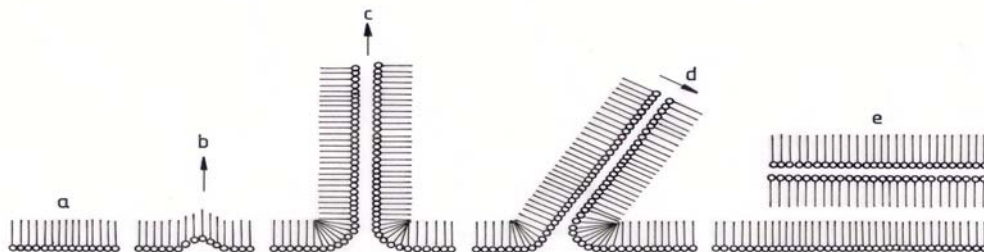


Fig.3.1.2. Etapele proceselor de colaps și structurile de colaps obținute la supracomprimarea monostraturilor condensate de AS. Săgețile indică mișcarea moleculelor în diferite structuri. Desenele nu sunt la scară

Experimental, colapsul incipient se observă adesea la presiuni superficiale reproductibile care corespund unui echilibru metastabil între nanostrat și faza de volum proaspăt colapsată nedetectabilă [40, 125].

Studiile teoretice ale proceselor de colaps ale monostratului de AS [122] arată că, prin creșterea presiunii superficiale laterale peste valoarea presiunii de colaps incipient a monostratului de AS aflat în faza condensată bidimensională (fig. 3.1.2a), are loc un proces de buclare al filmului (fig. 3.1.2b) care duce la ruperea acestuia și formarea de bistraturi verticale (fig. 3.1.2c) care se ridică în faza de aer. Aceste bistraturi se îndoaie (fig. 3.1.2d) și cad fragmentate peste filmul monomolecular rămas, apărând astfel zone cu înălțimi de tristrat (fig. 3.1.2e) la interfață.

Mai departe, voi furniza evidențe experimentale detaliate asupra structurilor de colaps obținute pentru monostraturile AS folosind tehnica LB și investigațiile AFM și care confirmă mecanismul de colaps descris mai sus.

Am studiat monostraturile de AS în absența și în prezența medicamentelor la interfața aer/apă. Au fost obținute experimental izotermele de compresiune pentru monostraturile pure de AS și AS în prezență de P (fig. 3.4.3a) și DFO (fig. 3.4.3b) pentru două temperaturi diferite (20⁰C – fig. 3.4.3a și 22⁰C – fig. 3.4.3b).

Se poate observa, din comportamentul general că ambele izoterme ale AS pur (fig. 3.2.3a și b, curbele 1) conțin două porțiuni liniare corespunzătoare stărilor de LC și S cu tranziție de fază bidimensională la o presiune superficială laterală de aproximativ 20 mN/m.

În prezența procainei (curba 2, fig. 3.4.3a) sau DFO (curba 2, fig. 3.4.3b) în subfaza apoasă, izotermele de compresiune se mută la arii moleculare mai mari evidențind expansiunea monostratului de AS. Caracteristicile superficiale determinate din aceste izoterme sunt date în tabelul 3.4.1.

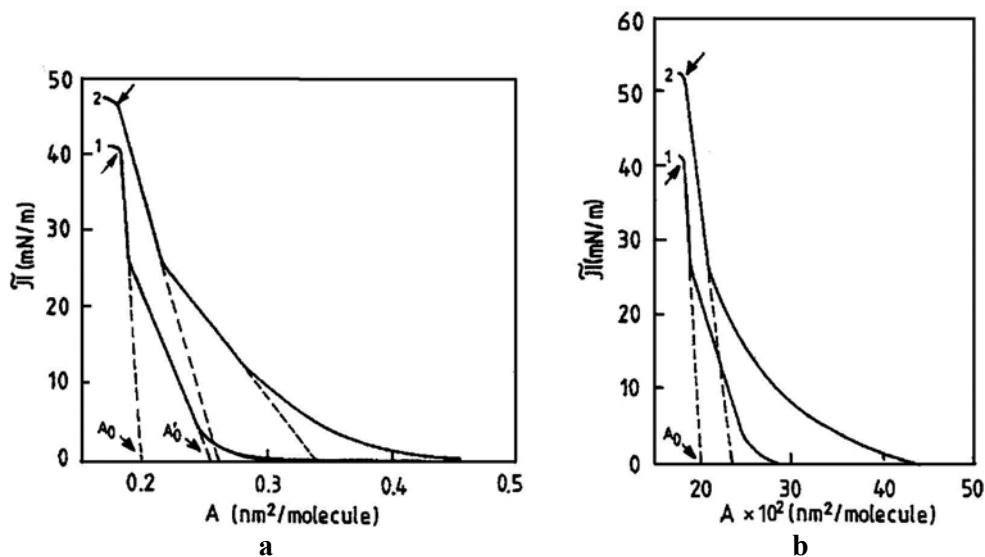


Fig. 3.4.3 a- Izotermele de compresiune pentru monostratul de AS pur (curba 1) la interfața aer/soluție apoasă cu pH2 și pentru monostratul de AS în prezența P 10⁻³ mol/dm³ în subfaza apoasă (curba 2) la 20⁰C. Liniile punctate indică ariile moleculare limită pentru moleculele de AS în stare condensată (A'₀) și faza de solid (A₀). Săgețile de la presiunile superficiale ridicate indică colapsul incipient în monostraturile de AS. **b** – Izotermele de compresiune pentru monostratul pur de AS (curba 1) la interfața aer/soluție apoasă de pH2 și pentru monostratul de AS în prezența DFO 10⁻⁶ mol/dm³ în subfaza apoasă (curba 2) la 22⁰C. Simbolurile ca și la punctul a. (Pentru simplificare valoarea A'₀ nu este marcată).

Tabel 3.4.1. Caracteristicile suprafeței monostraturilor Langmuir de AS pe subfaze apoase de pH2 în absența și în prezența P ($10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) sau DFO ($10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). Valorile ariei medii (A_o , A_0 și A_c) sunt date în $\text{nm}^2/\text{moleculă}$ de AS. Valorile corespunzătoare presiunii de colaps sunt π_c .

Monostrat	$A_o(\text{nm}^2)$	$A_0(\text{nm}^2)$	$A_c(\text{nm}^2)$	π_c (mN/m)	
				incipient	avansat
AS	0,255	0,200	0,180	40,8	(45,0)
AS și P	0,340	0,260	0,175	46,7	(50,9)
As și DFO	0,320	0,230	0,180	52,5	(56,7)

Presiunea de colaps (π_c) este presiunea superficială cea mai mare la care poate fi comprimat monostratul Langmuir la interfața aer/apă [13,15,40,133] și corespunde schimbării bruște de pantă observată pe izoterme (indicată de săgețile de la presiunile superficiale ridicate pe fig. 3.4.1a și 3.4.1b). Ariile moleculare medii corespunzătoare sunt ariile de colaps (A_c) care se găsesc de asemenea în tabelul 3.4.1.

Este important de subliniat că am ales aceste două concentrații diferite de medicamente pentru că la aceste concentrații P și DFO au un efect important (vezi π_c în tab.3.4.1) și comparabil (vezi valorile A_0) în comportamentul fazelor monostraturilor de AS. Cu toate acestea, incrementul presiunii de colaps (aprox. 11,7mN/m) datorat DFO (prezent în volumul subfazei apoase la o concentrație cu trei ordine de mărime mai mică decât pentru P) este aproape dublu decât pentru P (aprox. 5,9 mN/m). Stabilitatea crescută a monostraturilor de AS în prezența DFO reflectă interacțiuni specifice puternice între AS și DFO, datorate flexibilității moleculelor mari de DFO și abilității lor de a forma complecși superficiali stabili cu moleculele de AS [34] prin legături de hidrogen. Moleculele de AS și DFO formează o rețea mult mai ordonată de legături de hidrogen în monostrat în comparație cu monostraturile mixte de AS și P.

3.2. Izoterme ale filmelor de dipalmitoil fosfatidilcolină

Izotermele de compresiune ale monostratului de DPPC pur, etalate la interfața aer/apă sunt date în fig. 3.2.4, curba 1. La presiunea superficială de aproximativ 8 mN/m, monostratul de DPPC prezintă o fază de tranziție bidimensională [42], de la LE la LC, având loc o schimbare bruscă de pantă, vizibilă pe izotermă (curba 1, fig. 3.2.4). La această tranziție de fază principală, coexistă două faze (LE și LC) în monostratul de DPPC pur.

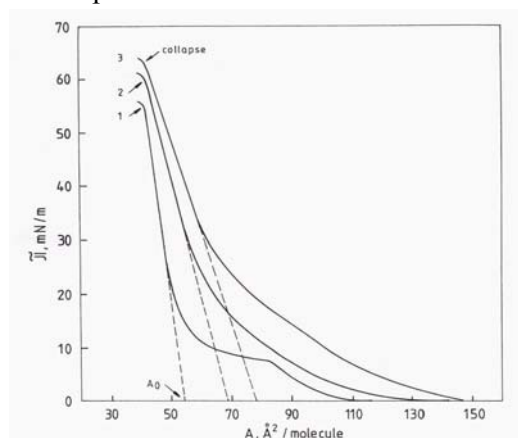


Fig.3.2.4. Izotermele de compresiune la interfața aer/apă a monostratului pur de DPPC (curba 1) și pentru monostratul de DPPC în prezența DFO (10^{-6} mol/dm^3 , curba 2) în fază apoasă și a P (10^{-3} mol/dm^3 , curba 3) la 20°C . Liniile punctate indică ariile moleculare limită (A_0) pentru DPPC în stare de LC. Săgețile de la presiunile superficiale ridicate indică colapsul incipient.

Porțiunea liniară de la presiuni superficiale ridicate corespunde stării de LC urmată de un lichid intermediar ce corespunde unor presiuni superficiale intermediare (între 8 și 20 mN/m) și apoi o stare de LE sub 8mN/m [59]. În prezența medicamentelor ca ; deferoxamina ($10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; curba 2, fig.3.2.4) sau procaina ($10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; curba 3, fig.3.2.4) izotermele de compresiune ale filmelor de DPPC cu medicamente (curbele 2 și 3) se mută la arii mai mari de DPPC arătând efectul de expansiune al medicamentelor asupra monostraturilor de DPPC.

Proprietățile superficiale ale monostraturilor de DPPC au fost determinate din izotermele de compresiune și sunt date în tabelul 3.4.2. De exemplu, A_0 este aria moleculară limită pentru starea de LC ale monostraturilor de DPPC în absența sau în prezența medicamentelor. Valorile A_0 se obțin prin extrapolarea porțiunilor liniare ale izotermelor la $\pi = 0$ (Fig. 3.2.4). Compararea valorilor A_0 (tabel 3.4.2) evidențiază efectul de expansiune al medicamentului asupra monostratului condensat de DPPC.

Tabel 3.4.2. Caracteristicile superficiale ale monostraturilor de DPPC în absența și în prezența P (10^{-3} mol dm $^{-3}$) sau DFO (10^{-6} mol dm $^{-3}$). Valorile ariei medii (A_0 , și A_c) sunt date în Å 2 /moleculă de DPPC. Valorile π_c corespund colapsului monostratului.

Monostrat	A_0 (Å 2)	A_c (Å 2)	π_c (mN/m)	
			incipient	(avansat)
DPPC	54	42	55	-
DPPC și DFO	69	42	59	(70)
DPPC și P	78	42	63	(70)

Valorile ariei moleculare la colaps (A_c) sunt constante, după cum se vede în tabelul 3.4.2, fapt ce evidențiază expulzarea medicamentelor din monostrat la apropierea de presiunea de colaps incipient.

Creșterea stabilității monostraturilor de DPPC în prezența P sau DFO reflectă interacțiuni specifice puternice între acești biocompuși, datorită capacității acestora de a forma asociate supramoleculare stabile prin legături de hidrogen și interacțiuni electrostatice [90,139,221].

3.3. Izoterme ale filmelor de dimiristoil fosfatidilcolină și colesterol

Comportamentul de fază al monostraturilor de DMPC și CHOL la interfața aer/apă au fost studiate prin măsurători ale presiunii superficiale și ale potențialului superficial cu ajutorul tehnicii Langmuir. Acești doi biocompuși au fost studiați atât în stare pură cât și în amestecul DMPC:CHOL (4:1) pentru o fracție bine stabilită de 0,8 a DMPC.

Figura 3.3.3 prezintă izotermele DMPC (curba 1), CHOL (curba 2) și amestecul DMPC:CHOL în raportul molar ales, de 4:1 (curba 3). Ca și comportament general, se poate observa că monostratul de DMPC devine mai condensat în prezența CHOL. Acest comportament este ilustrat în tabelul 3.3.1, unde aria moleculară pentru monostratul strâns împachetat (extrapolată la presiune egală cu zero), notată A_0 , descrește puternic în prezența CHOL. Aspectul general al izotermei pentru amestec (curba 3) este similar cu izoterma DMPC (curba 1) mai ales la presiuni superficiale scăzute. Presiunea de colaps pentru amestecul DMPC:CHOL este mai mare (53 mN/m) comparativ cu presiunea de colaps pentru filmele pure, DMPC (50 mN/m) respectiv CHOL (45 mN/m) (tabel 3.3.1).

Tabel 3.3.1. Caracteristicile superficiale ale următoarelor monostraturi: DMPC, CHOL și amestecului DMPC:CHOL (4:1) la interfața aer/apă.

