

**INTERAÇÃO DE POLI(ETILENO GLICOL) COM BROMETO DE
DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO E DIDODECILDIMETILAMÔNIO
EM DISPERSÕES AQUOSAS**

Cecilia Cristina Marques dos Santos

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

São José do Rio Preto - SP

03 de março de 2006



IAL – Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de São José do Rio Preto

**INTERAÇÃO DE POLI(ETILENO GLICOL) COM BROMETO DE
DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO E DIDODECILDIMETILAMÔNIO EM
DISPERSÕES AQUOSAS**

Cecilia Cristina Marques dos Santos

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

São José do Rio Preto - SP

03 de março de 2006

Índice	página
Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução	1
Surfactantes em solução	2
Micelas	3
Vesículas	5
Vesículas de DODAB e DDAB em solução aquosa	8
Vesículas de DODAB	11
Vesículas de DDAB.....	12
Temperatura de transição de DODAB e DDAB (T_M).....	13
Efeito de histerese	15
Aplicações de Surfactantes	16
Polímeros em solução	17
Poli(etileno glicol) (PEG)	19
Interação Polímero-Surfactante	21
Diagrama Ternário de fases.....	24
Birrefringência	25
Objetivos da Tese	27
Materiais e Métodos	28
Métodos.....	28
Materiais	28
Preparação Amostras	30
Preparação Vesículas	30
Preparação Vesículas com Sonda	32
Preparação das soluções do Polímero	31
Preparação das misturas dePEG/DODAB/água.....	32
Construção dos Diagramas Ternários de Fases do Sistema PEG/ Surfactante/ Água	32

Métodos	35
Medidas de Turbidez	35
Medidas de Fluorescência	36
Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	38
Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	39
Medidas de Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)	43
Avaliação da Atividade Bactericida	45
Resultados e Discussão	49
Resultados de Turbidez	49
Resultados de Fluorescência	60
Resultados de DSC	63
Resultados de ITC	67
Diagrama Ternários de Fase	71
Sistema PEG/DDAB/Água	74
Diagrama do Sistema PEG/DDAB/água	74
DSC para o sistema PEG/DDAB/Água	78
Sistema PEG/DODAB/Água	82
Diagrama do Sistema PEG/DODAB/água	82
Atividade Bactericida dos Sistemas DODAB/ Água e DODAB/ PEG/Água	85
Conclusões	87
Referências	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Esquema da estrutura de um típico surfactante e uma micela, esférica ou cilíndrica, formada desse surfactante em solução aquosa, visto em corte.....	4
Figura 2- Esquema da estrutura de um típico surfactante e uma vesícula, em corte, formada desse surfactante em solução aquosa.....	6
Figura 3- Tipos de vesículas: unilamelares pequenas, unilamelares grandes, multilamelares e vesículas multiestruturais.....	7
Figura 4- Classificação de vesículas em função de seu tamanho: Vesículas unilamelares pequenas (SUV), Vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas multilamelares (MLV).....	8
Figura 5- Temperatura de transição geo-líquido cristalina obtida por calorimetria diferencial de varredura, em função do número de átomos de carbono nas caudas de surfactantes dialquilados derivados da amônia quaternária.....	14
Figura 6- Transição de estado em uma bicamada entre a fase gel e líquido-cristalina.....	15
Figura 7- Estrutura molecular da sonda fluorescente trans, trans, 1,4-difenil-1,3 butadieno (DPB).....	29
Figura 8- Estrutura molecular do brometo de dioctadecildimetilamônio.....	29
Figura 9- Triângulo de Gibbs para a construção de diagrama ternário de fases esquemático de três componentes: polímero, surfactante e água à temperatura fixa.....	34
Figura 10- Desenho esquemático de uma curva de DSC, indicando os parâmetros obtidos para sistema vesicular.....	40
Figura 11- Efeito do tempo na turbidez ($\lambda = 550$ nm) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06 % p/p) sonicadas e não sonicadas em água (curva normalizada).....	50

Figura 12- Efeito do tempo na turbidez ($\lambda = 550 \text{ nm}$) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) não sonicadas em água, e concentrações crescentes de PEG _{12K} , para $R = \text{PEG/DODAB} = 0, 1, 3, 5,3 \text{ e } 10,4$ (curvas normalizadas).....	51
Figura 13- Efeito do tempo na turbidez ($\lambda = 550 \text{ nm}$) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) sonicadas em água, e concentrações crescentes de PEG _{12K} , para $R = \text{PEG/DODAB} = 0, 1, 2, 4,9 \text{ e } 10,1$ (curvas normalizadas).....	53
Figura 14- Efeito da concentração de PEG _{12K} na turbidez ($\lambda = 550 \text{ nm}$) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) não sonicadas em água, após os tempos de 150, 250 e 300 horas.	54
Figura 15- - Efeito da concentração de PEG _{12K} na turbidez ($\lambda = 550 \text{ nm}$) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) sonicadas em água, após os tempos de 150, 250 e 300 horas, conforme legenda.	55
Figura 16- Efeito da razão molar $R = \text{PEG}_{12K}/\text{DODAB}$ na turbidez do sistema DODAB/PEG _{12K} /água, para 1 mM de DODAB não sonicada, a 25°C.	57
Figura 17- Turbidez ($\lambda = 500 \text{ nm}$) de DODAB 1 mM, na ausência e presença de PEG _{12K} , em função da temperatura, para as razões molares $R = \text{PEG}_{12K}/\text{DODAB} = 0, 2 \text{ e } 6$. Amostra não sonicada.	58
Figura 18- Efeito de PEG _{12k} no espectro de fluorescência de DPB em vesículas não sonicadas de DODAB 1,0 mM (25°C).	61
Figura 19- Intensidade de fluorescência de DPB em função da razão molar PEG _{12k} /DODAB, para vesículas não sonicadas 1,0 mM (25°C).	62
Figura 20- Termograma DSC de DODAB e DDAB 5 mM preparada espontaneamente. Para fins de comparação, mostramos também o termograma para o surfactante homólogo C ₁₆ (brometo de dihexadecildimetilamônio) não investigado nesta Tese.	63
Figura 21- Termograma de DSC de DODAB 1mM em dispersão aquosa de vesícula não-sonicada na ausência e presença de PEG _{12k} ($R = 0, 0,5, 1,0, 4,0, 6,0 \text{ e } 12$).	64

Figura 22- Temperatura de transição (T_M), obtida por DSC, em função da razão de concentração molar $R=PEG_{12K}/DODAB$ para amostra não sonicada.	66
Figura 23- Calor de interação ($25^\circ C$) de PEG_{12K} com vesículas (não sonicadas) de DODAB 1,0 mM.....	68
Figura 24- Variação da entalpia medida em função de PEG_{12K} adicionado a solução de DODAB 1,0 mM ($25^\circ C$).....	69
Figura 25- Variação da entalpia medida em função de PEG_{12K} adicionado a solução de DODAB 1,0 mM ($50^\circ C$).....	70
Figura 26- Diagrama ternário de fases do sistema PEG/DDAB/água, para o PEG com massa molecular de 2 MDa, $25^\circ C$. Notação: ISO, Isotrópica contendo vesículas em solução; ISO', isotrópica birrefringente por fluxo contendo vesículas e estruturas lamelares em solução; D ₁ , birrefringente contendo estruturas lamelares.	72
Figura 27- Diagrama ternário de fases do sistema PEG/DODAB/água, para o PEG com massa molecular de 2 MDa, $25^\circ C$. Notação: ISO, Isotrópica contendo vesículas em solução; ISO', isotrópica birrefringente por fluxo contendo vesículas e estruturas lamelares em solução; D ₁ , birrefringente contendo estruturas lamelares.	73
Figura 28- Diagramas ternários de fases do sistema PEG/DDAB/água, para o PEG com massa molecular variando de 200 Da a 2 MDa, $25^\circ C$	77
Figura 29- Termograma DSC, obtido por aquecimento da amostra, para o sistema DDAB/água (0,1%/99,9%).....	80
Figura 30- Termograma DSC, obtido por aquecimento das amostras, para os sistemas $PEG_{200Da}/DDAB/água$ (0,1%/0,1%/99,8%), para PEG_{12k} , PEG_{35k} , PEG_{100k} , PEG_{2MDa}	81
Figura 31- Diagramas ternários de fases do sistema PEG/DODAB/água, para PEG com massa molecular variando de 200 Da a 2 MDa, $25^\circ C$	84

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Valores de T_m do sistema PEG _{12k} /DODAB (dispersões não sonicadas) para diferentes valores de R, obtidos por turbidez em diferentes comprimentos de onda (λ). Incerteza nas medidas: $\pm 0,5^\circ\text{C}$	59
Tabela 2- Valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ e DH para o sistema PEG _{12k} /DODAB (vesícula não sonicada) para diferentes razões R = PEG _{12k} /DODAB, obtidas por DSC.....	65
Tabela 3- Valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ e DH para o sistema PEG _{35k} /DODAB (vesícula não sonicada) para diferentes razões R = PEG/DODAB, obtidas por DSC.....	65
Tabela 4- Área das fases ISO, ISO' e ISO + D ₁ nos diagramas ternários de fases do sistema DDAB/PEG/água.	76
Tabela 5- Valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ e ΔH para o sistema PEG/DDAB/água (0,1%/0,1%/99,8%) para diferentes massas moleculares de PEG, obtidas por DSC.....	79
Tabela 6- Área das fases ISO' + AG e ISO'' + AG nos diagramas de fases PEG/DODAB/água.	83

RESUMO

Poli(etilenoglicol) (PEG) é um polímero neutro hidrossolúvel, e brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e didodecildimetilamônio (DDAB) são surfactantes catiônicos dialquilados, C_{18} e C_{12} , respectivamente, derivados da amônia quaternária, formadores de vesículas. As suas propriedades físicas, em solução aquosa, são bem conhecidas. No entanto, as propriedades de misturas desse polímero com esses surfactantes não o são. Investigamos a interação de PEG com DODAB e DDAB em solução aquosa, numa faixa de concentração total dos componentes até 1% em peso, e construímos diagramas de fases, com especial destaque para a fase vesicular. Utilizamos PEG com massa molecular entre 200 Da e 2 MDa e os diagramas de fases foram construídos a 25°C, isto é, acima da temperatura de transição gel-líquido cristal (T_m) de DDAB ($T_m = 16^\circ\text{C}$) e abaixo da T_m de DODAB ($T_m = 45^\circ\text{C}$). DODAB e DDAB têm a característica comum de formar vesículas unilamelares em baixas concentrações do surfactante e vesículas multilamelares em concentrações mais elevadas; em regiões intermediárias, vesículas uni e multilamelares coexistem em equilíbrio na solução. A fronteira entre essas regiões de vesículas não é muito bem definida e observamos, neste estudo, que o efeito de PEG na estrutura de agregados de DODAB e DDAB em água depende da massa molecular do polímero. Além disso, PEG favorece a formação de vesículas unilamelares em concentrações mais elevadas de DODAB e DDAB, quando predominam as vesículas multilamelares de DODAB puro (sem o polímero), possibilitando a formação de vesículas mistas de DODAB/PEG e DDAB/PEG em água e concentrações relativamente grandes desses surfactantes. Dentre os métodos experimentais empregados nesse estudo, destacamos, turbidimetria, fluorescência de estado estacionário, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e por titulação isotérmica (ITC) e análise visual por polarizadores cruzados. Foram feitos também testes da atividade bactericida em microrganismos de referência, de vesículas de DODAB 1 mM (sonicadas e não sonicadas), na ausência e presença de PEG_{200Da} e PEG_{2MDa}, utilizando o método dos cilindros carreadores. Como os testes não revelaram atividade nas formas puras, em 10 minutos de contato, tais sistemas não poderiam ser classificados como eficazes, por exemplo, para uso hospitalar.