Monostrat	Stare	A_0 , Å 2 /molec.	A_c , Å 2 /molec.	π_c , mN/m	C_s^{-1} , mN/m	$A_{\Delta V}$, Å 2 /molec	ΔV , mV
DMPC	Lichid expandat	90 ± 2	53 ± 2	50 ± 2	87	190±5	450±10
CHOL	Solid condensat	40 ± 1	39 ± 2	45 ± 1	1074	57±5	340±10
DMPC:CHOL (4:1)	Lichid condensat	48 ± 1	37±2	53± 1	186	88±3	470 ± 5

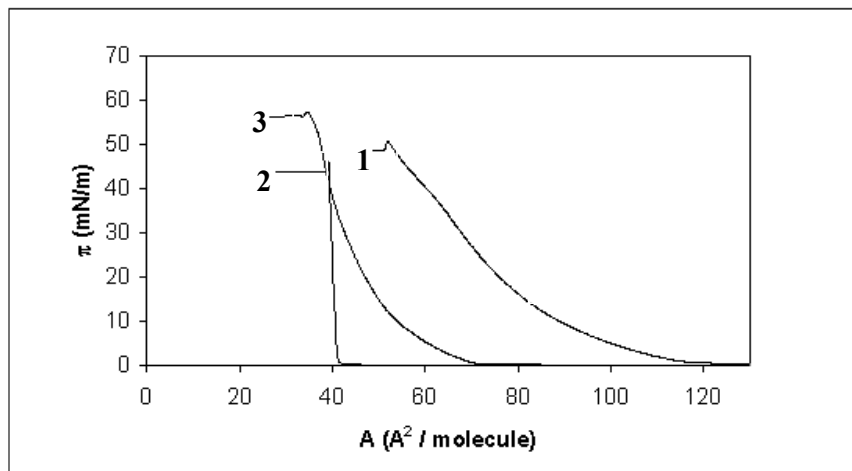


Fig. 3.3.3. Izotermele de compresiune, presiune superficială (π) în funcție de aria medie moleculară (A), la interfața aer/apă pentru următoarele monostraturi Langmuir: DMPC (curba 1), CHOL (2) și amestecul DMPC:CHOL cu o fracție molară a DMPC de 0,8 (3). Subfaza apoasă cu pH 5,6 la 20⁰ C.

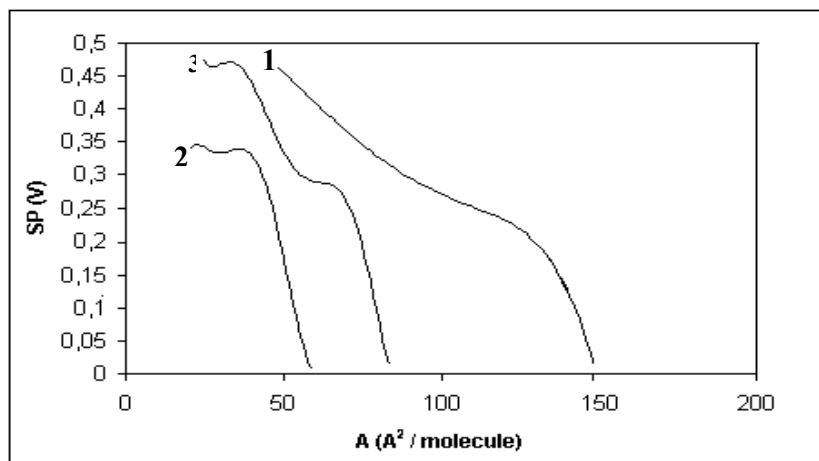


Fig. 3.3.4. Potențialul superficial (SP) în funcție de aria moleculară medie (A) a următoarelor monostraturi: DMPC (curba 1); CHOL (2); amestecul DMPC:CHOL cu o fracție molară a DMPC de 0,8 (3).

Rezultatele experimentale indică faptul că monostratul de DMPC rămâne în stare lichidă până la presiunea de colaps (vezi valorile modulului de compresiune C_s^{-1} , tabel 3.3.1). În cazul CHOL, monostratul pur al acestuia este în stare de solid cu o compresibilitate laterală scăzută [43,96]. După cum se așteaptă de la sistemele mixte cu stabilitate mărită, presiunea de colaps a amestecului DMPC:CHOL este mai mare decât presiunile de colaps a biocompușilor puri [151, 152].

Ariile moleculare (A_0 și A_c , tabel 3.3.1) au fost determinate din izotermele din fig. 3.3.3. Valorile A_0 pentru amestecul DMPC cu CHOL la o fracție molară de 4:1 prezintă deviații negative de la regula de aditivitate. Această situație este reprezentativă pentru un interval mare de presiuni superficiale moderate. Interesant este faptul că aria moleculară de colaps a monostratului mixt DMPC:CHOL (4:1) este apropiată de aria de colaps a CHOL pur (tabel 3.3.1) [150]. Astfel, monostratul mixt strâns împachetat prezintă cea mai mare presiune de colaps înregistrată pentru acești biocompuși, ceea ce reprezintă o evidență puternică a faptului că ambii compuși sunt miscibili în structura bidimensională, care este termodinamic stabilă. Stabilizarea monostratului mixt de DMPC:CHOL (4:1) se datorează probabil interacțiunilor asociative stabilite între acești biocompuși.

Aceste rezultate (fig. 3.3.3) sunt în concordanță cu măsurătorile de potențial superficial (fig.3.3.4). Biomoleculele de CHOL sunt încorporate în monostratul de DMPC și produc schimbări ale potențialului superficial. În figura 3.3.4 se observă că în cazul amestecului DMPC:CHOL (curba 3) curba potențialului superficial este amplasată între curbele monostraturilor pure, similar cu rezultatele din fig. 3.3.3. Potențialul superficial maxim atins este dat în tabelul 3.3.1.

În general, monostratul de DMPC devine mai condensat în prezența CHOL (fig. 3.3.3) și aria critică corespunzătoare creșterii potențialului superficial (notată $A_{\Delta V}$, dată în tabelul 3.3.1; pentru simplificare nu este arătată pe curbele din fig. 3.3.4) descrește semnificativ în comparație cu valoarea ariei critice a monostratului de DMPC pur. Această arie critică este legată de structura monostratului mixt care duce la o scădere semnificativă a constantei dielectrice efective la interfața aer/apă. Schimbarea potențialului superficial al monostratului mixt datorită încorporării COL poate fi atribuită interacțiunilor specifice dintre acești biocompuși care sunt neutri la pH-ul de lucru (5,6) în toate experimentele. Contribuția COL încorporat în monostratul de DMPC în termenii momentului de dipol pare a fi asociată cu orientarea grupărilor polare a ambilor componenți și cu interacțiunile specifice dintre ei în monostratul mixt de DMPC:COL (4:1).

Stabilitatea crescută a monostraturilor de DMPC în prezența colesterolului reflectă interacțiuni specifice puternice între acești biocompuși, datorate abilității lor de a forma asociații supramoleculare auto-asamblate stabile mai ales prin legături de hidrogen și interacțiuni hidrofobe [201].

3.6. Modelarea interacțiunilor în filmele de acizi grași

S-au făcut multe încercări de descriere matematică a izotermelor de compresiune ale monostraturilor solubile și insolubile la interfața aer/lichid [104-106]. Tehnicile de regresie care folosesc abordarea matematică prin curbe empirice de modelare a izotermelor, selectează modele empirice caracterizate de ecuații particularizate obținute din ecuații bidimensionale de tip van der Waals. Aceste metode furnizează parametri care permit o descriere bună a izotermelor de compresiune, în special pentru presiuni superficiale scăzute care corespund monostraturilor aflate în stare de lichid expandat. Parametri ecuației alese sunt modificați sistematic pentru a realiza o reproductibilitate bună a izotermelor experimentale.

S-a efectuat un studiu comparativ al izotermelor de compresiune pentru monostraturile de AO, AL și AS etalate la interfața aer/soluții apoase acide de pH 2 și o testare a unei ecuații de stare folosind metoda triplei minimizări.

Ecuația de stare studiată s-a obținut pe baza egalității potențialului chimic al apei în subfaza de volum și în monostratul soluției grupărilor cap-polare, presupunând că monostratul este o soluție obișnuită sau molecule de surfactant (numai grupările cap-polare) în apă, folosind o expresie semiempirică pentru influența lanțurilor de hidrocarbură ale surfactantului asupra presiunii superficiale interne. Ecuația are următoarea formă:

$$\pi = -\left(\frac{\alpha}{A^{3/2}} + \frac{kT}{A_1} \ln x_1 + \frac{\beta_{12}}{A_1} x_2^2 \right) = -\pi_0 + \pi_h \quad (3.6.12)$$

În această expresie, π este presiunea superficială, A aria moleculară medie, A_1 aria secțiunii transversale a moleculelor de apă în monostrat, π_h presiunea superficială teoretică pentru monostratul de surfactant etalat la interfața aer/apă și considerat ca fiind realizat din soluția formată din grupările cap-polare ale surfactantului dizolvate în apa interfacială; $\pi_0 = \alpha/A^{3/2}$ reprezintă presiunea superficială de coeziune datorată interacțiunilor lanțurilor hidrofobe (caracterizată de parametrul de interacțiune α) în faza

de aer a monostratului. Deoarece în monostratul expandat aceste interacțiuni conduc la atracții intermoleculare, α trebuie să ia valori pozitive. Parametrul de interacțiune β_{12} este definit prin relația:

$$\beta_{12} = z \left(\varepsilon_{12} - \frac{\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22}}{2} \right)$$

unde z este numărul de contacte al moleculelor din monostrat cu moleculele învecinate, ε_{11} , ε_{22} și ε_{12} sunt energiile potențiale corespunzătoare interacțiunilor apă/apă, grupare polară/grupare polară și apă/grupare polară din monostrat. Luând în considerare structura moleculelor de apă și a grupărilor polare COOH este de așteptat ca β_{12} să ia valori negative. În ecuația (3.6.12), x_1 și x_2 sunt fracțiile molare ale apei, respectiv a grupărilor cap-polare din soluția monostratului. A_1 este aria medie a secțiunilor transversale ale moleculelor de apă din monostrat, k este constanta lui Boltzmann și T temperatura absolută. Frația molară x_2 poate fi calculată cu relația:

$$x_2 = \frac{A_1}{A - A_2 + A_1} \quad (3.6.13)$$

unde A_2 este aria secțiunii transversale a grupării cap-polare; A_1 a fost aproximată la $A_1 = (V^{2/3})/N_A \cong 0,1 \text{ nm}^2/\text{moleculă}$, iar V este volumul molar al apei în stare lichidă și N_A este constanta lui Avogadro.

Parametri ec. (3.6.12) obținuți din izotermele de compresiune experimentale pentru monostraturile de acizi grași prin metoda triplei minimizări, sunt prezentați în tabelul 3.6.1.

Tabel 3.6.1. Parametri ecuației de stare (3.6.12) obținuți pentru acizii grași studiați ($\pi \leq 7 \text{ mN/m}$). Δ este deviația standard ale valorilor experimentale π față de cele teoretice.

Surfactant	$A_2, \text{ nm}^2/\text{molec.}$	$\alpha \times 10^{30}, \text{ Nm}^2$	$\beta_{12} \times 10^{20}, \text{ Nm}$	$\Delta, \text{ mN/m}$
AO	0,225	7,714	-1,507	0,087
AL	0,265	6,932	-1,150	0,073
AS	0,207	2,593	+0,513	0,150

Inspeția tabelului 3.6.1 arată că ec. (3.6.12) descrie foarte bine izotermele de compresiune, mai ales pentru acizii grași nesaturați; pentru aceștia deviația standard Δ este mai mică decât erorile măsurătorilor experimentale. Valorile A_2 obținute par a fi reale și caracterizează într-adevăr grupările carboxilice. Creșterea A_2 în ordinea $AS < AO < AL$ nu este surprinzătoare, din moment ce, la o valoare dată π ariile moleculare ale monostraturilor cresc în aceeași ordine, semnalând o modificare a conformației grupărilor cap-polare.

În ceea ce privește valorile β_{12} obținute, acestea par rezonabile pentru AO și AL, în ambele cazuri exprimând atracții puternice între gruparea COOH și moleculele de apă, chiar dacă valorile numerice sunt puțin diferite.

Valorile parametrului de interacțiune α obținute pentru AO și AL sunt de asemenea acceptabile. Acestea evidențiază interacțiunile puternice între lanțurile de hidrocarbură, interacțiuni care sunt mai puternice la AO, comparativ cu AL, în concordanță cu presiunea de colaps mai mare a primului față de ultimul.

Toate aceste rezultate arată că ecuația (3.6.12) oferă o descriere bună a izotermelor π versus A ale AO și AL până la $\pi = 7 \text{ mN/m}$, (fig. 3.6.4) valorile A_2 , α , β_{12} având valori rezonabile.

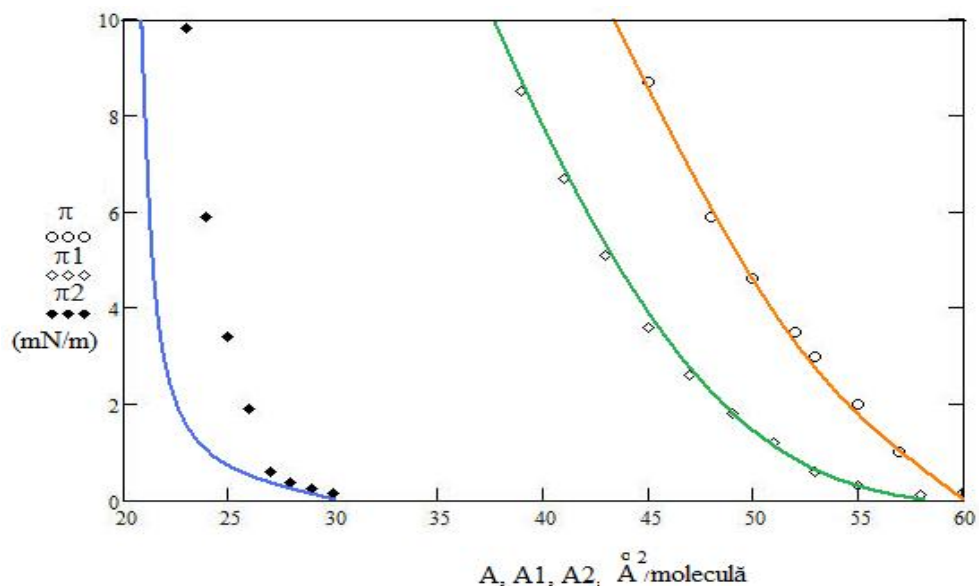


Fig.3.6.4. Perechile experimentale π -A (pentru AO); π_1 -A1(pentru AL); π_2 -A2(pentru AS) și curbele teoretice calculate cu ec.3.6.12 și parametrii din tabelul 3.6.1.

În cazul AS descrierea izotermei nu este bună, Δ depășește erorile experimentale și deși valoarea A_2 este acceptabilă, parametrii de interacțiune obținuți nu sunt plauzibili.

Putem concluziona că ec. (3.6.12) este o ecuație de stare potrivită pentru monostraturile de acizi grași aflați în stare de lichid expandat și nu poate fi aplicată monostraturilor de lichid condensat ale acizilor grași saturați [107].

4. Modele matematice teoretice. Structuri orientate (biomembrane)

4.2. Modelarea izotermelor de compresiune cu funcții spline cubice extinse

Obiectivul acestui capitol este de a realiza o analiză numerică a izotermelor de compresiune ale acizilor grași folosind datele experimentale, arie moleculară (A) versus presiune superficială (π) ale filmelor de AL, AO și AS. Metoda matematică constă în folosirea funcțiilor spline cubice extinse și metoda celor mai mici pătrate. Această metodă folosește interpolarea cu funcții spline, construind curbele experimentale dintr-o serie de segmente unite astfel încât să formeze o curbă netedă, completă, care să treacă prin punctele experimentale [180-182, 188].

Programul MATHCAD 13 a fost folosit pentru a dezvolta un calcul iterativ de aproximare cu metoda celor mai mici pătrate, al polinoamelor cubice clasa C^1 , polinoame continue împreună cu derivata lor de ordinul întâi, numite și polinoame cubice extinse (ECS). Acest program a fost folosit pentru a modela izotermele de compresiune ale acizilor grași și pentru a calcula coeficientii de compresibilitate (C_s) ai monostraturilor cu o precizie considerabilă, din momentul etalării până la colapsul monostratului.

Se știe că tranziția de fază poate fi evidențiată cu ajutorul valorilor coeficienților de compresibilitate [13, 189-191], care descriu stările de agregare din filmul monomolecular, având valori mari pentru monostratul expandat. Pentru determinarea transformărilor de fază se folosește criteriul lui Ehrenfest [195], care spune că o schimbare de fază este de ordinul m dacă derivata parțială de același ordin a energiei libere Gibbs (G) în raport cu una din variabilele sale prezintă discontinuitate la o temperatură dată în timp ce derivatele de ordin mai mic sunt continue.

Derivata de ordinul întâi a funcției G în raport cu π , presupunând că toate celelalte variabile de stare sunt constante (și anume, temperatura absolută T și presiunea externă p) este dată de:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \pi}\right)_{T,p} = A \quad (4.2.11)$$

unde A este aria moleculară în monostrat a surfactantului ales. Astfel, o discontinuitate a valorilor ariei la presiune superficială constantă caracterizează o tranziție de fază de ordinul întâi. Considerând mai departe, următoarele relații:

$$\left(\frac{\partial A}{\partial \pi}\right)_{T,p} = \left(\frac{\partial^2 G}{\partial \pi^2}\right)_{T,p} \quad (4.2.12)$$

și

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi}\right)_{T,p} \quad (4.1.1)$$

putem spune că o discontinuitate a valorilor C_s (exprimat în m/mN), poate fi considerată ca discontinuitate a derivatei de ordinul II a funcției G în raport cu π , când A este funcție continuă.

Rezultatele programului de calcul iterativ care modelează izotermele de compresiune și calculează coeficienții de compresibilitate superficială pentru acizii grași cu ajutorul funcțiilor ECS și metoda celor mai mici pătrate sunt ilustrate în fig. 4.2.7-4.2.12.

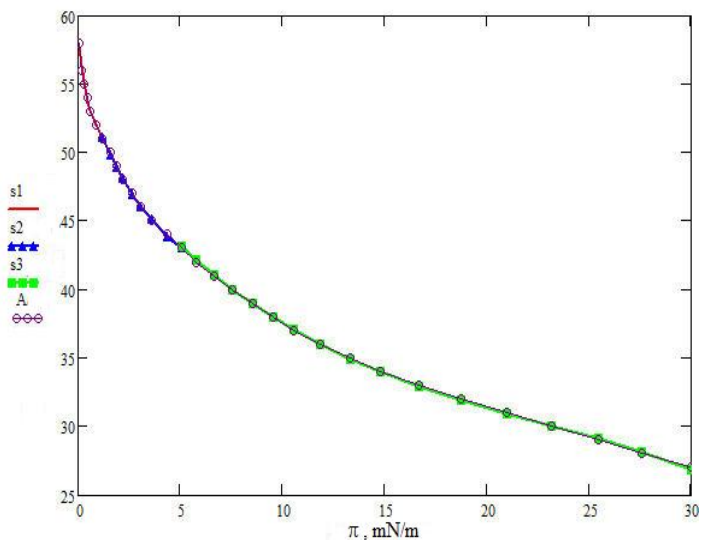


Fig. 4.2.7. Graficul experimental A versus π și al ECS (s1-s3) calculate pentru AO, a doua iterație. Ariile moleculare sunt date în Å²/molecule.

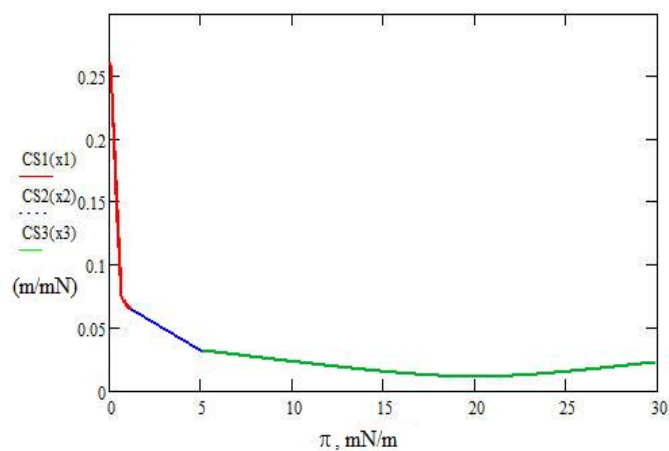


Fig. 4.2.8. Graficul compresibilității superficiale (CS) *versus* π calculat prin derivarea funcțiilor ECS pentru AO.

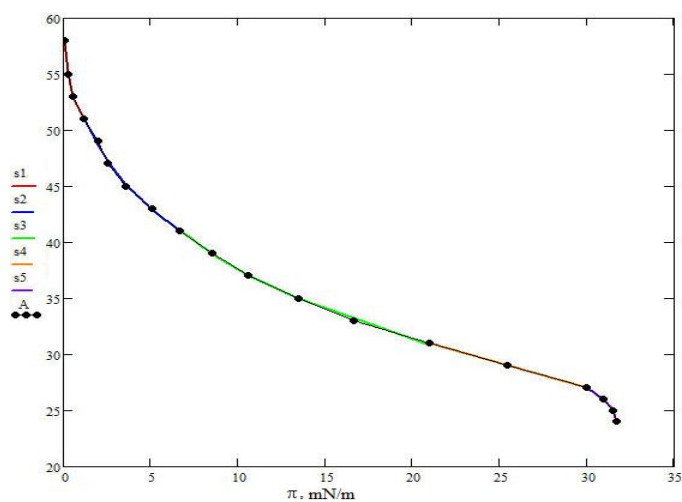


Fig. 4.2.9. Graficul experimental A *versus* π și al ECS (s1-s5) calculate pentru AL, a patra iterație. Ariile moleculare sunt date în $\text{\AA}^2/\text{moleculă}$.

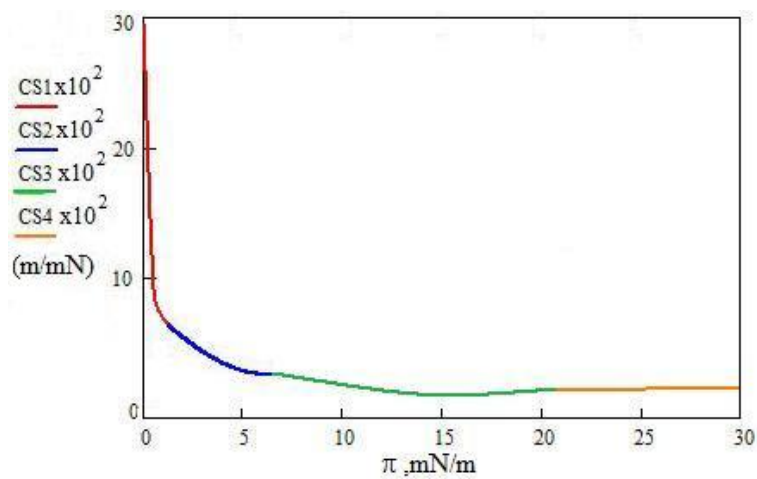


Fig. 4.2.10. Graficul compresibilității superficiale (CS) *versus* π calculat prin derivarea funcțiilor ECS pentru AL.

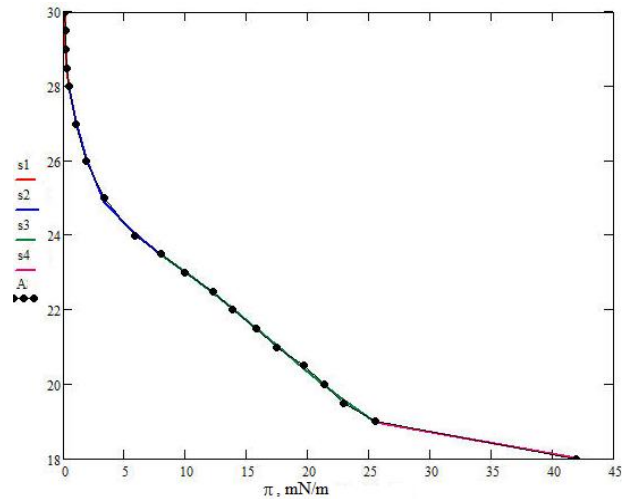


Fig. 4.2.11. Graficul experimental A versus π și al ECS (s1-s4) calculate pentru AS, a treia iterație. Ariile moleculare sunt date în $\text{Å}^2/\text{moleculă}$.

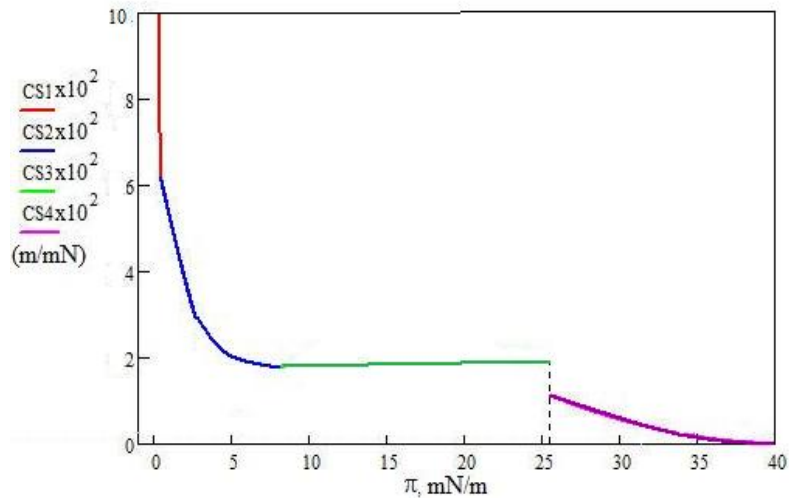


Fig. 4.2.12. Graficul compresibilității superficiale (CS) versus π calculat prin derivarea funcțiilor ECS pentru AS.

După cum se observă din fig. 4.2.7, 4.2.9 și 4.2.11 funcțiile spline cubice extinse calculate cu metoda celor mai mici pătrate formează o curbă netedă care trece prin toate punctele experimentale ale izotermelor acizilor grași.

Compresibilitatea superficială calculată prin derivarea ECS are valori plauzibile și apropiate de cele calculate din izotermele de compresiune experimentale pentru acizii grași studiați (fig. 4.2.8, 4.2.10 și 4.2.12).

Cum se observă în fig. 4.2.12, la presiunea superficială laterală de 26 mN/m a monostratului de AS apare o discontinuitate a derivatei de ordinul întâi a funcțiilor ECS, fapt ce evidențiază o tranziție de fază de ordinul II de la LC la S a filmului de AS, rezultatele obținute fiind în concordanță cu cele din literatură [107, 188-191].

5. Membrane (filme) Langmuir-Blodgett. Observații de microscopie de forță atomică.

Microscopul de forță atomică (AFM) este o tehnică nouă folosită pentru vizualizarea cu rezoluție mărită a nanostructurii suprafețelor și este folosit pentru detectarea diferitelor faze existente în monostraturi, pentru investigarea structurii și analiza mărimii agregatelor supramoleculare [33, 34, 36, 92, 135-136]. Principiul de funcționare al AFM se bazează pe măsurarea forțelor care acționează între vârful analizor (numit *tip*) atașat unui cantilever și filmul LB, denumit probă LB. Este important de menționat că în modul de operare cu contact intermitent tehnica AFM prezintă un avantaj specific prin faptul că vârful analizor nu atinge proba LB și în consecință suprafața probei nu este distrusă. Mai mult, nu au loc reacții chimice locale produse de interacțiunea vârfului analizor și atomii de pe suprafața filmului LB. Sensibilitatea măsurătorilor AFM este foarte mare, obținându-se informații precise la nivel molecular despre morfologia suprafeței.

5.2. Efectele subfazei asupra filmelor Langmuir-Blodgett formate din lipide

5.2.1. Influența procainei

Cercetarea morfologiei suprafeței și structura domeniilor probelor LB de AS și DPPC în prezența P a fost realizată prin modul de contact intermitent AFM cu ajutorul unui scanner de 90 x 90 (x-y) μm și vârfuri analizoare conice non-contact din nitruură de siliciu acoperită cu aluminiu. Vârful analizor este atașat unui cantilever cu frecvența de rezonanță cuprinsă între 200 – 300 Hz și constanta de elasticitate de 17,5 N/m.

S-a studiat influența presiunii superficiale asupra morfologiei filmelor LB de AS și DPPC în prezența P (10^{-3}M) (fig. 5.2.2 și 5.2.9) [48, 49].

Imaginile AFM ale filmelor mixte de AS cu P prezintă asocierea acestora în câteva particule agregate la colapsul avansat al filmului mixt. Procaina duce la formarea unei faze omogene în filmul LB mixt, în special la presiuni superficiale mari.

Imaginile AFM ale filmului de DPPC cu P indică o neomogenitate a acestuia la presiuni superficiale scăzute, care este plauzibilă dacă se ține seama de lungimile moleculare diferite ale celor două molecule, DPPC și P și de orientarea acestora la presiuni scăzute (fig. 5.2.9) [15, 17, 42]. Odată cu creșterea presiunilor superficiale, imaginile AFM indică o coeziune ridicată între molecule, constatare care se reflectă și în profilele imaginilor topografice.

Prin urmare, este evidențiată persistența domeniilor LC ale monostratului până la presiuni superficiale mari, corespunzătoare colapsului avansat, în filmele mixte de DPPC cu P. Mărimea domeniilor este de până la 1,5 μm și corespunde agregatelor supramoleculare, formate probabil din molecule orientate de DPPC și P prin legături de hidrogen și interacțiuni electrostatice [60].