ABSTRACT

Poly (ethyleneglycol) (PEG) is a water soluble neutral polymer, and dioctadecyldimethylammonium (DODAB) and didodecyldimethylammonium (DDAB) bromide are double chain cationic surfactants derived from the quaternary ammonium that have been widely investigated due to their high application potential in different areas of the science and technology. The physical properties of PEG, DODAB and DDAB in aqueous solution are well-known. However, the properties of mixtures of the polymer with those surfactants are not. We investigated the interaction of PEG with DODAB and DDAB in aqueous solution, within a range of total concentration of the components of 0-1 wt%, and the phase diagrams built up, with special interest for the vesicular phases. We used PEG with molecular mass between 200 Da and 2 MDa and the phase diagrams were built up at 25°C, that is, above the melting temperature (T_m) of DDAB ($T_m = 16^\circ\text{C}$) and below T_m of DODAB ($T_m = 45^\circ\text{C}$). DODAB and DDAB have the common characteristic of forming unilamellar vesicles at low surfactant concentrations and multilamellar vesicles at higher concentrations; at intermediate concentrations, uni- and multilamellar vesicles coexist in solution. The borders of these different vesicle phases are not well defined. We observed in this Thesis that the effect of PEG on the structures of DODAB and DDAB aggregates in water depends on the molecular mass of the polymer. Besides, PEG stabilizes the unilamellar vesicles at high concentrations of DODAB, where the multilamellar vesicles are the dominant structures present in solution, thus allowing the formation of mixed DODAB/PEG and DDAB/PEG vesicles in water at relatively high concentrations of these surfactants. The experimental methods used in this investigation include turbidimetry, steady-state fluorescence, differential scanning calorimetry (DSC), isothermal titration calorimetry (ITC), and visual analysis by crossed polaroids. It was also performed bactericidal activity tests for reference microorganisms of 1 mM DODAB in sonicated and non-sonicated aqueous dispersions, in the presence and absence of PEG_{200Da} and PEG_{2MDa}. The effect was made using the method of the cart road cylinders. It revealed no bactericidal activity in the pure form within 10 minutes (or longer time) of contact, meaning that DODAB or DODAB/PEG is not efficient as bactericidal agent for hospitable use.

INTRODUÇÃO

Vesículas são estruturas fechadas, formadas por bicamadas de surfactantes em solução aquosa contendo um ambiente aquoso interno, separado do volume aquoso externo pela bicamada. A estrutura das vesículas tem sido muito investigada como sistema mimético de membranas de fosfolípidios naturais e com relação, por exemplo, ao transporte de pequenas moléculas através da bicamada e ao transporte de macromoléculas como o DNA através da corrente sanguínea (LASIC, 1988; FENDLER, 1982).

O potencial de aplicação das vesículas depende fundamentalmente do controle de tamanho, densidade de carga elétrica e estabilidade. Numa tentativa de adquirir conhecimento no processo de preparação de vesículas catiônicas estáveis em solução aquosa, propusemos investigar o efeito de co-solutos na formação e propriedades de vesículas de DODAB em água. Este surfactante é um dos mais estudados, e suas vesículas, formadas em solução aquosa, possuem diferentes curvaturas e grau de estabilidade dependentes do método de preparação, como sonicação, extrusão, injeção ou mistura simples dos componentes (FEITOSA & KARLSSON, 2005; FEITOSA, KARLSSON, & EDWARDS, 2005; FEITOSA & BARRELEIRO, 2004; BENATTI *et al.*, 2001; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). Porém, há registro na literatura que as vesículas com diâmetro de até 400 nm são instáveis abaixo de sua temperatura de transição e fundem-se espontaneamente formando vesículas maiores (LICHTENBERG *et al.*, 1981). Em todos esses métodos, as vesículas são preparadas acima da temperatura de transição do estado gel líquido-cristalino (T_m) das cadeias do surfactante.

Nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa tem investigado extensivamente as características das vesículas de DODAB em solução aquosa, formadas espontaneamente por mistura simples, a ~60°C (isto é, acima da temperatura de transição gel-líquido cristalina, $T_m = 45^\circ\text{C}$ para DODAB), de DODAB com o solvente aquoso apropriado, e tem procurado formas alternativas de produzir essas vesículas com tamanho e estabilidades controladas. Dentre essas formas alternativas, destacam-se a adição de co-surfactantes e co-solutos, por exemplo, surfactantes e sais inorgânicos (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000; BARRELEIRO, OLOFSSON & FEITOSA, 2000; BENATTI *et al.*, 1999).

Nesta Introdução, discorreremos, de maneira breve, sobre os conceitos básicos de surfactantes, micelas, vesículas, polímeros e interação polímero-surfactante, além do método de construção de diagramas ternário de fases para representação gráfica de misturas desses compostos, indicando as regiões de diferentes fases do sistema.

Surfactantes em solução

Surfactantes são moléculas anfifílicas contendo duas partes distintas: uma *hidrofílica*, com grande afinidade por água, ou outro solvente polar, e a outra *hidrofóbica*, com muita afinidade por solvente apolar. Detergente e lipídios são exemplos clássicos de surfactante (TEXTER, 1999; JÖNSSON *et al.*, 1998).

A pergunta que se faz é qual o comportamento dessas moléculas na presença de um solvente polar ou apolar, ou em uma mistura bifásica desses solventes? Devido à característica anfifílica dos surfactantes, naturalmente, eles tendem a se localizar na região de interface entre as fases polar e apolar, reduzindo a tensão interfacial (trabalho reversível necessário para aumentar a interface) do sistema. Essas moléculas também são denominadas, em português, tensoativas (HIEMENZ, 1997).

Para um dado sistema binário solvente/surfactante são muitas as formas possíveis de agregação de surfactantes, de modo a mantê-los nas regiões interfaciais, energeticamente favoráveis, formando uma série de fases contendo estruturas normais ou reversas, tais como as fases: micelar, cúbica, hexagonal, lamelar, vesicular, hexagonal reversa, cúbica reversa, e micelar reversa (JÖNSSON *et al.* 1998; SHINODA, 1967). Esta seqüência de fases é denominada *diagrama de Fontell*, na qual a fase lamelar se encontra no centro do diagrama e, com o aumento da concentração, as fases apresentam-se na seguinte ordem: monomérica < micelar < hexagonal < lamelar < hexagonal reversa < micelar reversa, embora não necessariamente formem todas essas fases, como no caso de DODAB que não forma as três primeiras fases (JOHNSSON & EDWARDS, 2001; FONTELL, 1990).

Micelas

As micelas normais de surfactantes em água são pequenos agregados esféricos e cilíndricos, cujo interior é constituído pelo componente hidrofóbico do surfactante, semelhante a uma microrregião oléica, e na região da superfície micelar encontram-se os grupos de extremidades polares dos surfactantes e, no caso de surfactantes iônicos, contraíons misturados a moléculas de água. O raio de hidratação dessas micelas é da ordem do comprimento das caudas do surfactante que as constituem (Figura 1) (MYERS, 1999; JÖNSSON *et al.*, 1998).

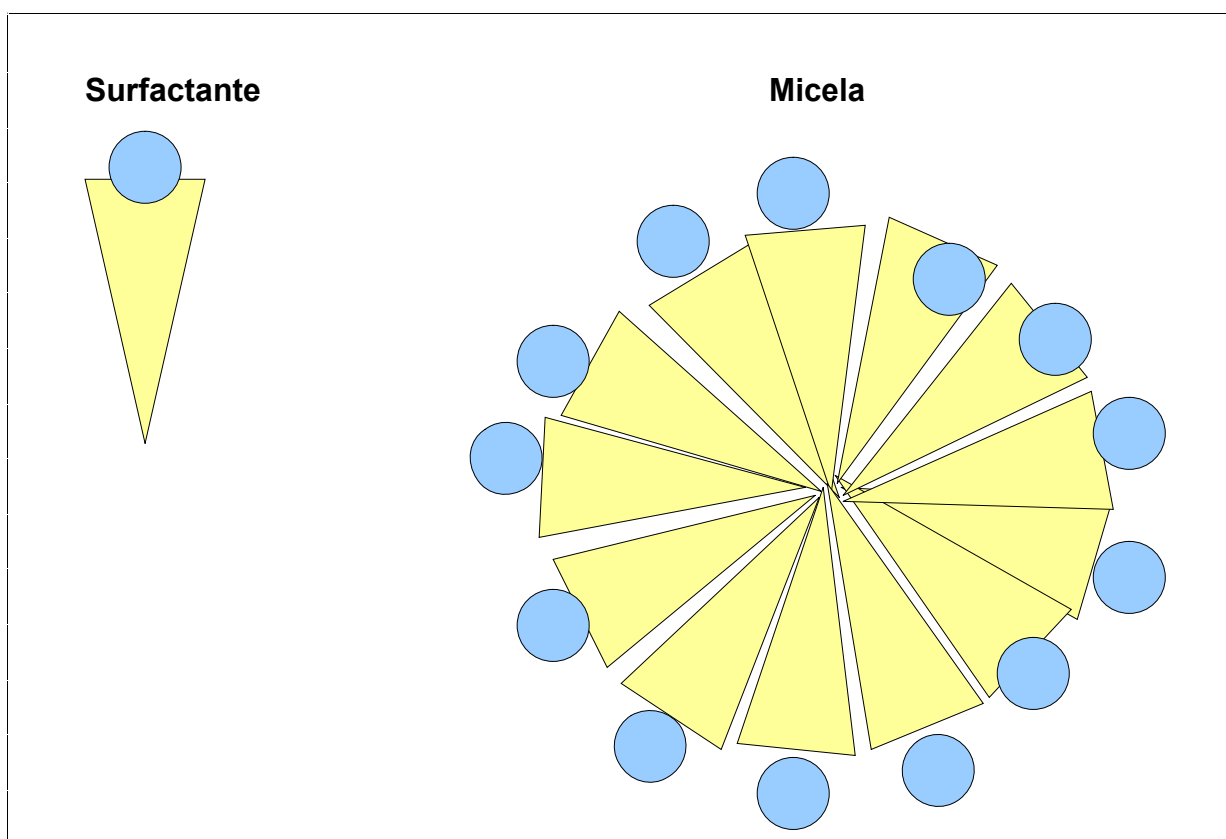


Figura 1 – Esquema da estrutura de um típico surfactante e uma micela, esférica ou cilíndrica, formada desse surfactante em solução aquosa, visto em corte. As cores azul e amarela representam as porções hidrofílica e hidrofóbica do surfactante. Nota-se que a geometria cônica do surfactante é a mais apropriada para formar micelas esféricas ou cilíndricas.

As micelas são formadas espontaneamente quando a concentração de surfactante em água é igual ou maior que uma concentração crítica, denominada *concentração micelar crítica* (CMC). Acima e próximo da CMC, as micelas são aproximadamente esféricas e, muito acima dessa concentração, elas tendem a se alongar, tornando-se cilíndricas, cujo comprimento aumenta com a concentração de surfactante até formar a fase hexagonal, que é viscosa e birrefringente à luz polarizada (EVANS & WENNERSTRÖM, 1999; JÖNSSON *et al.*, 1998).

Especial interesse tem sido dedicado ao estudo de *micelas* e *vesículas*, que são as estruturas mais simples formadas por surfactantes em solução (ZANA, 2002; ALARGOVA *et al.*, 1998).

Vesículas

As *vesículas* consistem de bicamadas fechadas de surfactantes, de modo a reter uma porção do solvente no interior, onde podem ser solubilizadas moléculas de pequeno e médio porte. O tamanho e a geometria das vesículas variam, mas, em geral, vesículas pequenas tendem a ser esféricas, e as grandes facetadas. Os surfactantes que formam vesículas têm geometria aproximadamente cilíndrica regular ou cone truncado, e as vesículas podem ser uni ou multilamelares (FEITOSA, JANSSON & LINDMAN, 2005; BENATTI *et al.*, 1999; FEITOSA & BROWN, 1997). A Figura 2 mostra o desenho esquemático de uma típica vesícula unilamelar.

O volume da porção hidrofóbica é significativo e, muitos dos surfactantes que formam vesículas são pouco solúveis em água, possuindo duas caudas, de modo que as vesículas, em geral, não se formam espontaneamente. É, portanto, necessário usar um método que force a solubilização dos surfactantes no solvente aquoso ou polar. Em alguns casos, a solubilização do surfactante no solvente aquoso é facilitada aquecendo a mistura acima da T_m do surfactante. Em muitos casos, as moléculas do surfactante, após aquecidas, associam-se em vesículas multilamelares, a partir das quais pode-se obter vesículas unilamelares sonicando ou extrudando a dispersão de vesículas multilamelares (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000; LASIC, 1988).