În concluzie, P stabilizează filmele de AS și DPPC depuse LB la presiuni superficiale ridicate. Distribuția medicamentului în membrana lipidică este importantă pentru a înțelege mai bine mecanismul anesteziei.

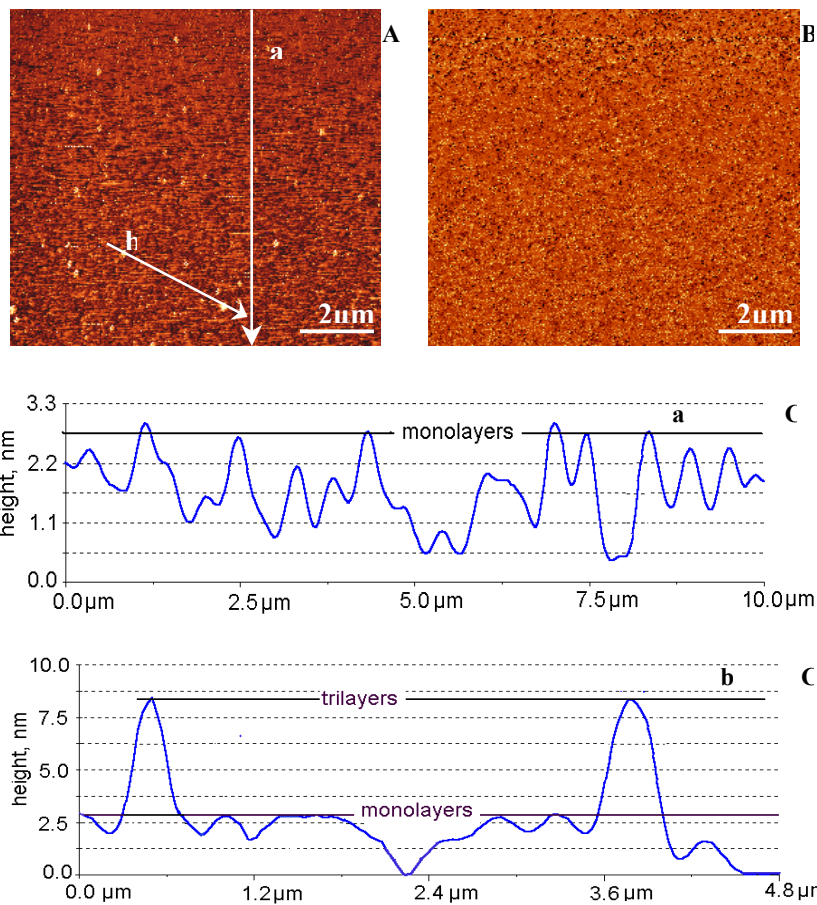


Fig.5.2.2. Imagini AFM topografice (A) și de fază (B) ale filmelor LB de AS transferat pe sticlă la colaps avansat (presiunea superficială laterală de 50,9 mN/m) în prezența P (10^{-3} mol/dm³) în subfaza apoasă. Imaginea C –profilul secțiunii transversale; a - de-a lungul săgeții a ; b - de-a lungul săgeții b din Fig.5.2.2A.

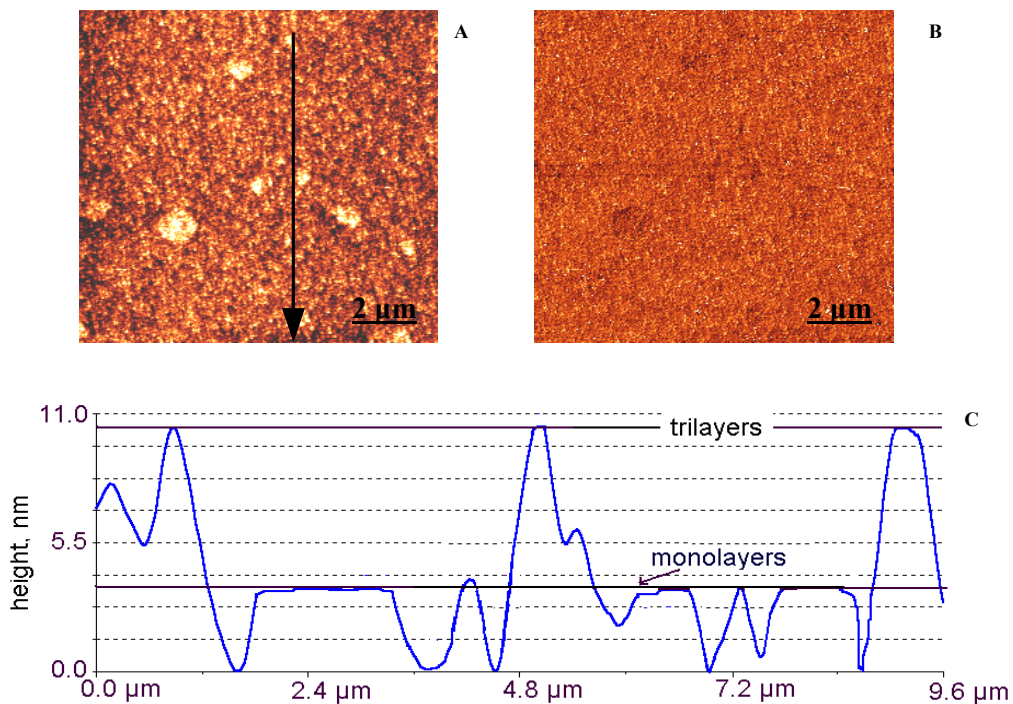


Fig. 5.2.9. Imagini AFM topografice (A), de fază (B) și profilul secțiunii transversale (C) de-a lungul liniei din imaginea A pentru filmul mixt de DPPC și P transferat vertical la colaps avansat (la presiunea superficială laterală de 70 mN/m).

5.2.2. Influența deferoxaminei

Morfologia filmului de AS în prezența DFO prezintă o structură omogenă la presiuni superficiale scăzute. Structura suprafeței probelor LB la colaps avansat este dominată de agregate neregulate constând din striații mari bine-împachetate, formate probabil din complecși de AS și DFO agregați puternic datorită interacțiunilor electrostatice și legături de hidrogen, rezultând particule mari cu structură de tristrat, cu o mărime medie de $1,5\ \mu\text{m}$ și înălțimi cuprinse între $3,0$ și $3,4\ \text{nm}$ (fig. 5.2.13) [49, 60, 137].

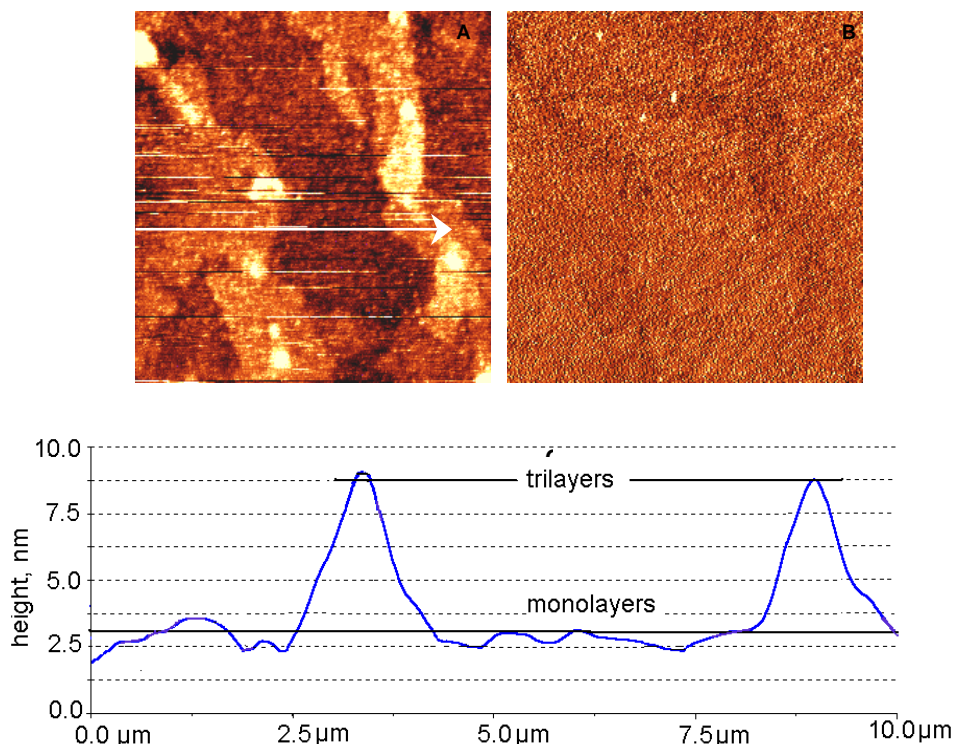


Fig. 5.2.13. Imagini AFM topografice (A), de fază (B) și profilul secțiunii transversale (C) de-a lungul liniei din imaginea A, pentru filmele mixte LB de AS și DFO ($10^{-6}\ \text{mol/dm}^3$) în subfaza apoasă, transferate pe sticlă la colaps avansat (la presiunea superficială laterală de $56,7\ \text{mN/m}$).

Stabilitatea ridicată a domeniilor condensate extinse (cu o lățime de până la $2,5\ \mu\text{m}$) identificate în filmele mixte de DPPC cu DFO la colaps avansat, indică faptul că moleculele flexibile de DFO se orientează diferit față de moleculele de DPPC și probabil se așază orizontal sub monostratul de DPPC. Această orientare interfacială dă posibilitate formării de asociate moleculare auto-asamblate și astfel domeniile condensate de monostrat devin mai stabile (fig. 5.2.16).

Pe baza diferitelor morfologii observate cu AFM, atât formarea de auto-asamblate supramoleculare și agregate, cât și procesul lor de aliniere sunt rezultatul a mai multor tipuri de interacțiuni. Acestea pot include interacțiuni între substrat și moleculele formatoare de film. Efectul colectiv al acestor interacțiuni poate conduce la formarea și alinierea diferitor structuri ordonate, care au un rol fiziologic *in vivo*.

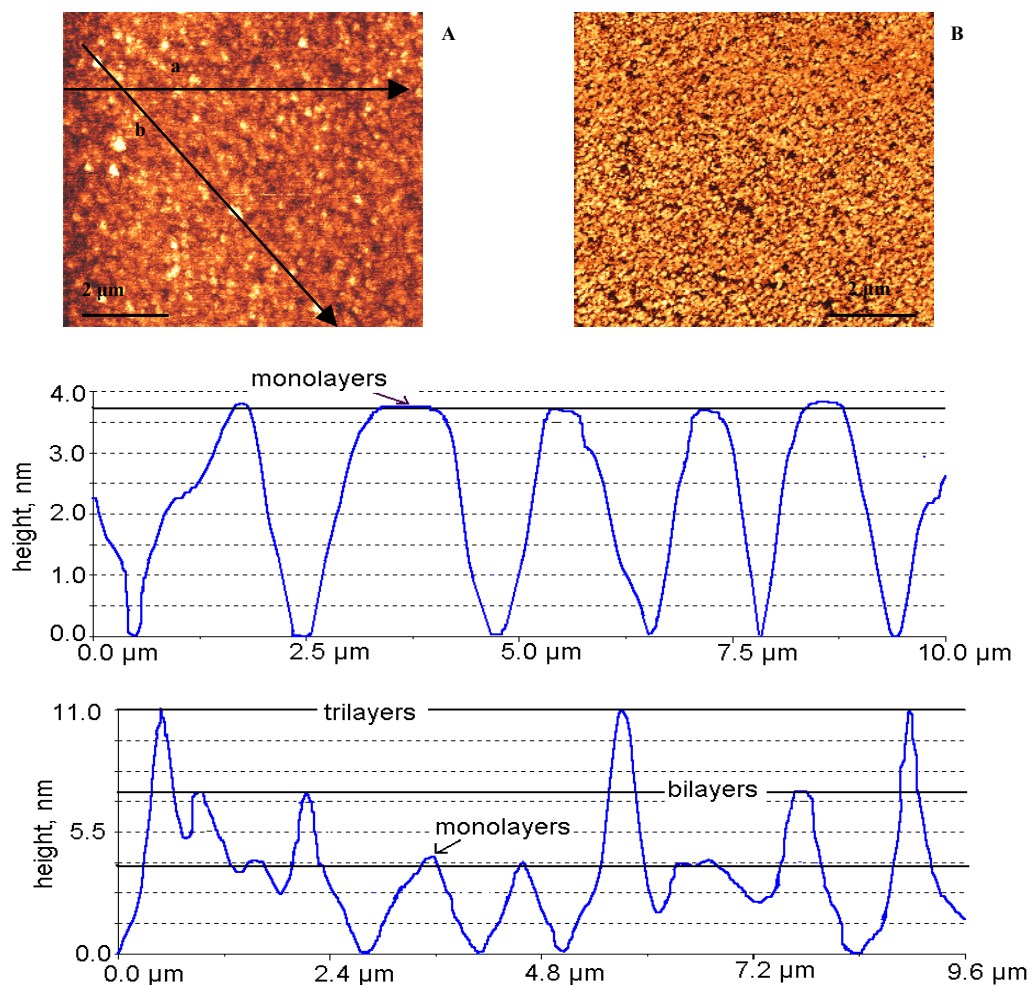


Fig. 5.2.16. Imagini AFM topografice (A), de fază (B) și profilul secțiunii transversale (C) de-a lungul liniei din imaginea A, pentru filmele mixte LB de DPPC și DFO (10^{-6} mol/dm³) în subfaza apoasă, transferate vertical la colaps avansat (la presiunea superficială laterală de 70 mN/m).

Studiile efectuate au arătat o stabilitate pe termen lung a filmelor LB transferate pe diferite suporturi solide din monostraturi Langmuir la interfața aer/soluție apoasă, fapt ce se observă și în imaginile AFM ale acestor filme efectuate la câteva zile după transfer și repetate după câteva luni până la un an. Stabilitatea ridicată a monostraturilor Langmuir și Langmuir-Blodgett ale acestor compuși poate fi utilă și cu aplicabilitate în diferite domenii cum ar fi; medicină, farmacie și biologie [25, 48, 49, 60, 137, 198].

5.5. Membrane lipidice monostrat formate din dimiristoil fosfatidilcolină și colesterol

Tehnica AFM asociată cu tehnica Langmuir-Blodgett oferă informații valoroase despre nanostructura bidimensională ale monostraturilor pure de DMPC și CHOL, precum și despre amestecul binar DMPC cu CHOL. S-au obținut imagini AFM ale filmelor LB transferate pe mică la două presiuni superficiale laterale, de 10 mN/m, respectiv de 20 mN/m. Imaginile AFM cu rezoluție mare ale amestecului DMPC:CHOL (4:1) indică faptul că filmele mixte sunt omogene la ambele presiuni superficiale și au o

rugozitate scăzută [146, 147]. Schimbările nanostructurii filmului de DMPC în prezența CHOL sunt o consecință a modificărilor structurale cauzate de încorporarea moleculelor de colesterol în monostratul de DMPC (fig. 5.5.2).

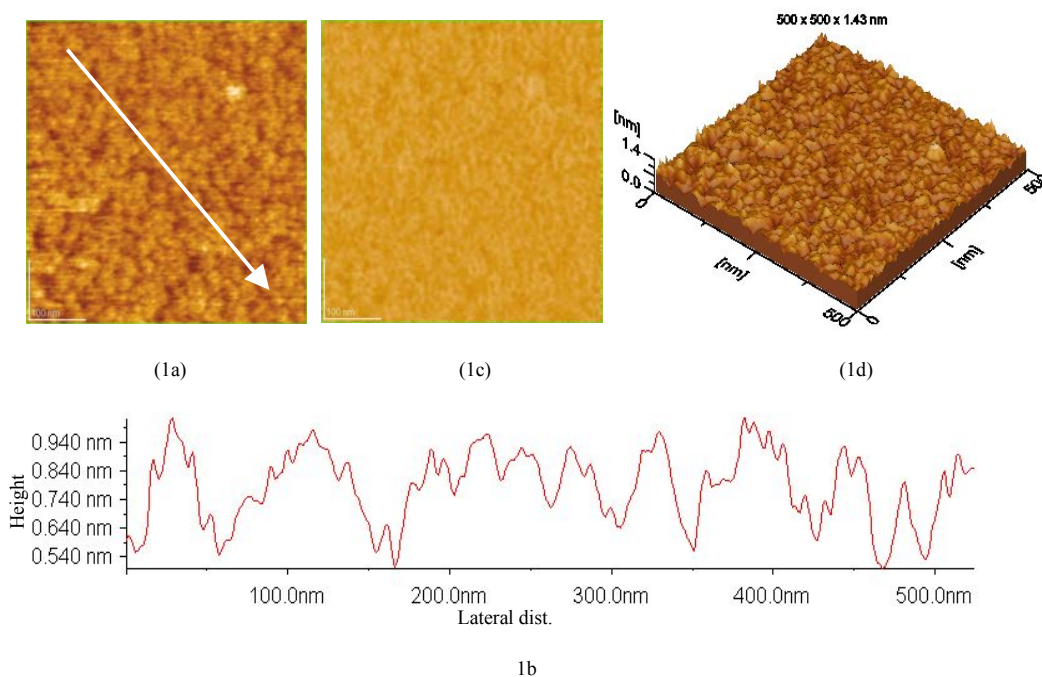


Fig.5.5.2. Imaginile AFM ale monostraturilor mixte DMPC:CHOL (4:1), transferate vertical pe mică la presiunea superficială constantă de 20 mN/m, la o arie scanată de: 500 x 500 nm². (1a) imagine topografică bidimensională; (1b) profilul secțiunii transversate de-a lungul săgeții din imaginea); (1c) imagine de fază; (1d) imagine topografică tridimensională.

Aceste studii arată că interacțiunile puternice dintre DMPC și CHOL duc la formarea unei nanostructuri bidimensionale bine definită, cu o rugozitate scăzută ce poate avea aplicabilitate practică în fabricarea biosenzorilor. De asemenea, aceste tipuri de nanostructuri se pot forma în membranele naturale influențând distribuția proteinelor și funcțiile proteinelor *in vivo* [201].

5.6.3. Morfologia membranelor de collagen în prezența medicamentelor anticancer

Colagenul de tip I este o proteină fibrilară din matricea extracelulară și din țesutul conjunctiv [215]. Proteina are o masă moleculară de 300 kg/mol, lungimea de aproximativ 300nm și diametrul în jur de 1,5 nm, existând din abundență în oase, cartilajii, ligamente, tendoane și piele [217]. Structural, este formată din trei lanțuri, răsucite astfel încât să formeze o structură elicoidală semi-rigidă, așa numitul monomer. Conține regiuni recunoscute specific de receptorii de la suprafața celulei fiind implicat în procesele de biorecunoaștere.

Din punct de vedere chimic, fiecare lanț este format din secvențe repetitive de amino-acid glicină –X –Y, unde pozițiile X și Y pot fi ocupate de orice amino-acid; în poziția X aflându-se frecvent prolina iar în poziția Y, hidroxiprolina.

La asamblarea monomerilor de collagen se formează benzi caracteristice cu o periodicitate de 67 nm (rețea de benzi D) de-a lungul fibrei. Asociațiile liniare (capăt cu capăt) și cele laterale (marginile structurii) duc la formarea de microfibre care se pot asambla în structuri fibrilare extinse, în final formându-se fibre [203].

Asociatele supramoleculare de collagen joacă un rol important în consolidarea mecanică a țesuturilor, în proliferarea, migrarea și traducerea semnalului celulelor adiacente.

Studiile filmelor de collagen cu medicamentele anti-cancer: FLU, DOX și ALP confirmă formarea de asociate supramoleculare în aceste filme și asamblarea în filme nanostructurate depuse pe sticlă (fig. 5.6.10-5.6.12). Organizarea supramoleculară a moleculelor de collagen arată că medicamentele anti-cancer se leagă puternic de fragmentele de collagen. Considerăm că legarea medicamentelor anti-cancer de collagen are loc prin recunoașterea moleculară a zonelor mai puțin ordonate din collagen, denumite telopeptide, în consecință tratarea COL cu medicamente anti-cancer duce la formarea unei rețele mixte ordonate. Evident, este esențială formarea de legături de hidrogen între medicamentele anti-cancer și matricea de COL pentru a stabili rețelele mixte observate în imaginile AFM.

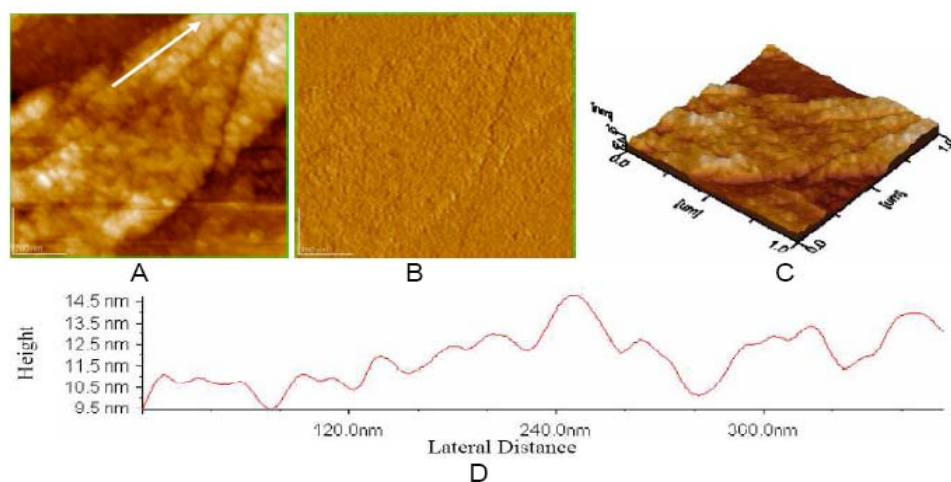


Fig 5.6.10. Film de collagen cu 5-fluorouracil pe sticlă: A) imagine topografică 2D; B) imagine de fază; C) imagine topografică 3D; D) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din fig. 5.6.10A. Aria scanată de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

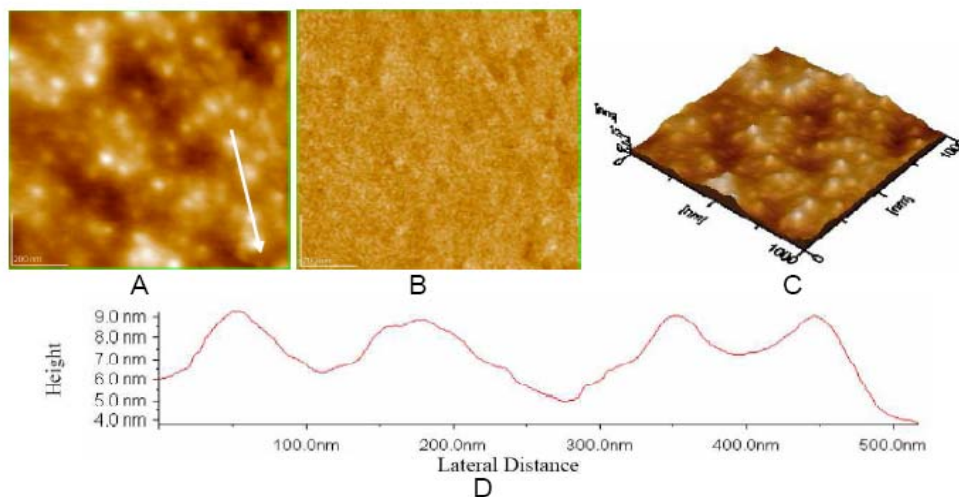


Fig.5.6.11. Film de collagen cu doxorubicină pe sticlă: A) imagine topografică 2D; B) imagine de fază; C) imagine topografică 3D; D) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din fig. 5.6.11A. Aria scanată de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

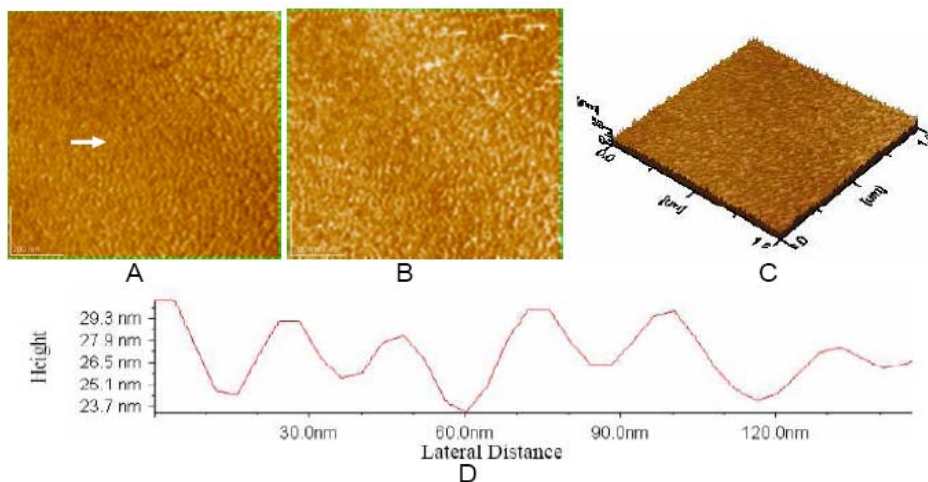


Fig.5.6.12. Film de collagen cu acid lipoic pe sticlă: A) imagine topografică 2D; B) imagine de fază; C) imagine topografică 3D; D) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din fig. 5.6.12A. Aria scanată de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

Organizarea proteinelor la suprafață este importantă cu aplicații practice diverse care includ; biocompatibilitatea implanturilor, adeziunea și creșterea celulară, precum și designul biomaterialelor. Asemenea aplicații necesită obținerea unei morfologii controlate a straturilor uscate de biomolecule auto-asamblate pe diferite suprafețe, mai ales în cazul fabricării de biosenzori, fapt pentru care distribuție proteinelor poate influența traducerea semnalului [211] și răspunsul celular [202, 211, 212].

6. Membrane biologice. Observații AFM asupra eritrocitelor

Imaginile morfologice AFM ale celulei eritrocitare evidențiază forma concavă cu aspect de „gogoasă” a acestei, cu un diametru de aproximativ $8 \mu\text{m}$ și o concavitate de $0,14 \mu\text{m}$ (fig. 6.1.8). nanostructura normală a eritrocitelor umane este formată din granule sau particule strâns împachetate cu un diametru de aproximativ 22 nm distribuite uniform pe suprafață (Fig. 6.1.19).

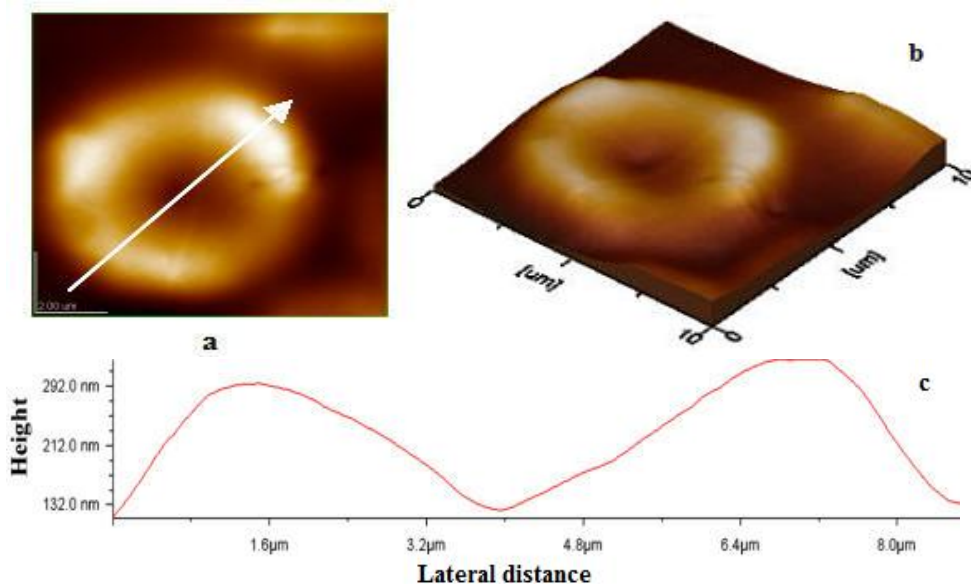


Fig. 6.1.18. Imaginile AFM ale eritrocitei, proba cu sânge pur: a) imagine topografică bidimensională; b) imagine topografică tridimensională; c) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din imaginea (a). Aria scanată: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$.