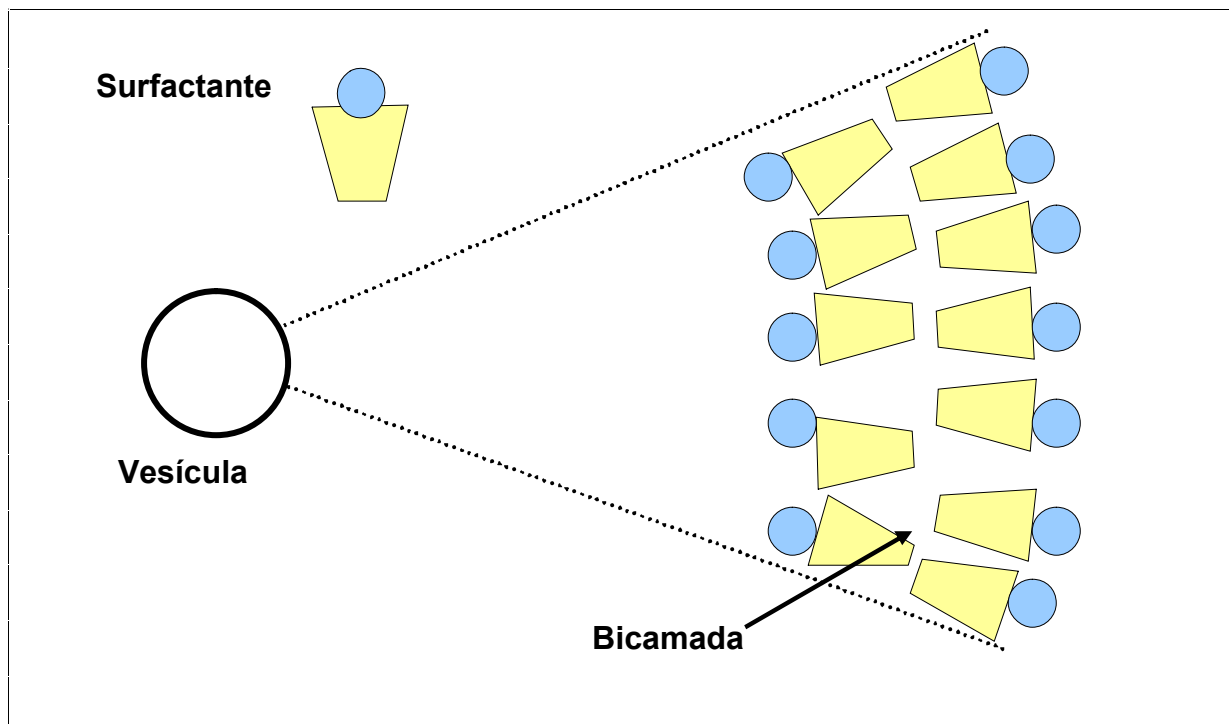


Figura 2 – Esquema da estrutura de um típico surfactante e uma vesícula em corte formada desse surfactante em solução aquosa. As cores azul e amarela representam as porções hidrofílica e hidrofóbica do surfactante. Nota-se que a geometria cônica truncada do surfactante é a mais apropriada para formar vesículas.

A concentração de surfactante é um dos fatores que determinam o tipo de vesícula formada, pois com o aumento da concentração de surfactante, aumenta o número de vesículas na solução e a formação de vesículas no interior de vesículas já existentes, conforme representadas esquematicamente nas Figura 3 . A interação entre as vesículas multilamelares é facilitada pela grande dimensão das vesículas quando comparadas ao tamanho das micelas (MARQUES *et al.*, 1999,1998).

As Figuras 3 e 4 mostram esquematicamente três níveis de concentração de surfactante em solução, formando vesículas unilamelares e multilamelares, respectivamente para pequenas e grandes concentrações. Em concentrações intermediárias encontram-se misturas de vesículas uni e multilamelares. Esse é um típico comportamento de surfactantes formadores de vesículas em solução (BENATTI *et al.*, 1999; FENDLER, 1982).

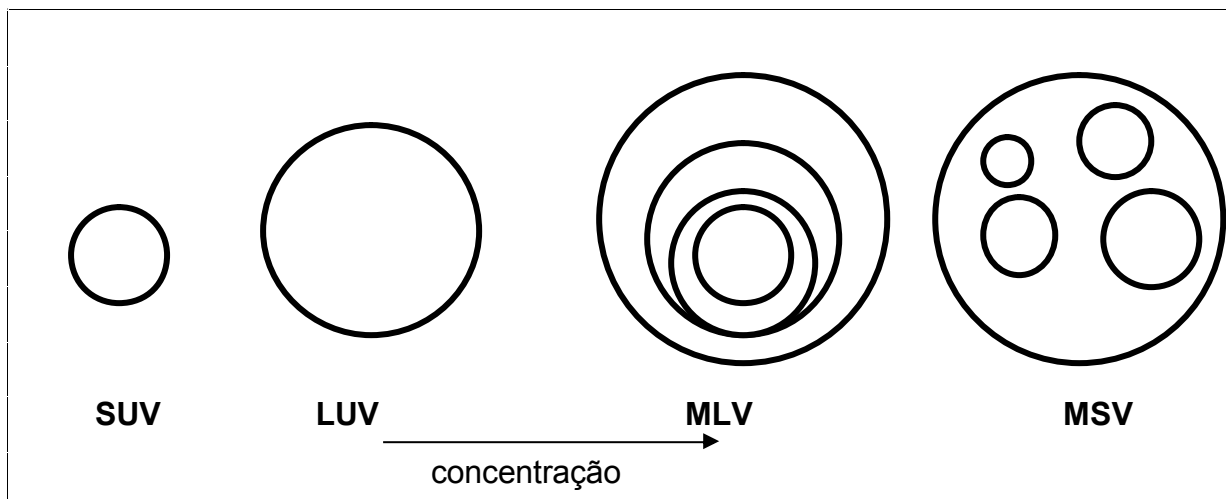


Figura 3 - Tipos de vesículas: Vesículas unilamelares pequenas (SUV), Vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas multilamelares (MLV) e vesículas multiestruturais (MSV).

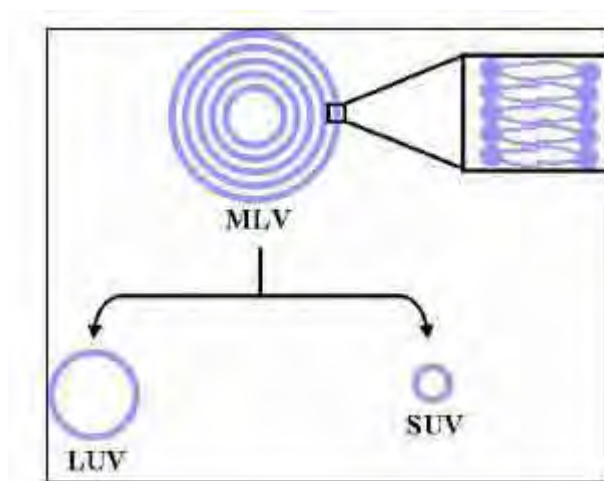


Figura 4 - Classificação de vesículas em função de seu tamanho: Vesículas unilamelares pequenas (SUV), Vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas multilamelares (MLV).

(www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-061305-124641//2INTRODUCC.pdf)

Vesículas de DODAB e DDAB em solução aquosa

O objetivo geral da pesquisa do nosso grupo tem sido o de investigar as propriedades de sistemas contendo vesículas, em especial vesículas catiônicas, visando principalmente a sua estabilidade em diferentes ambientes. Muitos desses

ambientes são hostis para a estabilidade das vesículas, apesar de benéficos para outras macromoléculas. Por exemplo, a solução fisiológica, necessária para o funcionamento de muitas moléculas biológicas, é muitas vezes, agressiva para vesículas lipídicas, a estabilização destas vesículas requer, geralmente, o uso de aditivos (co-solutos, co-surfactantes etc.) e para esse fim, temos usado vesículas de DODAB puro ou misturado com outros surfactantes.

Neste trabalho, investigamos o efeito de PEG (co-soluto) com diferentes massas molares, na estabilidade de vesículas catiônicas de DDAB e DODAB, surfactantes homólogos que diferem apenas no comprimento das caudas. Eles têm 12 e 18 átomos de carbono em cada cauda, respectivamente, resultando na maior hidrofobicidade de DODAB. Em água, esses dois surfactantes formam, em pequenas concentrações, vesículas unilamelares. O limite de concentração desses surfactantes para a formação de vesículas unilamelares ainda não é bem conhecido, provavelmente devido a polidispersidade dessas vesículas, que dificulta a pesquisa nesse campo.

No entanto, é sabido que, aumentando a concentração desses surfactantes, formam-se vesículas multilamelares (MARQUES *et al.*, 1999, 1998). Além disso, não existe estudo comparativo e detalhado do tamanho dessas vesículas e de outras propriedades, como a temperatura de transição do estado gel para o líquido cristalino (T_m). Na fase vesicular, a T_m de DDAB e DODAB é 16 e 45°C, respectivamente, significando que à temperatura ambiente (25°C) DDAB está estado líquido-cristalino e DODAB no estado gel, o que torna difícil uma comparação direta das propriedades das vesículas desses surfactantes em diferentes estados a uma dada temperatura. É importante, porém, lembrar que esses surfactantes são hidrossolúveis apenas acima de sua respectiva T_m , o que implica que as vesículas desses surfactantes são preparadas apenas acima da T_m . Apesar disso, não existe uma clara relação entre a T_m e a solubilidade desses surfactantes em particular. Assim, as vesículas de DDAB costumam ser preparadas à temperatura ambiente, ~25°C, enquanto que as de DODAB a ~60°C. Não existe um estudo conclusivo sobre o efeito da temperatura de preparação dessas vesículas nas suas propriedades, principalmente no tamanho e estabilidade. Existem, no entanto, estudos sobre o efeito do método de preparação das vesículas nas suas propriedades (FEITOSA, KARLSSON & EDWARDS, 2005; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000); o que também dificulta um estudo comparativo destas

propriedades uma vez que, cada grupo de pesquisa adota um determinado método de preparação.

Como DODAB é menos solúvel em água do que DDAB, a preparação de vesículas de DODAB requer métodos especiais, como sonicação, extrusão, injeção etc, já DDAB forma vesículas por diluição simples do surfactante, apesar de alguns pesquisadores ainda utilizarem a sonicação para preparar as vesículas de DDAB, provavelmente com o intuito, nem sempre alcançado, de formar vesículas menores e mais homogêneas. O nosso grupo foi um dos primeiros a reportar a formação espontânea de vesículas de DODAB por diluição do surfactante a 60°C (acima da T_m de DODAB) e utilizar esse método com regularidade (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000).

As propriedades termotrópicas dessas vesículas foram comparadas às propriedades das vesículas desse surfactante após sonicação e extrusão das dispersões preparadas, espontaneamente (BENATTI *et al.*, 2001; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). Nesses trabalhos, Feitosa e cols reportaram que a T_m aumenta com o tamanho das vesículas e que a sonicação aumenta a T_m , indicando que o processo de sonicação não apenas aumenta a curvatura das vesículas, mas as destrói, rompendo-as e formando fragmentos de bicamada (com raio infinito, ou curvatura zero), aumentando desse modo a T_m . É importante também notar que as vesículas de DODAB são estáveis tanto no estado líquido-cristalino (estado mais flexível das caudas do surfactante) como no estado gel (cadeia do surfactante em estado mais rígido e estendido (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). No entanto, nesta tese, verificamos que as vesículas de DDAB não são estáveis a 5°C, enquanto que, nessa temperatura, as vesículas de DODAB (1 mM) permanecem estáveis por meses, enquanto que as vesículas de DDAB não resistem 12 h, e formam cristais hidratados. É possível que esta cristalização esteja relacionada à temperatura de Kraft (ponto de Kraft é a temperatura na qual a solubilidade do soluto em um solvente formando uma solução é igual à concentração vesicular crítica, CVC.) do DDAB. Esse assunto ainda tem sido pouco explorado na literatura.

Assim, complementando o trabalho do nosso grupo, sobre o efeito de co-surfactantes nas propriedades termotrópicas de DODAB, investigamos o efeito de PEG nas propriedades dessas vesículas e comparamos, sempre que possível, às propriedades das vesículas de DDAB. Esse estudo, inicialmente, foi feito no regime

diluído, onde há predominância de vesículas unilamelares, e, posteriormente, para concentrações mais elevadas, até 1% p/p de surfactante, na qual predominam vesículas e estruturas multilamelares.

Vesículas de DODAB

Surfactantes que formam bicamada em geral possuem extremidade polar com pequena área e grande região de hidrocarbonetos. Assim, surfactantes catiônicos com duas cadeias alquílicas longas e um grupo iônico pequeno (extremidade polar) tendem a formar vesículas ou lipossomos (vesículas multilamelares) em solução aquosa (KANO *et al.*, 1979).