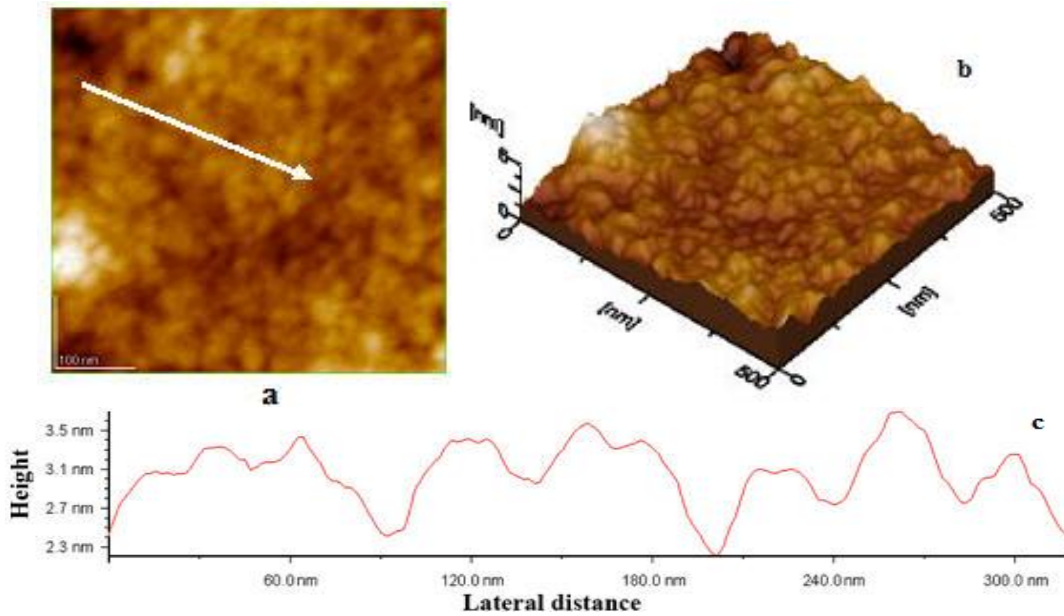


Fig. 6.1.19. Imaginile AFM ale suprafeței membranei eritrocitare, proba cu sânge pur: a) imagine topografică bidimensională; b) imagine topografică tridimensională; c) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din imaginea (a). Aria scanată: 0,5 μm x 0,5 μm .

Granulele corespund probabil membranei lipidice bine împachetate în partea lipidică a suprafeței membranei eritrocitare, această structură regăsimu-se în nanostructura lipidelor monostrat, studiate ca model de membrană [214, 259].

6.2. Observații AFM ale eritrocitelor tratate cu procaină

Efectul procainei asupra eritrocitelor umane a fost investigat cu AFM la trei concentrații ale procainei (vezi tabel 6.2.1). Schimbările morfologiei suprafeței membranei eritrocitare furnizează informații directe privind efectul procainei la scară micro- și nanometrică asupra membranei celulare. Schimbările morfologiei suprafeței eritrocitei pot fi evidențiate de mărirea suprafeței granulelor datorită agregării particulelor membranare de pe suprafața celulei, iar formarea de domenii structurate poate fi datorată creșterii concentrației de procaină (fig. 6.2.7, 6.2.8).

Tabel 6.2.1. Mărirea celulei eritrocitare, adâncimea concavității, diametrul granulelor, înălțimea aparentă a diferitor domenii, rugozitatea (RMS) ariilor scanate și a profilului secțiunilor transversale prin membrana eritocitară pentru sânge amestecat cu diferite concentrații de procaină.

conc. Procaină, M	Aria scanată, μm^2	Mărirea celulei, μm	Adâncimea concavit., nm	Granule nm	RMS Ariile scanate, nm	RMS Profilul secțiunii, nm
5×10^{-7}	10 x 10	8	140	-	167	81,0
	1 x 1	-	-	24	1,0	0,4
	0,5 x 0,5	-	-	22	0,6	0,3
5×10^{-5}	10 x 10	8,3	240	-	175	108
	1 x 1	-	-	40	3,0	0,6
	0,5 x 0,5	-	-	40	2,53	0,6
5×10^{-4}	10 x 10	8,5	766	-	256	267
	0,5 x 0,5	-	-	80	9,0	2

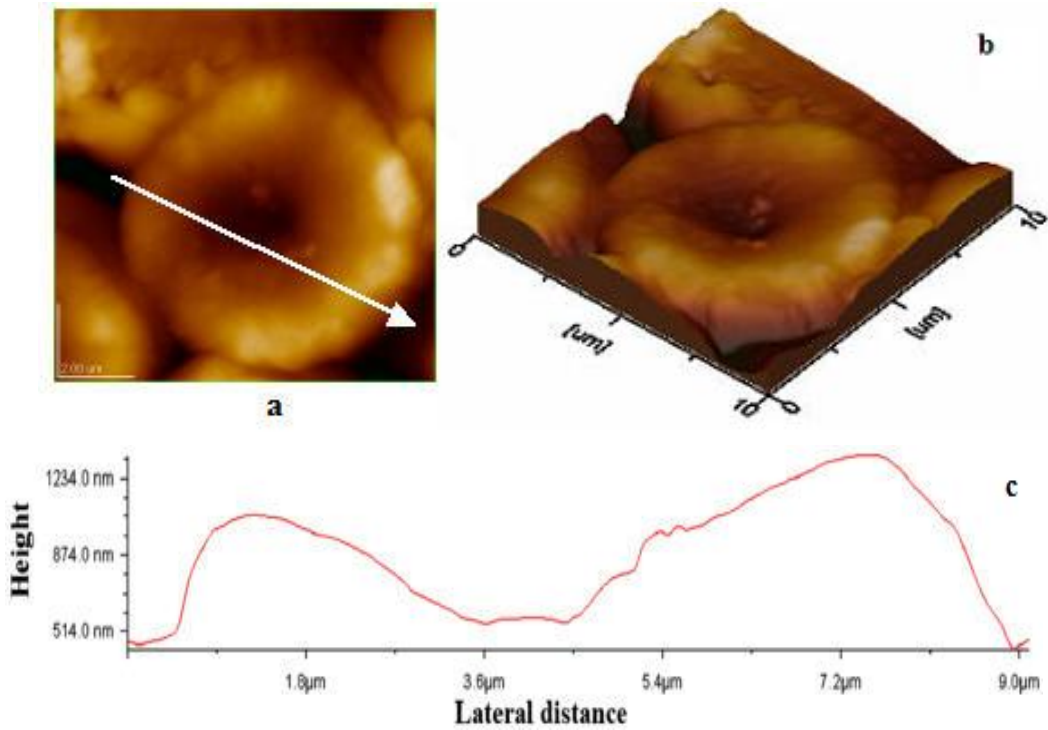


Fig. 6.2.7. Imagini AFM ale membranei eritrocitare în prezența $P 5 \times 10^{-4} M$. a) imagine topografică bidimensională; b) imagine topografică tridimensională; c) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din imaginea (a). Aria scanată: $10 \times 10 \mu m^2$.

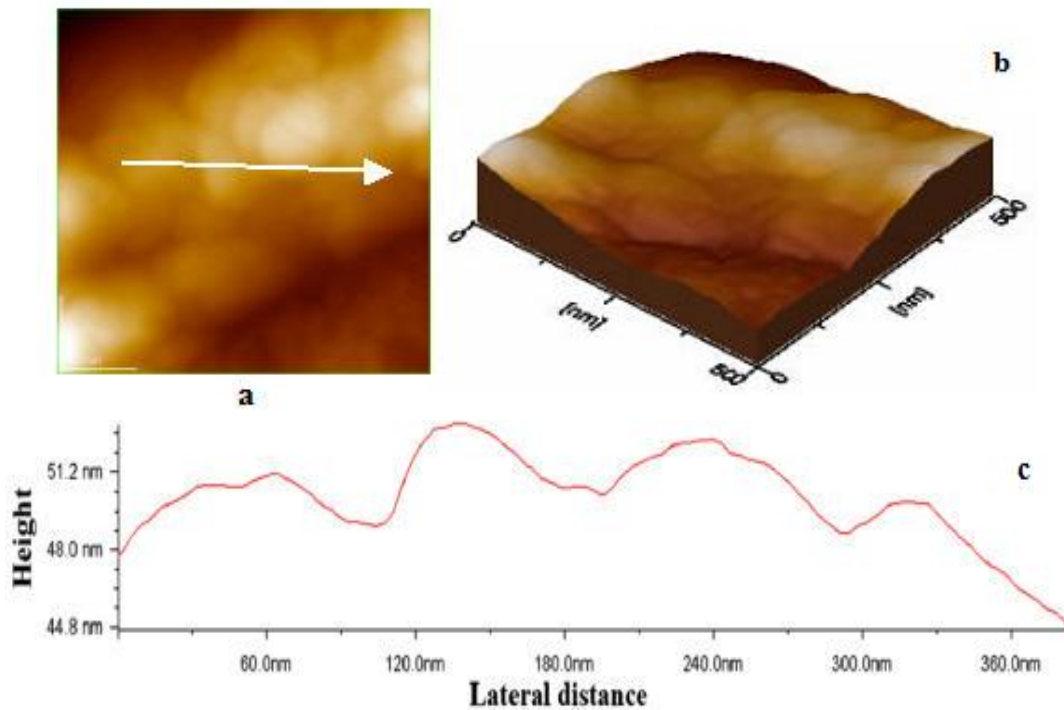


Fig. 6.2.8. Imagini AFM ale membranei eritrocitare în prezența $P 5 \times 10^{-4} M$. a) imagine topografică bidimensională; b) imagine topografică tridimensională; c) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din imaginea (a). Aria scanată: $0,5 \times 0,5 \mu m^2$.

Efectul procainei asupra membranei eritrocitare poate fi observat prin creșterea stabilității suprafeței membranei datorită interacțiunilor specifice dintre moleculele de procaină și componentele membranei. Efectul procainei asupra membranei celulare poate juca un rol important în anestezie și în funcționalitatea sa ca stimulant al sistemului nervos.

6.3. Observații AFM ale eritrocitelor tratate cu deferoxamină

Examinarea imaginilor AFM ale eritrocitelor umane în prezența DFO la concentrații diferite explică efectul medicamentului asupra membranei celulare (tabel 6.3.1). Structura domeniilor și porilor formați prin creșterea concentrațiilor de DFO pot fi explicate prin agregarea la suprafață și chiar perforarea membranei eritrocitare ajungându-se la interacțiuni între DFO cu proteinele din citoscheletul membranei (fig. 6.3.11, 6.3.14).

Mecanismul de formare a domeniilor și porilor sau procesele de perforare induse de DFO în concentrații ridicate se datorează interacțiunilor specifice dintre medicament și lipidele membranare.

Posibilitatea interacțiunii directe a DFO cu proteinele membranare poate duce la schimbări majore ale membranei eritrocitare în prezența medicamentului în concentrație ridicată.

Mecanismul molecular al interacțiunii medicamentului cu membrana celulară și fenomenele interfaciale care au loc la nivel celular, deși au fost intens studiate, nu sunt pe deplin elucidate. Ca prim pas în explicarea acțiunii medicamentelor, se presupune că acestea modifică structura membranei lipidice și astfel, pot schimba proprietățile biologice ale membranei.

Efectul concentrației medicamentului asupra caracteristicilor structurale și topografice ale membranei eritrocitare au fost analizate cu AFM [259]. Deoarece DFO formează un complex stabil cu fierul (III), acesta se folosește clinic pentru îndepărtarea excesului de fier din sânge și țesuturi, pentru tratarea otrăvirii acute cu fier [264], precum și în cazurile de otrăvire cu aluminiu asociate cu boli renale cronice [265].

Tabelul 6.3.1. Mărimea celulei eritrocitare, adâncimea concavității, diametrul granulelor, înălțimea aparentă a diferitor domenii, rugozitatea (RMS) ariilor scanate și a profilului secțiunilor transversale prin membrana eritocitară pentru sânge amestecat cu diferite concentrații de DFO.

Concentrația medicament (M)	Ariile scanate, μm^2	Mărime celulă, μm	Adâncime concavit., nm	Granule, nm	RMS Ariile scanate, nm	RMS, Profilul secțiuni, nm
DFO: 5×10^{-7}	10 x 10	7,7	180	-	170	102
	0,5 x 0,5	-	-	30	2	0,6
DFO: 5×10^{-6}	10 x 10	8,4	130	-	194	128
	5 x 5	-	-	-	111	106
	2,5 x 2,5	-	-	40-50	37,7	1,56
	1 x 1	-	-	40-50	5,16	1,25
DFO: 5×10^{-5}	0,5 x 0,5	-	-	55-60	1,41	1,19
	10 x 10	8	300	-	265	161
	0,5 x 0,5	-	-	50	1	1
DFO: 5×10^{-3}	15 x 15	-	-	680	32	32
	10 x 10	-	-	600	33	20
	5 x 5	-	-	400	25	10
	5 x 5	-	-	400	18	16
	2,5 x 2,5	-	-	230	14	8

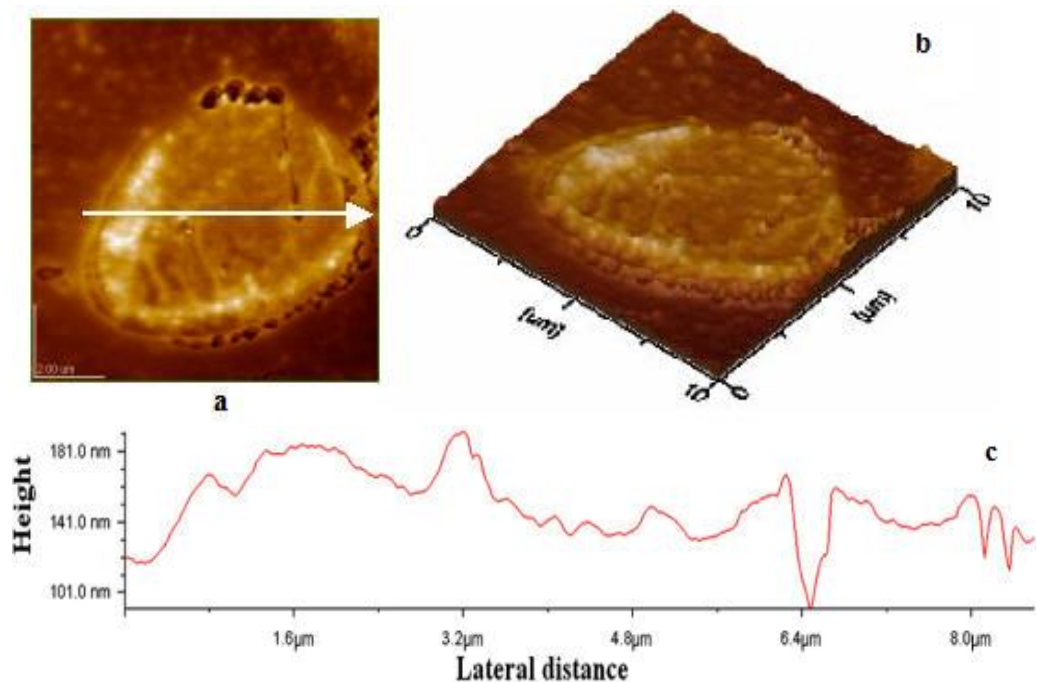


Fig.6.3.11. Imagini AFM ale membranei eritrocitare în prezența DFO $5 \times 10^{-3} \text{M}$. a) imagine topografică bidimensională; b) imagine topografică tridimensională; c) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din imaginea (a). Aria scanată: $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.

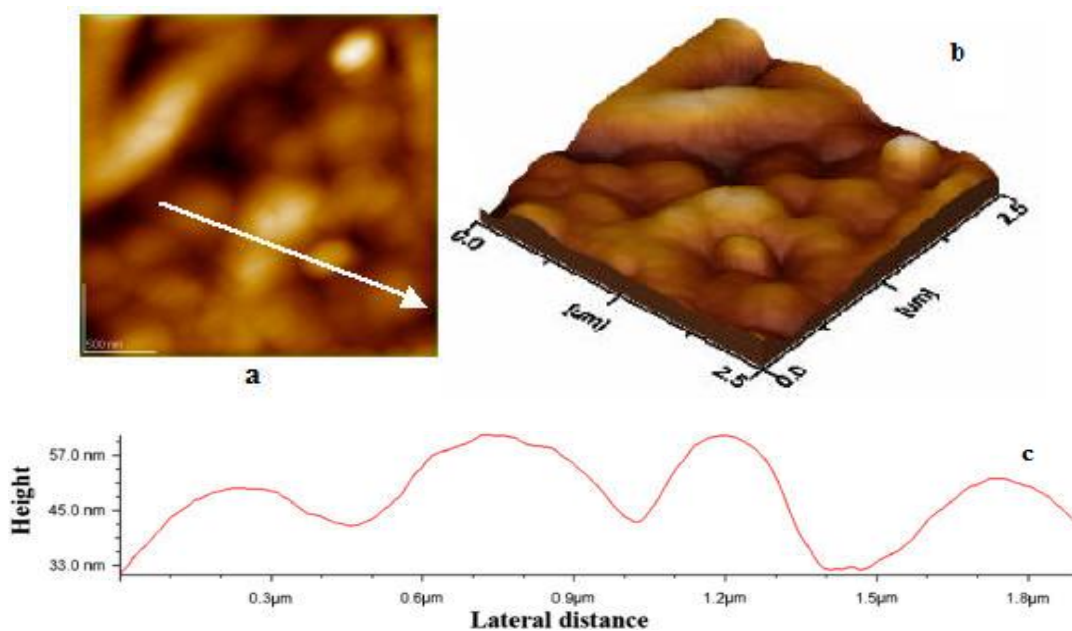


Fig.6.3.14. Imagini AFM ale membranei eritrocitare în prezența DFO $5 \times 10^{-3} \text{M}$. a) imagine topografică bidimensională; b) imagine topografică tridimensională; c) profilul secțiunii transversale de-a lungul săgeții din imaginea (a). Aria scanată: $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$.

În concluzie, concentrațiile medicamentelor sunt importante iar cu ajutorul AFM putem să vizualizăm efectele medicamentelor asupra membranei eritrocitare și posibilele implicații în tratamentul medical.

7. Concluzii

Am studiat comportamentul membranelor lipidice și a biomembranelor în interacțiune cu unii compuși chimici (anestezice, medicamente anticancer, ș.a.) pentru a înțelege mecanismul metabolizării medicamentelor.

Am studiat filmele monomoleculare de acizi grași adsorbite (Gibbs) sau etalate (Langmuir) la interfață fluidă, ca un prim model care să reproducă și să modeleze interacțiunile care au loc la nivelul membranei celulare.

a) Studiul dinamicii de adsorbție a soluțiilor benzenice de acid stearic și a soluțiilor apoase de dibucaină și tetracaină la interfața benzen/apă, a condus la obținerea următoarelor rezultate:

- Obținerea unei *noi ecuații cinetice controlată de difuziune*, bazată pe ecuația de difuziune a lui Ward și Tordai asociată cu ecuația de stare bidimensională de tip van der Waals care descrie foarte bine dinamica de adsorbție;
- Coeficienții de difuziune, concentrațiile subsuprafeței și parametri de interacțiune α , ai moleculelor de biosurfactant, calculați cu noua ecuație au valori apropiate de valorile obținute experimental pentru compuși chimici similari.

b) Studiul filmelor Langmuir de acid stearic etalat pe subfază apoasă cu pH 2 și influența medicamentelor adăugate în subfaza apoasă a condus la:

- Caracterizarea izotermei de compresiune a filmului monomolecular de acid stearic pur prin evidențierea fazelor caracteristice și a mecanismului de colaps.
- Studierea efectelor subfazei asupra filmului de AS în prezența P și DFO. S-a constatat o creștere a stabilității filmelor Langmuir de acid gras în prezența medicamentelor, evidențiată prin creșterea presiunii de colaps a acestora și mutarea izotermelor de compresiune ale AS cu medicamente la arii moleculare mai mari. În concluzie, în prezența medicamentelor are loc o expansiune a monostratului.

Modelarea matematică a izotermelor de compresiune din filmele de acizi grași, a fost efectuată prin trei metode:

1. Ecuații de stare.
2. Interpolarea cu funcții spline a izotermelor de compresiune.
3. Modelarea izotermelor de compresiune cu funcții spline cubice extinse.

Modelările matematice au dus la obținerea unui program de calcul flexibil și rapid care poate fi folosit pentru reproducerea fidelă a izotermelor de compresiune pentru diferiți biocompuși pentru care există date experimentale puține, obținându-se în final caracteristicile superficiale ale acestor filme.

Am studiat filme etalate de fosfolipide (DPPC, DMPC) pure sau în amestec cu anumiți compuși chimici (medicamente, colesterol) constatând următoarele:

- Presiunea de colaps crește în cazul filmelor cu medicamente valoarea cea mai mare fiind pentru filmul DPPC cu P.
- Ariile de colaps pentru toate filmele de lipidă sunt aceleași și independente de prezența medicamentelor în film. Aceasta înseamnă că medicamentele sunt expulzate din monostrat când acesta se apropie de colaps.
- Monostratul de DMPC devine mai condensat în prezența CHOL fapt evidențiat prin compararea caracteristicilor superficiale ale monostraturilor pure de DMPC și CHOL și a filmului mixte obținute din izotermele de compresiune ale acestora.

Am analizat comportamentul și morfologia filmelor subțiri transferate pe suport solid prin **tehnica Langmuir-Blodgett (LBT)**, cu ajutorul **microscopiei de forță atomică (AFM)** observând că:

- Mecanismul de colaps propus în cazul acidului stearic este confirmat de imaginile topografice, de fază și tridimensionale AFM.

- Filmele mixte de AS cu medicamente sunt mai stabile și mai omogene decât filmele de AS pur.
- Filmele de DPPC cu medicamente prezintă aceeași stabilitate ca și filmele de AS cu medicamente, fapt ce semnifică interacțiuni puternice între acești biocompuși prin legături de hidrogen, forțe van der Waals și interacțiuni electrostatice.
- Filmele mixte de DMPC cu CHOL prezintă structuri omogene cu o rugozitate scăzută. Această omogenitate a filmelor se datorează interacțiunilor dintre CHOL, care se încorporează în monostratul de DMPC și mărește stabilitatea filmului mixt.
- Filmele LB de acizi grași și lipide prezintă o stabilitate pe termen lung, observată și din imaginile AFM înregistrate la câteva zile după transfer și repetate după câteva luni până la un an. Rezultatele obținute oferă informații privind posibilele moduri de interacțiune a medicamentelor cu membrana celulară.

Am efectuat observații AFM pe asociate supramoleculare de colagen și am studiat morfologia membranelor de colagen în prezența unor medicamente anti-cancer (doxorubicina, 5- fluorouracilul și acidul lipoic) observând următoarele:

- Organizarea supramoleculară a moleculelor de colagen în prezența medicamentelor anti-cancer este datorată fragmentelor de colagen.
- Modul de interacțiune al medicamentelor anticancer cu fibra de colagen oferă informații valoroase privind transportul țintit al medicamentelor spre anumite țesuturi și membrane ale corpului uman și capacitatea fibrei de colagen de a elibera controlat aceste medicamente, optimizând efectul acestora.

Am efectuat observații AFM ale structurii membranei eritrocitare și a modificărilor produse de tratarea acesteia cu procaină și deferoxamină ajungând la următoarele concluzii:

- Diferite medicamente prezente în sânge modifică structura suprafeței membranei eritrocitelor influențând interacțiunile dintre lipidele și proteinele ce intră în componența acesteia.
- Scopul acestui studiu a fost stabilirea concentrației optime de medicament pentru a nu produce distrugerea celulelor eritrocitare și pentru a nu dăuna organismului uman.

Tematica tezei de doctorat este legată de bioingineria filmelor subțiri. Strategia de combinare a tehnicii Langmuir-Blodgett cu investigațiile AFM a făcut posibilă analiza și modelarea interacțiunilor unor compuși chimici asupra membranelor lipidice și a biomembranelor.

În această teză, am studiat interacțiunile a **sapte** compuși chimici cu membranele lipidice și biomembranele. Am modelat interacțiunile dintre aceștia și membrane fie prin modificarea concentrațiilor compușilor chimici fie prin modificarea condițiilor de depunere și transfer a filmelor lipidice în amestec cu compușii chimici studiați. În sprijinul constatărilor efectuate, am ilustrat modelarea interacțiunilor dintre biocompușii studiați și membranele biologice, precum și comportamentul membranelor lipidice pure și structura biomembranelor, cu imagini topografice, de fază, tridimensionale și secțiuni transversale ale imaginilor topografice AFM.

8. Bibliografie selectivă

- [3] E. Chifu, "Chimia Coloizilor și a Interfețelor", Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca (2000).
- [13] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, A. Mocanu, M. Lupea, E. Chifu, *J. Colloid Interface Sci.*, **117**, 464-476 (1987).
- [14] M. Tomoaia-Cotișel, E. Chifu, S. Jitian, I. Bratu, S. Bran, P. T. Frangopol, A. Mocanu, *Studia Univ Babeș-Bolyai, Chem.*, **35** (2), 17-24 (1990).
- [15] M. Tomoaia-Cotișel, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **83**, 155-166 (1990).
- [16] G. Gabrielli, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **34**, 31-72 (1991).
- [17] M. Tomoaia-Cotișel, D. A. Cadenhead, *Langmuir*, **7**, 964-974 (1991).
- [33] K. S. Birdi, D. T. Vu, *Langmuir*, **10**, 623- 625 (1994).
- [34] Z. Lu, B. Zhang, Z. Ai, J. Huang, H. Nakahara, *Thin Solid Films*, **284-285**, 127-129 (1996).
- [36] K. Ekelund, E. Sparr, J. Engblom, H. Wennerstrom, S. Engstrom, *Langmuir*, **15**, 6950-6955 (1999).
- [40] G.L.Gaines Jr., "Insoluble Monolayers at Liquid/Gas Interfaces", Interscience Publishers, New-York, (1966).
- [42] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, *Ann. Chim. (Rome)*, **71**, 189-200 (1981).
- [43] J. Zsako, M. Tomoaia-Cotișel, E. Chifu, A. Mocanu, P. T. Frangopol, *Gazz. Chim. Ital.*, **124**, 5-9 (1994).
- [48] M. Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei, G. Popa, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. 2. Phase behavior of stearic acid monolayers", *Rev. Roum. Chim.*, **50**(5), 381-395 (2005).
- [49] M. Tomoaia-Cotisel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop** , A. Mocanu, O. Cozar, N. Apetroaei, G. Popa, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. 3. Phase behavior of dipalmitoyl phosphatidyl choline monolayers", *Rev. Roum. Chim.*, **50**(6), 471-478 (2005).
- [59] M.I. Sălăjan, A. Mocanu, M. Tomoaia-Cotișel, "Advances in Thermodynamics, Hydrodynamics and Biophysics of Thin Layers", University Press, Cluj-Napoca, (2004).
- [60] M. Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei Gh. Popa, , "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. The effect of some drugs on dipalmitoyl phosphatidylcholine", *Studia Univ. Babeș Bolyai Chem.*, **49**(3), 141-152 (2004).
- [90] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell, *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 21-51 (1981).
- [92] E. Sparr, L. Erikson, J. A. Bouwstra, K. Ekelund, *Langmuir*, **17**, 164-172 (2001).
- [96] J. T. Davies, E. K. Rideal, *Interfacial Phenomena*, Second Edition, New York, Academic Press, 154-216 (1963).
- [97] A. F. H. Ward, L. Torday, *J. Chem.Phys.*, **14**, 453-461 (1946).
- [98] P. Joos, G. Bleys, G. Petre, *J. Chem.Phys.*, **79**(2), 387-395 (1982).
- [99] G. Bleys, P. Joos, *J. Chem.Phys.*, **89**(6), 1027-1032 (1985).
- [100] P. Joos, G. Serrien, *J. Colloid Interface Sci.*, **127**(1), 97-103(1989).
- [104] E. Chifu, M. Sălăjan, J. Demeter-Vodnar, M. Tomoaia-Cotișel, *Rev. Roum. Chim.*, **32**, 683-691 (1987).
- [105] M. Tomoaia-Cotișel, I. Albu, E. Chifu, *Stud. Univ. Babeș-Bolyai Chem.*, **24**(2), 68-73 (1979).
- [106] E. Chifu, M. Tomoaia, E. Nicoară, A. Olteanu, *Rev. Roum. Chim.*, **23**, 1163-1169 (1978).
- [107] M.Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**