DODAB é um surfactante catiônico dialquilado, que, em solução aquosa, e acima da T_m 45 °C, forma estruturas lamelares em uma extensa faixa de concentração; sua organização molecular depende da concentração do surfactante, da temperatura e do solvente, sendo insolúvel em água a temperatura ambiente. Para obtenção de vesículas, requer, pois, métodos especiais de preparação, tais como: sonicação, extrusão, e dissolução em solvente orgânico apropriado (clorofórmio, diclorometano ou etanol). Em todos esses métodos os surfactantes são forçados à solubilização no solvente aquoso, resultando em estruturas que diferem de um método para outro (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 1998; KUNITAKE & OKAHATA, 1977).

Dispersões aquosas de DODAB preparadas sem sonicação ou extrusão exibem uma rica variedade de estruturas de bicamadas, como vesículas unilamelares pequenas (até 90 nm de diâmetro), grandes (cerca de 500 nm de diâmetro) e gigantes (até 12.500 nm de dimensão), assim como, bicamadas abertas e estendidas, vesículas multilamelares e vesículas multiestruturais, com o interior da bicamada contendo estruturas vesiculares concêntricas ou não, além de estruturas aglutinadas, consistindo de bicamada densamente empacotada e envolvida por uma estrutura unilamelar gigante. Quando submetidas à extrusão ou sonicação, as estruturas grandes e gigantes são rompidas formando vesículas pequenas e achatadas (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). A Figura 4 mostra um desenho esquemático de quatro tipos de estruturas de vesículas.

Vesículas de DDAB

Alguns aspectos interessantes do comportamento de fase de DDAB em água são evidenciados no diagrama ternário de fases (Figura 26). Em água e a 25°C DDAB se auto-agrega em duas fases lamelares, uma menos compacta, em concentração entre 3 e 30 % p/p e a outra, mais compacta entre 83 e 91 % p/p e entre essas duas faixas de concentração. As duas fases coexistem em equilíbrio, sem separação macroscópica das fases (MARQUES *et al.*, 1999,1998). Há também formação de uma pequena região isotrópica em baixas concentrações (<0,15% p/p), região isotrópica e lamelar (diluída) em concentrações que variam entre 0,15 e 1,5 % p/p e região lamelar (diluída) no intervalo de 1,5 a 3 % p/p.

A região vesicular de DDAB/água obedece também o esquema mostrado nas Figuras 3, ou seja, com o aumento da concentração de DDAB, ocorre transição de estrutura unilamelar para multilamelar (MARQUES *et al.*, 1999). As vesículas de DDAB em água são geralmente formadas em excesso de água (por exemplo, 1-5 mM de DDAB) a temperatura ambiente, ou seja, acima da T_m de DDAB, que é de ~16°C. Essas vesículas são estáveis por meses ou anos.

Temperatura de Transição de DODAB e DDAB (T_m)

A preparação de vesículas de DDAB e DODAB requer, portanto, o conhecimento da T_m e da concentração desses surfactantes no correspondente solvente. Em água, a T_m 16 e 45 °C, respectivamente e abaixo da T_m esses surfactantes são muito pouco solúveis em água, fazendo com que as vesículas sejam preparadas acima da T_m . Na Figura 5 é apresentada a dependência da T_m com o comprimento das caudas de surfactantes homólogos a DODAB ou DDAB. Em geral, a T_m depende da presença de co-solutos, co-surfactante, da concentração de DODAB e do método de preparação das vesículas (FEITOSA, KARLSSON & EDWARDS, 2006; FEITOSA & KARLSSON, 2006; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). Abaixo da T_m as caudas dos surfactantes em solução estão no estado gel (rígido e ordenado), e acima da T_m elas estão no estado líquido-cristalino (fluido). A T_m é a temperatura na qual esta transição de estado gel-líquido cristalina das cadeias das moléculas surfactantes acontece. A rigor, a transição ocorre em

uma faixa de temperatura, e a T_m corresponde à temperatura intermediária dessa transição (Figura 6) (FEITOSA, JANSSON & LINDMAN, 2005; SOLTERO *et al.*, 2000).

Para uma série de surfactantes homólogos, a T_m aumenta com o número de carbonos nas caudas, como mostra a Figura 5 para surfactantes dialquilados derivados da amônia quaternária, e varia também com o tipo e dimensão da estrutura formada (FEITOSA, JANSSON & LINDMAN, 2005; FEITOSA & BARRELEIRO, 2004; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000; JÖNSSON *et al.*, 1998; JUNGGERMANN, 1970).

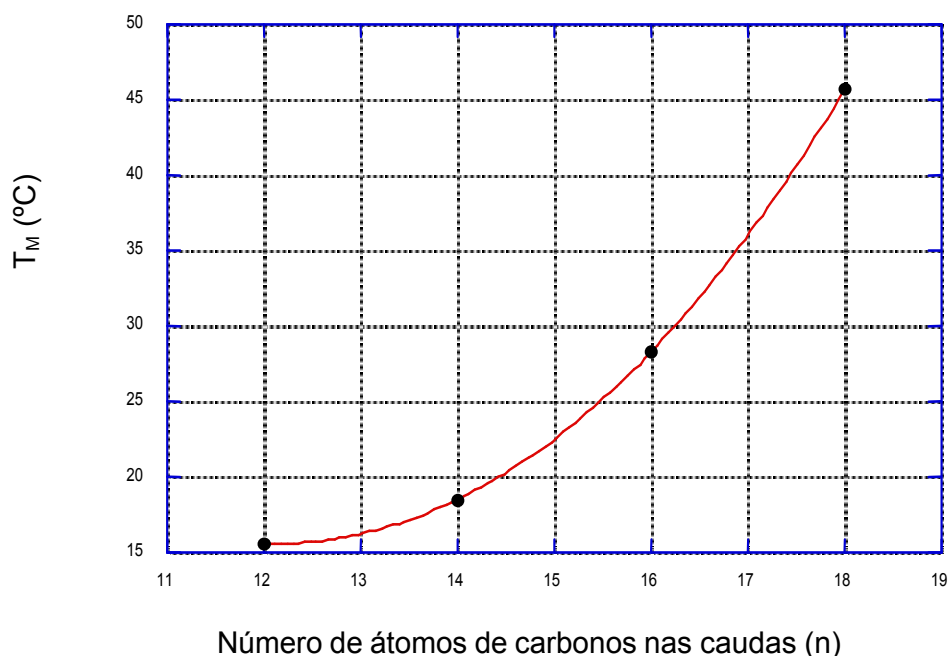


Figura 5 – Temperatura de transição gel-líquido cristalino (T_m), obtida por calorimetria diferencial de varredura, em função do número de átomos de carbono (n) nas caudas de surfactantes dialquilados derivados da amônia quaternária (FEITOSA, JANSSON & LINDMAN, 2005).

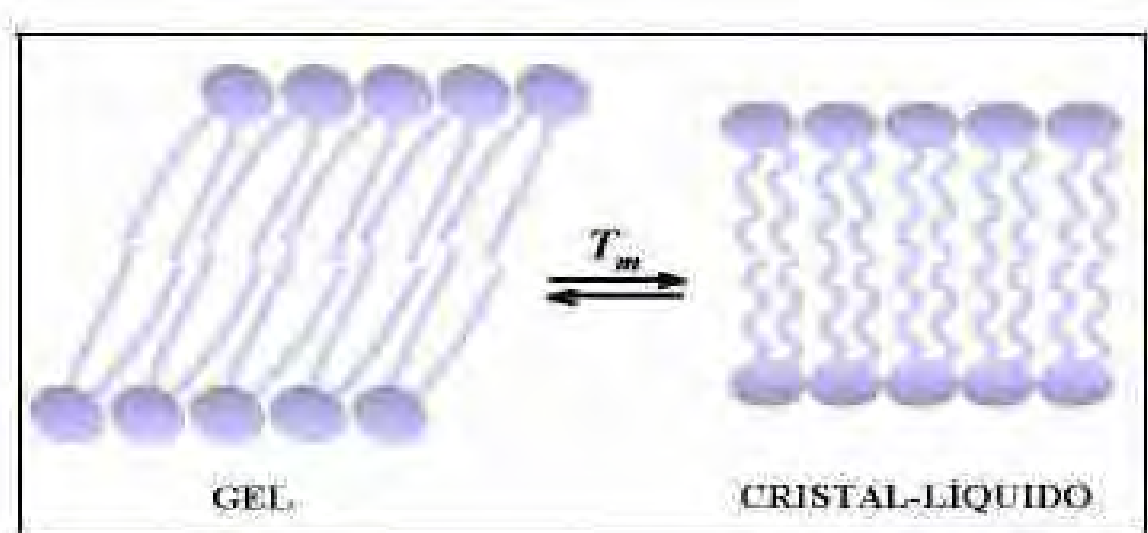


Figura 6 - Transição de estado em uma bicamada entre a fase gel e líquido-cristalina.

(www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-061305-124641//2INTRODUCC.pdf)

Efeito histerese

Quando a temperatura de uma dispersão de vesículas aproxima-se da T_m , núcleos de domínios líquido-cristalino começam a se formar na fase predominante (gel). Conforme a temperatura é aumentada, esses núcleos se expandem, até que toda a bicamada encontra-se no estado líquido-cristalino. A expansão dos núcleos se dá por meio de um efeito cooperativo, que se inicia pela rotação das cadeias carbônicas quando no estado líquido-cristalino. O modelo para a formação dos núcleos iniciais não é bem definido, porém sabe-se que é necessário um certo número de moléculas para iniciar o processo de nucleação (TSONG, 1974).

O efeito histerese na transição de fase gel líquido-cristalina de DODAB em dispersões vesiculares foi reportado na literatura (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000) e foi verificada histerese de cerca de 7°C para dispersão de DODAB, porém quando se aumenta o tempo de equilíbrio, a 60°C, após uma medida "up-scan" (aquecimento), antes do down-scan (resfriamento) a ser realizado, o valor da T_m obtido não varia com o processo endo e exotérmico (para um tempo de espera de 4 horas). Termogramas de DSC para dispersões não sonicadas de DODAB revelaram dois picos de transição (pré e principal) no primeiro "upscan", já no segundo apenas um pico foi observado (principal). Para dispersões sonicadas houve a presença de um terceiro pico, que não permaneceu bem definido no segundo "upscan" (BENATTI *et al.*, 1999).

.Aplicações de surfactantes

São inúmeras as aplicações de surfactantes em diferentes segmentos da ciência e tecnologia, em particular, os agregados de surfactantes catiônicos (micelas e vesículas) têm sido especialmente aplicados no transporte de fármacos para células do organismo e, os surfactantes derivados quaternários de amônio, empregados como bactericida (CARMONA-RIBEIRO, 2000; JÖNSSON *et al.*, 1998; MARTINS, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1997; JUNGERMANN, 1970).

Vesículas catiônicas são excelentes hospedeiros de pequenas moléculas e servem como veículo de transporte dessas moléculas para a membrana celular, que normalmente, por ser aniônica, repele a molécula hospedeira, também aniônica. O sucesso da aplicação de micelas e vesículas em áreas médicas e biológicas depende do conhecimento detalhado de suas propriedades físico-químicas, assim como do controle dessas propriedades (CARVALHO & CARMONA-RIBEIRO, 1998; CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1993; JUNGERMANN, 1970).

A estrutura dos agregados de surfactantes depende da concentração de surfactantes na amostra, da temperatura, da força iônica e do pH. Suas propriedades físico-químicas como grau de ionização (de surfactantes iônicos), número de agregação, temperatura de turvação (de surfactantes não-íonicos), entre outras são influenciadas pela geometria dos agregados. O conhecimento dessas e outras propriedades é de fundamental importância nas várias áreas de aplicação de surfactantes (FENDLER, 1980; JUNGERMANN, 1970).

Em 1997 Carmona-Ribeiro e cols. reportaram a ação antimicrobiana das vesículas catiônicas de DODAB, em baixas concentrações (5 μM). Para tanto, altas concentrações de microrganismos (10^7 bactérias/mL) foram submetidas às vesículas de DODAB por 5 horas, resultando em 0% de espécies sobreviventes (*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Esses autores também reportaram que as dispersões sonicadas de DODAB são mais eficientes na atividade bactericida do que as preparadas por outros métodos (CAMPANHA, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1999; MARTINS, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1997; CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1993).

Polímeros em solução

Polímeros são macromoléculas, naturais ou sintéticas, importantes em inúmeros campos de pesquisa científica e tecnológica. Os polímeros consistem de dois (dímeros) ou mais tipos monômeros na cadeia (unidade repetitiva), ligados covalentemente, em cadeia linear ou ramificada. O número n de unidades repetitivas denomina-se *grau de polimerização*. A diferença fundamental entre os monômeros de polímeros e de surfactantes é que nestes últimos, os monômeros nos agregados (p. ex, micelas ou vesículas) estão unidos por interações físicas e não químicas. Quando os monômeros são idênticos, como no PEG, o polímero é denominado *homopolímero*, enquanto que *copolímero* é caracterizado por ter mais de um tipo de unidade química repetida em seqüência irregular (HIEMENS, 1984)

Devido à polimolecularidade, a massa molecular dos polímeros varia conforme o método utilizado na obtenção. Os tipos de cálculos para determinar a massa molecular baseiam-se no número e na massa molecular dos monômeros: massa molecular numérica média (\bar{M}_n) e massa molecular ponderal média (\bar{M}_w). Assim, n é a razão entre a massa molecular do polímero (\bar{M}_n) e a massa molecular do monômero (M_1), portanto $n = \bar{M}_n / M_1$. Na prática, os polímeros de uma dada amostra não possuem uma única massa molecular, mas sim uma distribuição de massas moleculares, e a massa molecular média do polímero pode ser ponderada pela massa ou pelo grau de polimerização n . Assim, a massa molecular ponderal média (\bar{M}_w) depende do número e da massa molecular dos monômeros, e é obtida através da expressão:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i} \quad (1)$$

A massa molecular numérica média (\bar{M}_n) depende apenas do número de moléculas, e é dado por:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} \quad (2)$$

onde M_i é a massa molecular da i -ésima molécula e n_i é o número de moléculas com massa M_i .

A relação entre $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ é denominada *polidispersão*, e será tanto maior quanto mais heterogêneas forem as massas moleculares. Quando os produtos são de composição uniforme, o material é dito *monodisperso*; por exemplo, polímeros naturais, como proteínas e ácidos nucleicos. Quando há variação nas massas moleculares, é dito *polidisperso*, e esse é o caso mais comum nos polímeros sintéticos. A polidispersão nos polímeros comuns é, em geral, próxima de dois, mas pode atingir valores bem mais altos. Nos polímeros monodispersos a polidispersão é igual à unidade. A massa molecular numérica média é geralmente obtida através de experimentos de crioscopia, destilação isotérmica, osmometria ou determinação dos grupos terminais. \overline{M}_w é normalmente obtido por experimentos de espalhamento estático de luz (SLADE, 1975).

As propriedades dos polímeros dependem principalmente de três fatores: (a) da natureza química dos monômeros, (b) da massa molecular e conformação dos monômeros, e (c) da técnica usada na síntese do polímero, que influenciam a estrutura molecular (constituição e configuração) do polímero (MANO & MENDES, 2004).

Poli(etileno glicol) (PEG)

PEG ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$) é um homopolímero neutro, cujo grau de polimerização n varia de algumas unidades até milhares de unidades monoméricas. A característica inerte do PEG se deve ao fato de ser completamente neutro, ter alto momento de dipolo e ser fortemente solvatado em água (MARTINS & CARDOSO, 2005).

Estudos demonstraram “*in vitro*” e “*in vivo*” que o PEG reduz o risco de formação de trombose, pois, suprime a adsorção da proteína plasmática e a adesão plaquetária (BRADLEY, DEVINE & ANSEL, 1998). O PEG tem muitas propriedades que o tornam excelente candidato a biomaterial, por ser solúvel em água e em muitos solventes orgânicos (por exemplo: tolueno, cloreto de metileno, etanol e acetona), é atóxico e tem rápida absorção. Além da sua característica de hidrogel, como retentor de alto conteúdo de água, biocompatibilidade e estado elástico, têm

sido aprovado para muitas aplicações médicas, sendo que uma das mais importantes propriedades do PEG é impedir o seu reconhecimento pelo sistema imunológico (KEYS, ANDREOPOULOS & PEPPAS, 1998).

Como resultado bem sucedido, as formulações com lipídios e lipopolímeros têm sido desenvolvidas para transportar fármacos e a quantidade de PEG nestas formulações deve ser otimizada, pois PEG em baixas concentrações oferece baixo efeito protetor da bicamada lipídica, enquanto que em altas concentrações pode levar a desestabilização do sistema.

As vesículas e lipossomos são geralmente sensíveis a mudanças ambientais, que é uma propriedade desejável para explorar as muitas aplicações biológicas e farmacêuticas (ROVIRA, THOMPSON & SZLEIFER, 2002), mas muito indesejável também, pois em algumas variações do ambiente essas estruturas necessitam permanecer estáveis. O PEG é capaz de estabilizar ou desestabilizar vesículas, dependendo da sua concentração relativa e da temperatura (CARIA, REGEV & KHAN, 1998)

Dados experimentais e teóricos descrevem que a quantidade de polímero necessária para desestabilizar uma bicamada planar está relacionada à massa molar do polímero, e medidas de potencial e pressão de superfície demonstraram que PEG interage com as interfaces ar-água e lipídio-água e na ausência de lipídios, o PEG forma monocamada relativamente estável na interface ar-água, exceto para massa molares muito baixas (<1000 Da) (ROVIRA, THOMPSON & SZLEIFER, 2002; LIN & FU-CHANG, 1996; WINTERHALTER *et al.*, 1995).

O sistema por nós estudado envolve a interação, em solução aquosa, entre PEG e bicamadas ou vesículas de DDAB e DODAB a nomenclatura PEG

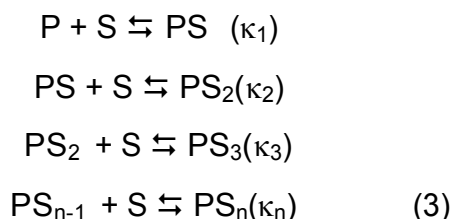
($-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-]}_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) normalmente se refere aos polímeros de massa molecular abaixo de 20 kDa, acima desse valor a nomenclatura PEO ($-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-]}_n\text{-}$), poli(óxido de etileno) também referido como poli(oxietileno), é utilizada) Com o objetivo de padronizar a linguagem, utilizamos nesta tese a sigla PEG para todos os polímeros independentemente da massa molecular (MANO, DIAS & OLIVEIRA, 2004; ISRAELACHVILI, 1997)

Interação polímero-surfactante

A mistura de polímero com surfactante, constitui uma importante área de pesquisa, cujo produto final, os complexos polímero-surfactante, têm propriedades distintas das propriedades dos componentes individuais e, portanto, com diferente potencial de aplicação da mistura em relação aos sistemas macromoleculares simples, como por exemplo uma solução de micelas ou de polímero puro (GODDARD & ANANTHAPADMANABHAN, 1993).

O mecanismo básico da interação de surfactante-polímero é razoavelmente conhecido e as mudanças nas propriedades físico-químicas do sistema surfactante-polímero, como por exemplo a CMC e o número de agregação do surfactante, a viscosidade da solução do polímero e a T_m , são indicativos da interação e formação de complexos. Esta interação pode ocorrer entre a molécula do surfactante, ou de agregados micelares, ou vesiculares com a cadeia do polímero. As forças que controlam estas interações são, basicamente, as forças de van der Waals, o efeito hidrofóbico, e as interações ácido-base, dipolar e eletrostática (JÖNSSON *et al.*, 1998; GODDARD & ANANTHAPADMANABHAN, 1993; FENDLER, 1980).

O modelo mais aceito para a interação polímero-surfactante é baseado na seqüência de etapas da ligação entre o monômero do surfactante (S) e a cadeia do polímero (P), com cada etapa regida pela Lei da Ação das massas, com a constante de ligação (κ_i) controlando cada passo:



Os valores das várias constantes de interação e sua dependência com as condições experimentais (temperatura, força iônica e pH) servem de base para a descrição do processo molecular envolvido na interação (MYERS, 1999).

Baseado na natureza polar dos monômeros, os polímeros e os surfactantes são classificados como: aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros ou zwitteriônicos e cada tipo de polímero pode apresentar características diferentes de interação com

cada classe de surfactantes, o que resulta em um vasto campo de investigação (JÖNSSON *et al.*, 1998; FENDLER, 1980).

As interações normalmente são muito fortes entre surfactantes e polímeros com cargas opostas, fortes ou fracas quando um deles é neutro e o outro carregado, e muito fracas ou inexistentes quando os dois são neutros. Em geral, a interação de surfactantes aniônicos é mais forte com polímeros neutros do que com os surfactantes catiônicos (mantendo constantes o tamanho e o número de caudas) (GODDARD & ANANTHAPADMANABHAN, 1993).

Os métodos experimentais utilizados para a investigação da interação polímero-surfactante são normalmente os mesmos empregados no estudo das espécies (polímeros e surfactantes) individuais em solução, que podem ser divididos em duas categorias: aqueles que medem as propriedades de transporte ou de não equilíbrio do sistema (viscosidade, condutividade, espalhamento de luz, fluorescência resolvida no tempo e tensão superficial etc.) e os que detectam mudanças do sistema em níveis moleculares e no equilíbrio (ressonância magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$), ressonância paramagnética eletrônica (EPR) dicroísmo circular, fluorescência de estado estacionário etc.). Embora seja difícil comparar resultados experimentais provenientes de diferentes técnicas, as manifestações físicas da interação ocorrem de maneira evidente e a combinação de técnicas e métodos diferentes é muito importante no entendimento da interação polímero-surfactante (MYERS, 1999).

Diagrama Ternário de Fases

O fenômeno de separação de fases é comum nas soluções de polímeros e surfactantes, assim como em misturas de ambos e a observação do comportamento de fases desses sistemas pode ser a indicação preliminar do número e do tipo de fases presentes no sistema investigado.

A inspeção da amostra através de polarizadores cruzados permite observar a ocorrência de birrefringência (que é a propriedade das substâncias exibirem diferentes índices de refração em diferentes direções). Tal comportamento pode ser observado nas fases anisotrópicas líquido-cristalinas (fases hexagonal, lamelar e líquido-cristalina) e em alguns cristais. Fases que têm aparência opaca são

opticamente isotrópicas ou não–birrefringentes (fases micelar e cúbica). A intensidade da birefringência pode ser observada quando a amostra está em repouso (birrefringencia estática) ou submetida a um cisalhamento (birrefringência por fluxo).

Para um estudo mais detalhado das fases há a necessidade de empregar outras técnicas como microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) ou ^1H NMR (MARQUES *et al.*, 1999,1998,1993; PICULELL, LINDMAN & KARLSTRÖM, 1998; LINDMAN *et al.*, 1998).

Birrefringência

A luz é uma onda eletromagnética que se move a uma certa velocidade através de um meio. A velocidade da luz no vácuo é diferente e quando passa por outro meio. A razão entre velocidade da luz no vácuo (c_0) e a velocidade da luz em um certo meio (c) é chamada de índice de refração (n):

$$n = \frac{c_0}{c} \quad (4)$$

A velocidade da luz no vácuo é maior do que a velocidade em outro meio, então (n) normalmente é maior do que 1.

No meio isotrópico opticamente, a velocidade da luz é a mesma em todas as direções (x , y e z), então os resultados dos índices de refração são semelhantes ($n_x = n_y = n_z$). Por outro lado, no meio anisotrópico, a luz reage com diferentes morfologias e como resultado a velocidade é diferente para cada direção e índices de refração não são os mesmos. A direção da luz pode ser perpendicular ou paralela ao eixo óptico. Portanto, dois índices de refração podem ser calculados:

$$c_{||} = c_0/n_{||} \quad \text{e} \quad c_{\perp} = c_0/n_{\perp} \quad (5)$$

A diferença entre os índices de refração (paralelo e perpendicular) é chamado de birrefringência do meio (Δn) e é dada por:

$$\Delta_n = n_{||} - n \quad (6)$$

Para sistemas coloidais a relação é representada por:

$$\Delta_n = \Delta n_s \cdot \zeta \quad (7)$$

onde ζ é a função/orientação, dado pela reação:

$$\Omega = \left[\frac{3}{2} \cdot \cos^2(\Theta) - \frac{1}{2} \right] \quad (8)$$

onde Θ é o ângulo entre o centro da partícula e a direção de orientação. E Δn_s pode ser calculado para a solução de surfactante com a equação:

$$n_s = \Delta n_e - \Delta n_f \quad (9)$$

onde Δn_e é a birrefringência da molécula quando monômero e Δn_f é a birrefringência da molécula agregada.