- and E. Chifu, “**Adsorption dynamics of some biosurfactants at the benzene/water interface**”, *Rev. Roum. Chim.*, **49** (5), 443-464, (2004).
- [111] J. Guastalla, *Cahiers Phys.*, **10**, 30 (1942); *J. Chim. Phys.*, **43**, 184-185 (1946).
- [112] L. Ter Minassian-Saraga, *J. Chim. Phys.*, **52**, 80-99 (1955).
- [113] E. Chifu, J. Zsako, M. Tomoaia-Cotișel, *J. Colloid Interface Sci.*, **95**, 346-354 (1983).
- [114] M. Tomoaia-Cotișel, E. Chifu, A. Mocanu, J. Zsako, M. Sălăjan, P.T. Frangopol, *Rev. Roum. Biochim.*, **25**, 227-237 (1988).
- [115] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, *Stud. Univ. Babeș Bolyai Chem.*, **33**(2), 54-60 (1988).
- [119] M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei and Gh. Popa, “**Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. I. Structures of collapsed stearic acid monolayers**”, *Studia Univ. Babeș Bolyai Chem.*, **49**(2), 167-181, 2004.
- [120] P. Baglioni, G. Gabrielli, G. G. T. Guarini, *J. Colloid Interface Sci.*, **78**, 347-355 (1980).
- [121] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, D. A. Cadenhead, H. E. Ries, Jr., „Progress in Photosynthesis Research”, Edited by J. Biggins, Martinus Nijhoff Publishers, Vol. **2**, Chapter 4, 333-337, (1987).
- [122] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, A. Mocanu, I. Albu, E. Chifu, *Studia Univ. Babeș Bolyai, Chem.*, **32** (1), 58-67 (1987).
- [123] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, D. A. Cadenhead, *Langmuir*, **6**, 191-197 (1990).
- [124] D. Vollhardt, U. Retter, *J. Phys. Chem.*, **95**, 3723-3724(1991).
- [125] J. Zsako, M. Tomoaia-Cotișel, E. Chifu, *J. Colloid Interface Sci.*, **102**, 186-205 (1984).
- [133] J. Zsako, M. Tomoaia-Cotișel, E. Chifu, A. Mocanu, P. T. Frangopol, *Biochim. Biophys. Acta*, **1024**, 227-232 (1990).
- [135] E. Sparr, K. Ekelund, J. Engblom, S. Engstrom, H. Wennerstrom, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 486-487 (1999).
- [136] S. Ye, H. Noda, S. Morita, K. Uosaki and M. Osawa, *Langmuir*, **19**, 2238-2242 (2003).
- [137] M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop**, A. Mocanu, “**AFM studies on membrane phospholipids in presence of drugs**”, *The 3rd International Workshop – Scanning Probe Microscopy Life Sciences*, Berlin, October 13, 2004, Poster 25, publish on internet.
- [139] J. M. Boggs, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 353-404 (1987).
- [146] A. Cavalli, G. Borissevitch, M. Tabak, O. N. Oliveira Jr., *Thin Solid Films*, **284-285**, 731-734 (1996).
- [147] Z. Kozarak, B. Cosovic, D. Mobius, M. Dobric, *J. Colloid Interface Sci.*, **226**, 210-217 (2000).
- [148] A. Mocanu, Gh. Tomoaia, C.-R. Ispas, O.-C. Boroștean, D. Dubert, **Vasilica-Daniela Pop**, L. D. Boboș, M. Tomoaia-Cotișel, “**Two-dimensional nanostructures of dimyristoyl phosphatidylcholine and cholesterol at different interfaces**”, *Micro and Nanoengineering*, **9**, Romanian Academy Press, 178-191 (2006).
- [150] Y. Tagami, H. Ikigai, Y. Oishi, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **284/285**, 475-479 (2006).
- [151] M. Tomoaia-Cotișel, E. Chifu, *J. Colloid Interface Sci.*, **95**, 355-361 (1983).
- [152] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsakó, A. Mocanu, E. Chifu, P.J. Quinn, *Biochim. Biophys. Acta*, **942**, 295-304 (1988).
- [171] B. W. MacArthur, J. C. Berg, *J. Colloid Interface Sci.*, **68** (2), 201-213(1979).
- [180] K. Ichida, F. Yoshimoto, T. Kiyono, *Computing*, **16**, 329-338 (1976).

- [181] F. Yoshimoto, „Studies on Data Fitting with Spline Functions”, Ph. D. Thesis, Kyoto University, Japan, 1977.
- [182] G. Micula, „Funcții spline și aplicații”, Ed. Tehnică, București, 1978.
- [188] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, A. Mocanu, P. T. Frangopol, P. J. Quinn, *J. Rom. Colloid Surface Chem. Assoc.*, **2** (3-4), 30-36 (1997).
- [189] M. Tomoaia-Cotișel, A. Mocanu, J. Zsako, T. Oproiu, A. Aldea, P. J. Quinn, *J. Rom. Colloid Surface Chem. Assoc.*, **3**(2) 5-11 (1999).
- [190] M. Tomoaia – Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, P. J. Quinn, *Chem. Phys. Lipids*, **50**, 127-133 (1989).
- [191] M. Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, E. Chifu, P. J. Quinn, *Chem. Phys. Lipids*, **34**, 55-64 (1983).
- [195] P. Ehrenfest, *Proc. Akad. Sci. Amsterdam*, **36**, 147-153 (1933).
- [198] M. Tomoaia-Cotișel, **Vasilica-Daniela Pop**, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, Cs. Racz, C. R. Ispas, O. Pascu, O. C. Boroștean, , “**Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. 4. The influence of aluminium substrate on dipalmitoyl phosphatidylcholine nanolayers**”, *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, **50**(1), 23-37, (2005).
- [201] A. Mocanu, Gh. Tomoaia, C.-R. Ispas, O.-C. Boroștean, D. Dubert, **Vasilica-Daniela Pop**, L. Boboș and M. Tomoaia-Cotișel, “**Two-dimensional nanostructures of dimyristoyl phosphatidylcholine and cholesterol at different interfaces**”, in *Convergence of Micro-Nano-Biotechnologies*, Series in *Micro and Nanoengineering*, **Volume 9**, Romanian Academy Press, București, 178 –191, 2006.
- [202] Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop-Toader**, A. Mocanu, O. Horovitz, L. D. Bobos, M. Tomoaia-Cotișel, “**Supramolecular organization and nanostructuring of collagen and anticancer drugs**”, *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, **52**(4), 2007.
- [203] Gh. Tomoaia, M. Tomoaia-Cotișel, A. Mocanu, O. Horovitz, L. D. Boboș, M. Crișan, I. Petean, *J. Optoelectron. Adv. Mat.*, **10** (4), 961-964 (2008).
- [211] F. A. Denis, P. Hanarp, D. S. Sutherland, J. Gold, C. Mustin, P. G. Rouxhet, Y. F. Dufrene, *Langmuir*, **18**, 819-828 (2002).
- [212] K. Kato, G. Bar, H.-J. Cantow, *Eur. Phys. J.*, **E6**, 7-14 (2001).
- [214] M. Tomoaia-Cotișel, A. Mocanu, N. Leopold, M. Vasilescu, V. Chiș, O. Cozar, *J. Optoelectron. Adv. Mat.*, **9**, 637-640 (2007).
- [215] E. Gurdak, P. C. Rouxhet, C. C. Dupont-Gillain, *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, **52**, 76 (2006).
- [217] C.C. Dupont-Gillain, I. Jacquemart, P. G. Rouxhet, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **43** (3-4), 179-186 (2005).
- [221] M. Tomoaia-Cotișel, A. Mocanu, G. Tomoaia, J. Zsako and T. Yupsanis, *J. Roum. Assoc. Colloid Surface Chem.*, **4**, 5-12 (2001).
- [259] M. Tomoaia- Cotișel, **Vasilica-Daniela Pop-Toader**, U. V. Zdrenghia, Gh. Tomoaia, O. Horovitz, A. Mocanu, „ **Desferal effect on human erythrocyte membrane. An atomic force microscopy analysis.**”, *Studia Univ. Babeș Bolyai, Chem.*, **54** (4), 285-296 (2009).
- [264] W. Banner Jr., T. G. Tong, *Pediatrics Clinics of North America*, **33**, 393-409 (1986).
- [265] J. P. Day, P. Ackrill, *Therapeutic Drug Monitoring*, **15**, 602-607 (1993).

9. Lista publicațiilor

A. Articole științifice

- 1) M.Tomoaia-Cotișel, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, D. T. Pleșa, S. Pleșa și I. Albu, "Equations of state for films of fatty acids at the air/water interface", *Proceedings of The VII-th Symposium of Colloid and Surface Chemistry*, București, 42-47, 2002.
- 2) M.Tomoaia-Cotișel, J. Zsako, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop** și E. Chifu, "Adsorption dynamics of some biosurfactants at the benzene/water interface", *Rev. Roum. Chim.*, **49** (5), 443-464, 2004.
- 3) M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei și Gh. Popa, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. I. Structures of collapsed stearic acid monolayers", *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, **49**(2), 167-181, 2004.
- 4) M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop**, A. Mocanu, O. Cozar, N. Apetroaei și Gh. Popa, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. The effect of some drugs on dipalmitoyl phosphatidylcholine", *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Phys.*, **49**(3), 141-152, 2004.
- 5) M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop**, A. Mocanu, N. Apetroaei și Gh. Popa, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. 2.Phase behavior of stearic acid monolayers", *Rev. Roum. Chim.*, **50** (5), 381-395, 2005.
- 6) M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop**, A. Mocanu, O. Cozar, N. Apetroaei și Gh. Popa, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. 3.Phase behavior of dipalmitoyl phosphatidyl choline monolayers", *Rev. Roum. Chim.*, **50** (6), 473-480, 2005.
- 7) M.Tomoaia-Cotișel, **Vasilica-Daniela Pop**, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, Cs. Racz, C. R. Ispas, O. Pascu și O. C. Boroștean, "Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. 4.The influence of aluminium substrate on dipalmitoyl phosphatidylcholine nanolayers", *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, **50**(1), 23-37, 2005.
- 8) **Vasilica-Daniela Pop**, „Metode moderne de investigare a interacțiunilor unor compuși chimici asupra membranelor lipidice și biomembranelor”, *Rev. de Politica Științei și Scientometrie*, nr. special, ISSN 1582-1218,1-10, 2005.
- 9) M. Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei și Gh. Popa, "Structures of stearic acid monolayers studied as Langmuir-Blodgett films and atomic force microscopy", *Proceedings of the 8th Symposium on Colloid and Surface Chemistry*, Galați, June 3-5, 4 pag., publicate pe DVD, 2005.
- 10) M.Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei and Gh. Popa, "Structures of stearic acid monolayers studied as Langmuir-Blodgett films and atomic force microscopy", *Proceedings of the 8th Symposium on Colloid and Surface Chemistry*, Galați, June 3-5, 2005, 4 pag., publicate pe DVD..
- 11) A. Mocanu, Gh. Tomoaia, C.-R. Ispas, O.-C. Boroștean, D. Dubert, **Vasilica-Daniela Pop**, L. Boboș și M. Tomoaia-Cotișel, "Two-dimensional nanostructures of dimyristoyl phosphatidylcholine and cholesterol at different interfaces", in „Convergence of Micro-Nano-Biotechnologies”, Series in „Micro and Nanoengineering”, Vol. **9**, Editors: Maria Zaharescu, Emil Burzo, Lucia Dumitru, Irina Kleps și Dan Dascălu, Romanian Academy Press, Bucharest, 178 –191, 2006.
- 12) Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop-Toader**, A. Mocanu, O. Horovitz, L. D. Boboș, M. Tomoaia-Cotișel, "Supramolecular organization and nanostructuring of collagen and anticancerdrugs", *Studia Univ. Babeș Bolyai Chem.*, **52**(4), 137-152, 2007.

- 13) M. Tomoaia-Cotișel, **Vasilica-Daniela Pop-Toader**, U. V. Zdrenghea, Gh. Tomoaia, O. Horovitz, A. Mocanu, „Desferal effect on human erythrocyte membrane. An atomic force microscopy analysis.”, *Studia Univ. Babeș Bolyai Chem.*, **54** (4), 285-296, 2009.

B. Carte publicată în domeniul multidisciplinar al tezei

1. E. Chifu, M. Tomoaia-Cotișel, I. Albu, A. Mocanu, M. I. Sălăjan, Cs. Racz și **Vasilica-Daniela Pop**, „Metode experimentale în chimia și biofizica coloizilor și a interfețelor”, Presa Universitară Clujeană, 2004, pp.175, ISBN: 973-610-242-4.

C. Comunicări științifice

1. M. Tomoaia-Cotișel, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, D. T. Pleșa, S. Pleșa and I. Albu, “Equations of state for films of fatty acids at the air/water interface”, The VII-th Symposium of Colloid and Surface Chemistry, București, Septembrie 2002.
2. M. Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop**, A. Mocanu, O. Cozar, N. Apetroaei and Gh. Popa, “Atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films. The effect of some drugs on dipalmitoyl phosphatidyl choline”, The 1st International Conference – Advances Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems, Cluj-Napoca, September 19-22, 2004.
3. M. Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, **Vasilica-Daniela Pop**, A. Mocanu, “AFM studies on membrane phospholipids in presence of drugs”, The 3rd International Workshop – Scanning Probe Microscopy Life Sciences, Berlin, October 13, 2004.
4. M. Tomoaia-Cotișel, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, N. Apetroaei and Gh. Popa, ” Structures of stearic acid monolayers studied as Langmuir-Blodgett films and atomic force microscopy”, The 8th Symposium on Colloid and Surface Chemistry, Galați, June 3-5, 2005.
5. A. Mocanu, **Vasilica-Daniela Pop**, C. R. Ispas, O. C. Borăștean, D. Dubert, Gh. Tomoaia, L. D. Boboș, O. Pascu, M. Tomoaia-Cotișel, „Two-dimensional nanostructures of dimyristoyl phosphatidylcholine and cholesterol at different interfaces”, The 5th National Seminar of Nanoscience and Nanotechnology, București, March 2, 2006.

D. Cercetare contractuală:

În calitate de responsabil de tema Contract/grant CNCSIS

1. „Metode moderne de investigare a interacțiunilor unor compuși chimici asupra membranelor lipidice și biomembranelor.”
Contract CNCSIS/2003, cod CNCSIS 15/549
2. „Metode moderne de investigare a interacțiunilor unor compuși chimici asupra membranelor lipidice și biomembranelor.”
Contract CNCSIS/2004, cod CNCSIS 15/549 și supliment 8/549