Se a solução com agregados lamelares for visualizada através de polarímetro de luz cruzada, isto mostra birrefringência. A luz não polarizada (luz em todas as direções) pode ser filtrada por um polarizador e passar por uma única direção. Esta luz polarizada pode ser classificada com dois vetores que são perpendiculares com ângulo de 90°. Estes dois componentes interagem com a solução anisotrópica e pode resultar em dois diferentes índices de refração. Portanto, um tipo de mudança de fase é esperado (δ). O grau da mudança de fase depende da espessura do meio anisotrópico (l) a propriedade óptica do meio e o comprimento de onda da luz incidente (λ) são descritos conforme a equação:

$$\delta = 2\pi/\lambda \cdot \Delta n \cdot l \quad (10)$$

A luz polarizada linear torna-se elíptica depois da mudança e então passa pelo segundo polarizador e a solução exibe birrefringência (MISHIMA, SATOH & SUZUKI, 1996).

Objetivos da tese

O objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito de PEG (co-soluto), com diferentes massas moleculares (200Da,12kDa,35kDa,100kDa e 2MDa) na formação de vesículas estáveis de DODAB e DDAB em água, cujas propriedades físico-químicas foram estudadas por técnicas espectroscópicas e calorimétricas, além de investigar a atividade bactericida em microrganismos de referência, de vesículas de DODAB (sonicadas e não sonicadas), na ausência e presença de PEG_{200Da} e PEG_{2MDa}, utilizando a técnica dos cilindros carreadores.

MATERIAIS E MÉTODOS

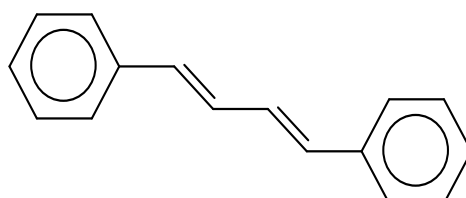
Métodos

Investigamos as propriedades: (1) espectrofluorimétricas da sonda trans,trans,1,4-difenil-1,3butadieno (DPB) em soluções aquosas de DODAB, (2) espectrofotométricas e (3) calorimétricas de vesículas catiônicas de DODAB, preparadas espontaneamente, na ausência e presença de PEG_{12k} e PEG_{35k}. (4) Também estudamos a estabilidade de dispersões aquosas espontâneas de DODAB 1,0 mM e 0,5 mM sonicadas e não-sonicadas, por medida de turbidez em função do tempo. (5). Construimos os diagramas de fases ternários das vesículas catiônicas de DODAB e DDAB em solução aquosa, na ausência e presença de PEG com massas molares de 200 Da, 12 kDa, 35 kDa, 100 kDa e 2 MDa.

Materiais

Poli(etileno glicol), HO(CH₂CH₂O)_nH (PEG), com massas moleculares de 200 Da, 12 kDa, 35 kDa, 100 kDa e 2 MDa foram adquiridos comercialmente, (Fluka/Sigma) e utilizados sem purificação prévia. Para titulação das vesículas com solução de PEG, nos experimentos de turbidez, foi preparada uma solução estoque 20 mM. Utilizamos água ultra-pura tipo Milli-Q na preparação das amostras.

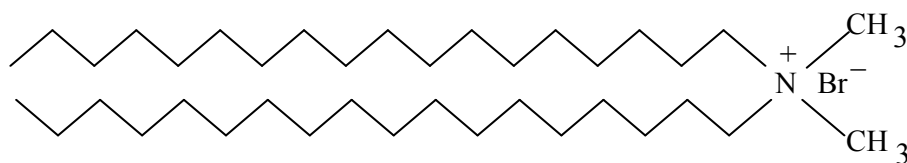
O fluoróforo trans,trans,1,4-difenil-1,3butadieno (DPB), ($C_6H_5CH = CHCH = CHC_6H_5$) (Massa Molecular = 206,28 g/mol) (Merk) foi diluído em ciclohexano (Merk) antes de ser misturado às vesículas. A Figura 7 mostra a estrutura molecular do DPB.



DPB

Figura 7 – Estrutura molecular da sonda fluorescente trans,trans,1,4-difenil-1,3butadieno (DPB).

Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) (Sigma) e brometo de didodecildimetilamônio (DDAB) (Aldrich), foram utilizados conforme adquiridos do fabricante. A fórmula molecular de DODAB, ($M = 631$ g/mol) com 18 carbonos na cauda, é mostrada na Figura 8. O homólogo DDAB (Massa Molecular = 462,65 g/mol) contém apenas 12 carbonos.



DODAB

Figura 8 – Estrutura molecular do brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).

Preparação das amostras

Preparação das vesículas

A preparação das vesículas e seu armazenamento à temperatura ambiente foram padronizados para todos os experimentos, realizados sempre 24 horas após a preparação das vesículas, que foram formadas sempre acima da temperatura de transição gel-líquido cristalina (T_m) desses surfactantes em água: $T_m \approx 16$ e 45°C , respectivamente para DDAB e DODAB.

As dispersões espontâneas (ou não sonicadas) de DODAB ou DDAB foram preparadas por dissolução simples das amostras à temperatura de alguns graus acima da T_m do respectivo surfactante em água. Como a T_m de DDAB está abaixo da temperatura ambiente, as dispersões de DDAB foram preparadas à temperatura ambiente (KONDO *et al.*, 1993). Já as dispersões de DODAB exigiram aquecimento, pois a T_m está acima da temperatura ambiente. Nesse caso, uma mistura 5 mM (solução estoque) de DODAB/água foi aquecida até 60°C , homogeneizada e, então, resfriada à temperatura ambiente, sendo observado que após resfriada, a amostra permaneceu estável (sem precipitação) por meses.

Apesar das vesículas de DODAB e DDAB em água poderem ser preparadas espontaneamente, muitos pesquisadores preferem utilizar o método de sonicação, pois acreditam que formam vesículas menores. Assim, para fins de comparação, em algumas situações trabalhamos com vesículas de DODAB sonicadas. As amostras sonicadas de DODAB foram preparadas a partir das dispersões não sonicadas, que depois de preparadas e vedadas em frascos de vidro, foram expostas a ondas de ultra-som, num sonicador tipo banho (Branson, modelo 1210), a 60°C , até obter uma solução mais clara e transparente, em relação à não sonicada, e então resfriadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente, as quais ficam estáveis por muito tempo (BRITO & MARQUES, 2005; FEITOSA, KARLSSON & EDWARDS, 2005; FEITOSA & KARLSSON, 2005; BENATTI *et al.*, 2001; FEITOSA; BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). Para o preparo das dispersões, foi utilizada balança analítica de precisão de 0,1 mg para pesagem da massa do surfactante (ou alíquotas da solução estoque) e do polímero a serem solubilizadas em água, de forma a obter a concentração desejada.

Preparação das vesículas com sonda

As sondas DPB foram diluídas em ciclohexano (Merck) e incorporadas no interior das vesículas. Devido à natureza hidrofóbica dessa sonda, ela muito provavelmente se incorpora na região da bicamada das vesículas. Para tanto, foram adicionados 500 μL de solução orgânica da sonda de concentração de 4.4 μM em 2 mL da solução aquosa das vesículas de DODAB 0,5 mM, que ficou sob agitação durante 12 horas a fim de incorporar a sonda e evaporar o solvente orgânico, sob atmosfera de nitrogênio para não oxidar a sonda (BARRELEIRO *et al*, 2002; BENATTI *et al*, 1999).

Preparação das soluções do Polímero

Para os experimentos de espectrofluorimetria, turbidez e calorimetria foram preparadas soluções estoque de PEG_{12k} e PEG_{35k} dissolvendo 24% p/p e 70% p/p respectivamente, para obter soluções de concentração de 20 mM.

Preparação das misturas de PEG/DODAB/água

Partindo de soluções aquosas de DODAB 1,0 mM e de PEG 20 mM (PEG_{12k} e PEG_{35k}) foram preparadas soluções de trabalho nas razões molares desejadas de $R = \text{PEG/DODAB} = 0,5; 1; 2; 5; 6; 8; 12$ e 17, onde $R = 0$ corresponde a solução de DODAB sem PEG.

Construção dos Diagramas ternários de fases do sistema PEG/surfactante/água.

Em nossos estudos, os diagramas de fases ternários foram construídos para misturas de DODAB ou DDAB com PEG 200 Da, 12k, 35k, 100k e 2M Da e água, para uma concentração máxima de surfactante e polímero de 1% em peso, de modo que as porcentagens máximas de (polímero + surfactante) = 1 % e água = 99 %.

Para construção dos diagramas de fases foram preparadas soluções com composição de água que variaram entre 0,1 e 1 % p/p de (PEG + surfactante), pesando-se a massa correspondente de cada componente (surfactante, PEG e água), nas quantidades desejadas.

Foram preparadas cerca de 65 amostras de cada sistema PEG/DODAB/água para a construção dos diagramas ternários de fases. Para tanto, foram misturadas quantidades adequadas de PEG (200 Da, 12k, 35k 100k e 2M Da), de DODAB e de água suficientes para a obtenção de soluções de composição final entre 0,1 e 1% p/p de (PEG + surfactante). A mistura dos componentes foi feita a 60 °C, conforme descrito anteriormente.

Para o sistema PEG/DDAB/água o procedimento foi o mesmo, porém a mistura se deu à temperatura ambiente.

Todas as amostras foram pesadas e diluídas em tubos de vidro e vedadas com tampas rosqueáveis ou seladas a fogo, e as diferentes fases foram identificadas e

os diagramas ternários construídos. As coordenadas dos pontos de um diagrama de fases são dadas conforme mostrado na Figura 9, lembrando que os vértices do triângulo correspondem a 100% em peso do componente correspondente, e que as (três) bases do triângulo representam misturas binárias dos dois componentes dos vértices unidos pela respectiva base.

As amostras foram analisadas visualmente e através de polarizadores cruzados, para verificação de birrefringência.

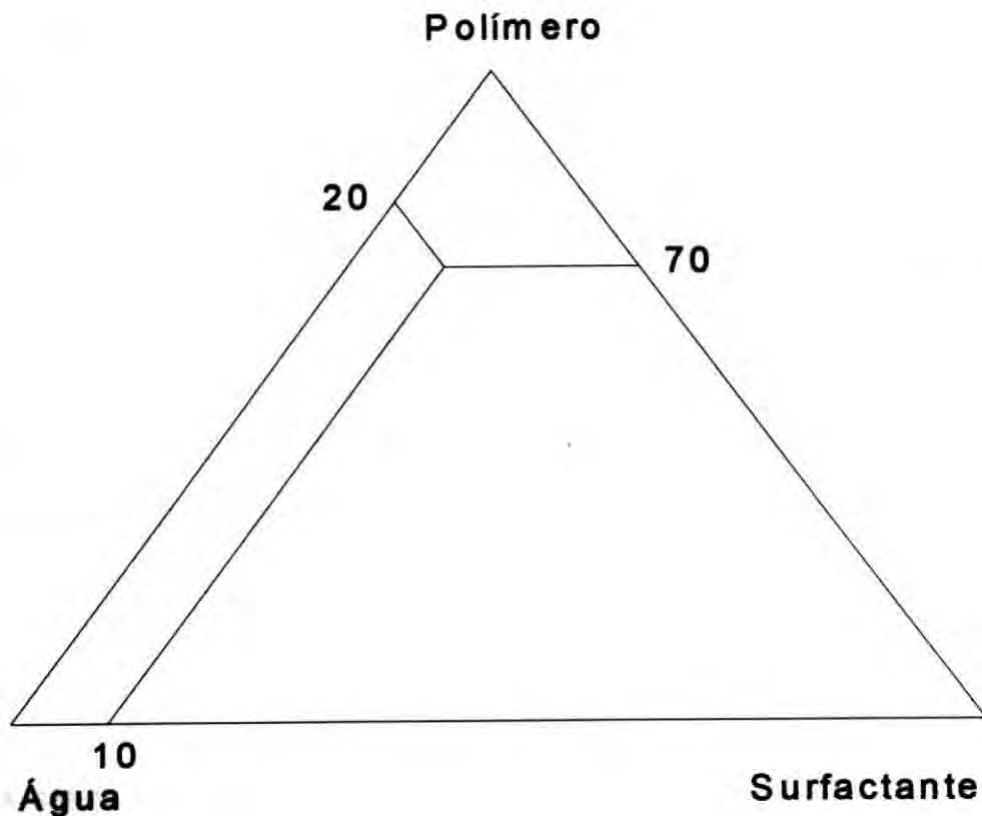


Figura 9 – Triângulo de Gibbs para a construção de diagrama ternário de fases esquemático de três componentes: polímero, surfactante e água à temperatura fixa. As composições dos diferentes componentes no ponto P são dadas pela distância da base oposta. A amostra representada pelo ponto P é composta de 70% de polímero, 20% de água e 10% de surfactante.

Métodos

Medidas de Turbidez

O negativo do logaritmo natural da razão da intensidade de luz transmitida (I_t) pela intensidade de luz incidente (I_0) é a absorvância por unidade do caminho óptico, ou turbidez, na ausência de absorção de luz ($\epsilon_{\text{espalhada}}$). Matematicamente representada por (HIEMEZ & RAJAGOPALAN, 1997):

$$\epsilon_{\text{espalhada}} = - \ln \left(\frac{I_t}{I_0} \right) \quad (4)$$

Para material não absorvente,

$$I_t = I_0 - I_{\text{esp}} \quad (5)$$

onde I_{esp} é a intensidade de luz espalhada pela amostra em todas as direções.

Combinando as equações 4 e 5, temos:

$$\varepsilon_{\text{espalhada}} = -\ln\left(\frac{I_0 - I_{\text{esp}}}{I_0}\right) = \ln\left(1 - \frac{I_{\text{esp}}}{I_0}\right) \cong \frac{I_{\text{esp}}}{I_0} \quad (6)$$

Neste trabalho, as medidas de turbidez foram feitas variando o comprimento de onda (λ) de 200 a 600nm e a temperatura de 15 a 65°C, para as vesículas não sonicadas de DODAB, e descontando a linha de base ou turbidez do solvente. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível (Hitachi U-2001), equipado com cela de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Obtivemos com as medidas de turbidez em função da temperatura da amostras as T_m de DODAB 1mM e dos sistemas PEG/DODAB, para PEG_{12k} e PEG_{35k}, nas razões molares testadas PEG/DODAB = 0,5; 1; 2; 6 e 12.

Para as medidas de turbidez em função do tempo foi utilizado um turbidímetro de comprimento de onda fixo (550 nm) e equipado com cela de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Spectroquant-Merck-Nova 400)

Medidas de Fluorescência

Inicialmente foi investigado o efeito de DODAB no espectro de absorção, na presença e ausência de PEG, da sonda fluorescente DPB, a fim de verificar a interação polímero-surfactante, através do monitoramento da intensidade e da posição dos picos característicos da absorbância do fluoróforo.

Na fluorescência, a relação de fótons emitidos por fótons absorvidos é chamada de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f), que tem valor próximo da unidade para fluoróforos eficientes, e valores quase nulos para os fluoróforos pouco eficientes. Se todas as moléculas excitadas fluorescem, $(\Phi_f) = 1$ e se nenhuma fluoresce $(\Phi_f) = 0$. O tempo de vida de fluorescência (τ_t), que caracteriza o tempo médio de permanência do fluoróforo no estado excitado, e o rendimento quântico (ϕ_f) estão relacionados pela equação. (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 1999):

$$k_f = \Phi_f / \tau_t \quad (7)$$

onde k_f = constante de velocidade com a qual os fótons são emitidos na fluorescência.

O rendimento quântico de fluorescência da amostra foi calculado pela equação (BARRELEIRO *et al*, 2002):

$$\Phi_f = \left[(I_f \Phi_{f_0}) / I_{f_0} \right] \left[\left(1 - 10^{-A_{f_0}} \right) / \left(1 - 10^{-A_f} \right) \right] \quad (8)$$

onde: Φ_f , I_f , Φ_{f_0} e I_{f_0} são o rendimento quântico de fluorescência e a intensidade de fluorescência do fluoróforo na vesícula e na solução de referência, respectivamente. E A_f e A_{f_0} são a absorvância do fluoróforo na vesícula e na solução de referência medidas no comprimento de onda de excitação (λ_{max}) (BARRELEIRO *et al*, 2002). os nossos experimentos foi utilizada a sonda DPB/ciclohexano como referência com $\Phi_{f_0} \approx 0,44$ a 25 °C (ALLEN, MIOLA & WHITTEN, 1988; ALLEN *et al.*, 1987).

Mediu-se a absorção da sonda incorporada nas vesículas e no comprimento de onda de máxima absorção (A_{f_0}) que foi o utilizado para excitação das amostras e medidas de emissão de fluorescência a 25°C. Em seguida, numa cubeta com ciclohexano contendo o mesmo volume da amostra vesicular, foi adicionada a sonda referência até atingir o valor da absorvância próximo ao da amostra sonda/vesícula (A_f) no mesmo comprimento de onda (λ_{max}). Mediu-se então, a intensidade de fluorescência da referência (I_{f_0}) e da amostra sonda-vesícula (I_f). As medidas foram feitas a 25 ± 1 °C. Entre duas medidas consecutivas esperou-se 10 minutos, com

agitação magnética da amostra, para que a amostra atingisse a temperatura desejada. Então deixou-se 1 minuto em repouso para efetuar a leitura e em seguida mais 1 minuto de repouso para efetivar a leitura. O controle de temperatura foi feito usando um banho termostaticado (Fischer-Scientific) acoplado ao porta-cela do espectrofluorímetro.

Nos experimentos de fluorescência foram utilizados 2,0 mL de solução de DODAB 0.5 mM no qual foram adicionadas alíquotas de 20 μ L de PEG_{12K} 10 mM. Para o cálculo das razões PEG/DODAB foi considerado o efeito da diluição pela adição dos 600 μ L de PEG em DODAB 0,5mM. A variação da concentração da sonda DPB e de DODAB pela diluição resultante da adição de PEG foi de aproximadamente 23%. Dentro desta variação de concentração, as propriedades das vesículas de DODAB variam muito pouco (FEITOSA, KARLSSON & EDWARDS, 2005; FEITOSA & KARLSSON, 2005; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000).

As medidas de fluorescência foram realizadas, em duplicata, utilizando espectrofluorímetro (Hitachi F 4500) equipado com cela de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A interação entre polímeros e surfactantes pode ser estudada através das técnicas calorimétricas: titulação isotérmica (ITC) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Como resultado imediato pode ser verificada a variação da capacidade calorífica (C_p) em função da temperatura ou concentração, obtida, respectivamente, por DSC e ITC. Em ambos os casos pode-se verificar a variação de energia envolvida no processo estudado (ALMEIDA *et al.*,2004; SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004; MARQUES, KHAN & LINDMAN, 2002; OLOFSSON & WANG,1998; AOKI & KODAMA,1998; KODAMA,TSUTII & SEKI,1990).

Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

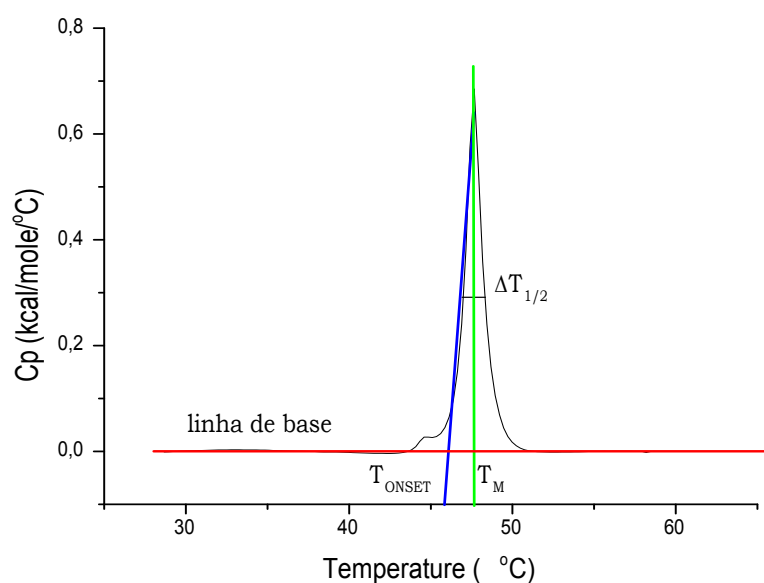


Figura 10 – Esquema de uma curva e DSC, indicando os parâmetros obtidos para um sistema vesicular: T_m , $T_{1/2}$ e H (e T_{ONSET})

Na Figura 10 destacamos a linha de base e a região de temperatura antes e depois do processo ou transição estudado. Ao subtrair essas curvas obtém-se a variação da capacidade calorífica (ΔC_p) da solução, dada pela curva (termograma) do processo. Os picos nas curvas estão relacionados a eventos de transição de fases ou estruturais, e a área sob o pico (ou picos) é proporcional à variação da entalpia ΔH da transição. O parâmetro $\Delta T_{1/2}$ corresponde à largura da curva de DSC referente à metade de ΔC_p e está inversamente relacionado à cooperatividade dos sistemas. (SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004; BARRELEIRO *et al*, 2002; MARQUES, KHAN & LINDMAN, 2002).

A transição dos sistemas pode ser visualizada através dos parâmetros relacionados ao processo estudado, assim podemos optar por um dos dois pontos característicos das curvas de DSC: temperatura máxima (T_M) representada pela altura máxima da curva e T_{ONSET} , representada pela intersecção entre a linha de base e inclinação da curva (Figura10). Em nosso estudo optamos pela utilização da T_M , visto que pode ser determinada com precisão, não tendo com fator limitante a necessidade de linha de base bem definida (SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004).

As medidas calorimétricas são relativas à diferença na capacidade calorífica entre os volumes (fixos) da solução e do solvente em função da temperatura e a

capacidade calorífica aparente é calculada como uma função das diferenças de temperatura entre a amostra e a referência (MARTHOT & BENOIST, 1994).

A alta sensibilidade do DSC favorece o estudo do efeito da temperatura nas vesículas e permite também observar as mudanças ocorridas no sistema (por exemplo a transição de fase gel para líquido-cristalina). Além disso, obtêm-se valores de T_m dados pelas posições dos picos no termograma e pela intersecção entre a linha de base e inclinação da curva (T_{ONSET}). A variação de entalpia associada a cada transição pode ser calculada integrando a curva através dos picos, usando o *software MicroCal Origin, v.5.0* (ALMEIDA *et al.*, 2004; SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004; MARQUES, KHAN & LINDMAN, 2002; OLOFSSON & WANG, 1998; KODAMA, INOUE & TSUCHIDA, 1995).

Nas medidas de DSC a amostra é aquecida ou resfriada a uma taxa constante de transferência de calor e a capacidade calorífica (C_p) do sistema é determinada. Quanto menor a variação de temperatura do sistema causada pela transferência de uma determinada quantidade de calor, maior a sua capacidade calorífica que pode ser definida como (ATKINS, 2003):

$$C = \frac{dQ}{dT} \quad (9)$$

A capacidade calorífica a pressão constante é definida por

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (10)$$

onde a entalpia H corresponde ao calor transferido a pressão constante. Para uma variação infinitesimal, em um processo a pressão constante, a equação (10) pode ser escrita como:

$$dH = C_p dT \quad (11)$$

Podemos assim, calcular a variação de entalpia ΔH :

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (12)$$

A temperatura de transição de fase T_m de um processo corresponde à posição do pico de energia ΔH , e quando o pico é bem definido (estreito) a transição é cooperativa.

As medidas de DSC dos sistemas aqui estudados foram realizadas entre 15 e 65 °C, com taxa de variação temporal de 1°C/min (razão de aquecimento), e obtivemos valores de T_m para DODAB 1 mM e dos sistemas PEG/DODAB, para PEG_{12k} e PEG_{35k} nas razões molares $R = \text{PEG/DODAB} = 0,5, 1, 2, 6$ e 12.

Para os sistemas estudados (DODAB e PEG/DODAB), a técnica de DSC, foi útil para verificar a contribuição do polímero na interação com o surfactante e conseqüente mudança na T_m em relação a T_m de DODAB em água, permitindo também a verificação da existência de vesículas na solução (ALMEIDA *et al.*, 2004; SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004; MARQUES, KHAN & LINDMAN, 2002; OLOFSSON & WANG, 1998; KODAMA, INOUE & TSUCHIDA, 1995; KODAMA & MIYATA, 1995).

Medidas de Calorimetria por titulação isotérmica (ITC)

A técnica de ITC permite verificar a variação do fluxo de energia durante um processo de liberação ou absorção de calor. Os calorímetros isotérmicos podem ser chamados de calorímetros de condução ou de fluxo de calor e, neste tipo de equipamento, a energia é liberada (ou absorvida) na cela de reação para um trocador de calor (que fica à sua volta). O fluxo de calor é registrado pelas termopilhas posicionadas entre a amostra e o trocador de calor e a diferença entre a amostra e o trocador de calor gera um potencial elétrico (U) sobre a termopilha. Considerando que a temperatura da cela da amostra e do trocador de

calor são constantes, a potência térmica liberada na cela da reação é calculada através da equação (OLOFSSON & WANG, 1998)

$$P = \varepsilon [U + \tau (dU / dt)] \quad (13)$$

onde ε é uma constante de calibração, τ é a constante de tempo do instrumento e dU/dt é a derivada da potência térmica em função do tempo.

O calorímetro de alta sensibilidade (VP-ITC – MicroCal Northampton, MA) é equipado com duas celas de 1.4 mL uma para conter, a referência (água) e a outra a amostra (vesículas de DODAB). Para a titulação de DODAB 1,0 mM foram feitas adições automáticas consecutivas de 3 a 15 μ L de solução 14,5 mM de PEG_{12k}, em intervalos de 10 min, através de micro-seringas (Hamilton, com capilar de aço) conectadas a um adicionador, interfaceado ao programa central de controle do calorímetro, e sob agitação constante (limitada ente 20 e 120 rpm que é a faixa de trabalho do equipamento).

Nos experimentos de ITC mede-se diretamente a energia (troca de calor) à temperatura constante e os resultados são tratados em termos da entalpia em função da concentração do polímero (PEG_{12K}), permitindo a obtenção do calor envolvido no processo de interação de ligantes como o PEG com moléculas receptoras (vesículas de DODAB) (SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004; SORAI, 2004).

A contribuição da entalpia e da entropia à uma interação pode fornecer informações sobre o mecanismo desta ligação. A técnica de ITC tem sido um método padrão para investigar tais interações, com a vantagem de ser um método direto e não invasivo. A representação gráfica do calor envolvido no processo fornece o grau de saturação do ligante (PEG).

Após cada adição do titulante, na solução da macromolécula, o calor liberado (exotérmico) ou absorvido (endotérmico) é medido contra a referência (solvente) e a troca de calor é monitorada pela força elétrica necessária para manter uma pequena diferença de temperatura entre ambas as celas colocadas em uma câmara adiabática, pois a quantidade disponível de macromolécula não complexada decresce progressivamente a cada adição, e a magnitude do pico torna-se menor até que a saturação seja alcançada (SILVA, LOH & OLOFSSON, 2004; SORAI, 2004; HEERKLOTZ, BINDDER & EPAND, 1999).

Avaliação da Atividade Bactericida

A atividade bactericida foi avaliada para os sistemas DODAB/água, DODAB/PEG_{200Da} e DODAB/PEG_{2MDa}, (para 1 mM do surfactante, sonificado e não sonificado e 1% p/p dos polímeros), utilizando o método da Diluição de Uso e Cilindros carreadores, segundo o Procedimento Operacional Padronizado (POP:INCQS* n° 65.3210.007) (BELOIAN, 1990), que estabelece a metodologia a ser adotada para a avaliação da atividade bactericida de desinfetantes. Este procedimento se aplica à análise microbiológica dos desinfetantes classificados, segundo a Portaria DISAD N° 15/88 (BRASIL, 1998), como desinfetantes de uso geral, para indústria alimentícia, para lactários, hospitalar para superfícies fixas e hospitalar para artigos semi-críticos (para procedimentos não invasivos). Como material de referência (microrganismos teste) foram utilizados *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708),** *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)** e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).**

O preparo dos cilindros carreadores seguiram as seguintes etapas:

- a) ferver os cilindros em água destilada por 10 minutos;
- b) mergulhar os cilindros em solução de hidróxido de sódio 1N e deixar durante uma noite;
- c) lavar abundantemente com água da torneira até que a água de lavagem não apresente pH básico. Medir o pH com fita indicadora de pH. Enxaguar, então 5 vezes com água destilada;
- d) colocar os cilindros em tubos de ensaio 25 mm x 200 mm com tampa de rosca, na quantidade de 11 cilindros por tubo e cobrir com uma solução de asparagina 0,1 % p/p. Esterilizar por autoclavação a 121°C por 20 minutos. Guardar à temperatura ambiente; e
- e) triar os cilindros através do Método da Diluição de Uso, utilizando o *S.aureus* (ATCC 6538) e uma solução de 500 ppm de cloreto de alquil dimetil benzil amônio. Desprezar os cilindros que apresentarem crescimento neste ensaio de triagem. Nos

* Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

** American Type Culture Collection.

ensaios com as amostras de desinfetantes, cilindros que apresentam crescimento devem ser novamente triados e somente poderão ser reutilizados se não apresentarem crescimento nesta nova triagem.

Para o preparo das culturas teste foram executados os seguintes procedimentos sob condições assépticas:

- a) reconstituir uma ampola com o microrganismo liofilizado com caldo nutriente específico de cada microrganismo (caldo nutriente D para *Salmonella choleraesuis* e caldo soja tripticaseína (TSB: Tryptic Soy Broth) para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*);
- b) proceder, a partir do crescimento no caldo específico, a bacterioscopia corando pelo método de Gram (onde devem ser observados bastonetes gram negativos para *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* e cocos gram positivos para *Staphylococcus aureus*);
- c) verificar a pureza da cultura no caldo específico e então escolher uma colônia isolada e semear em três tubos com ágar nutriente inclinado. Incubar por 48 h a $36 \pm 1^\circ \text{C}$;
- d) agitar as culturas teste por 3 a 4 segundos e deixar em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente, antes de usar;
- e) transferir 10 cilindros estéreis, em solução de asparagina com gancho de transferência para 10 mL da cultura teste de 48-54 horas. Após um período de contato de 15 minutos, à temperatura ambiente, remover os cilindros e colocá-los em posição vertical sobre papel de filtro contido em uma placa de Petri. Cobrir a placa e incubar a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 40 minutos;
- f) distribuir o desinfetante a ser testado em 60 tubos de 25 mm x 150 mm, na quantidade de 10 mL por tubo identificando o primeiro tubo com o número 1 e o número da amostra. Numerar o restante de 2 a 60.
- g) colocar 10 tubos (a operação deverá ser repetida 6 vezes) em banho de água a 20°C e deixar alcançar esta temperatura (aproximadamente 10 minutos);
- h) adicionar, então, um cilindro contaminado e seco, a intervalos de um minuto, cronometradamente a cada um dos dez tubos contendo o desinfetante;
- i) girar o tubo suavemente três vezes e recolocá-lo no banho de água a 20°C . Logo, 10 tubos são semeados em 9 minutos, deixando 1 minuto de intervalo antes da transferência do primeiro cilindro carreador para o primeiro tubo de subcultura, perfazendo 10 minutos de contato;

- j) renovar os cilindros dos tubos com desinfetante (após 10 minutos de contato, mantendo os intervalos constantes de um minuto entre cada tubo) para os respectivos tubos com meio de subcultura identificados com o número da amostra e numerados de 1 a 10 (primeira bateria de subcultura);
- k) transferir cada cilindro para outra série de tubos se subcultura, numerados de 1 a 10 acrescentando a letra R (re-subcultura) ao número, 10 minutos após a transferência do último cilindro do desinfetante para o meio de subcultura (segunda bateria de subcultura ou re-subcultura)
- l) realizar 6 vezes as etapas descritas nos itens g até k, na bateria de 10 cilindros, de forma a perfazer 60 cilindros; e
- m) agitar todos os tubos de subcultura e incubá-los a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 48 horas.

Para avaliação da atividade bactericida, leitura dos resultados e critérios para ser considerado satisfatório, foram observados e descritos a presença e a ausência de crescimento bacteriano. No caso das amostras testadas, DODAB/água, DODAB/PEG_{200 Da} e DODAB/PEG_{2 MDa}, (para 1 mM do surfactante, sonificado e não sonificado e 1% p/p dos polímeros) os resultados foram insatisfatórios e então, foi realizado um segundo ensaio para confirmação, e o resultado final foi o obtido nos dois ensaios, que foram coincidentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados de Turbidez

Investigamos inicialmente o efeito de PEG_{12K} e PEG_{35K} na estabilidade e na T_m das vesículas espontâneas de DODAB e, em alguns casos, nas vesículas sonicadas de DODAB.

Neste estudo referimos-nos às dispersões sonicadas e não sonicadas, cujos agregados têm, estrutura vesicular, ou bicamada e unilamelar fechada, e diâmetros médio, grande e pequeno, respectivamente (FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000). As vesículas espontâneas (não sonicadas) são predominantemente esféricas, enquanto que as sonicadas têm formato achatado, tipo lente.

Os estudos desenvolvidos por BENATTI *et al.*, 2001 com marcadores de spin em dispersões sonicadas de DODAB (15 °C) indicaram a presença de duas populações distintas de agregados, uma densamente empacotada provavelmente, no estado gel e outra população em um estado mais fluído, já a 50 °C os marcadores de spin (EPR) incorporados nessas vesículas mostraram uma população única, característica de dispersão no estado líquido-cristalino. Para dispersões não sonicadas de DODAB a 15 °C os mesmos experimentos indicaram que os anfífilos estavam densamente empacotados e a 50 °C apresentaram maior mobilidade.

A Figura 11 mostra o efeito do tempo pós-preparação das vesículas sonicadas e não sonicadas na turbidez da amostra, indicando que ambas as amostras são relativamente estáveis por vários dias. As vesículas sonicadas, no entanto, apresentam menor estabilidade, pois a turbidez sofre maior aumento com o tempo, indicando que elas tendem a agregar-se ou fundir-se na forma de vesículas maiores. O aumento na turbidez das amostras, no entanto, é relativamente lento, de modo que, para fins de aplicações, essas vesículas pode ser consideradas “estáveis”, na verdade, elas são meta-estáveis.

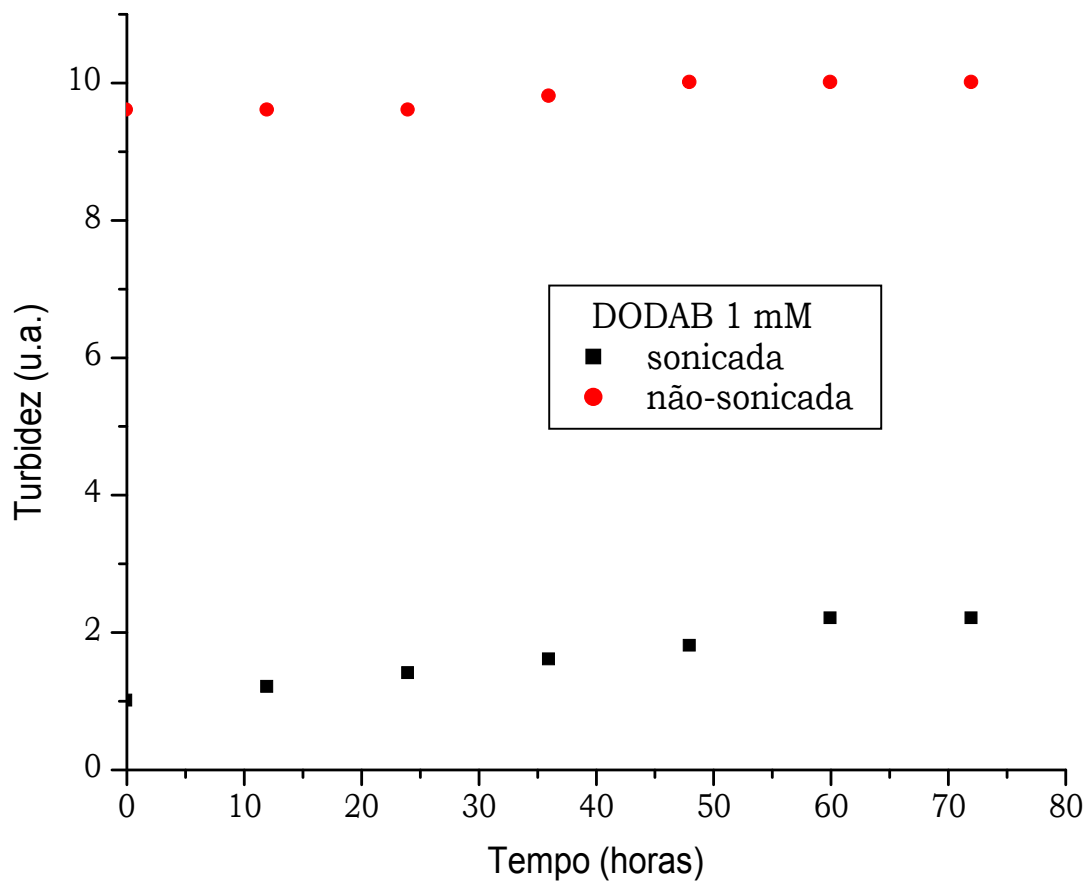


Figura 11 - Efeito do tempo na turbidez ($\lambda = 550 \text{ nm}$) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06 % p/p) sonicadas e não sonicadas em água a 25 °C (curva normalizada).

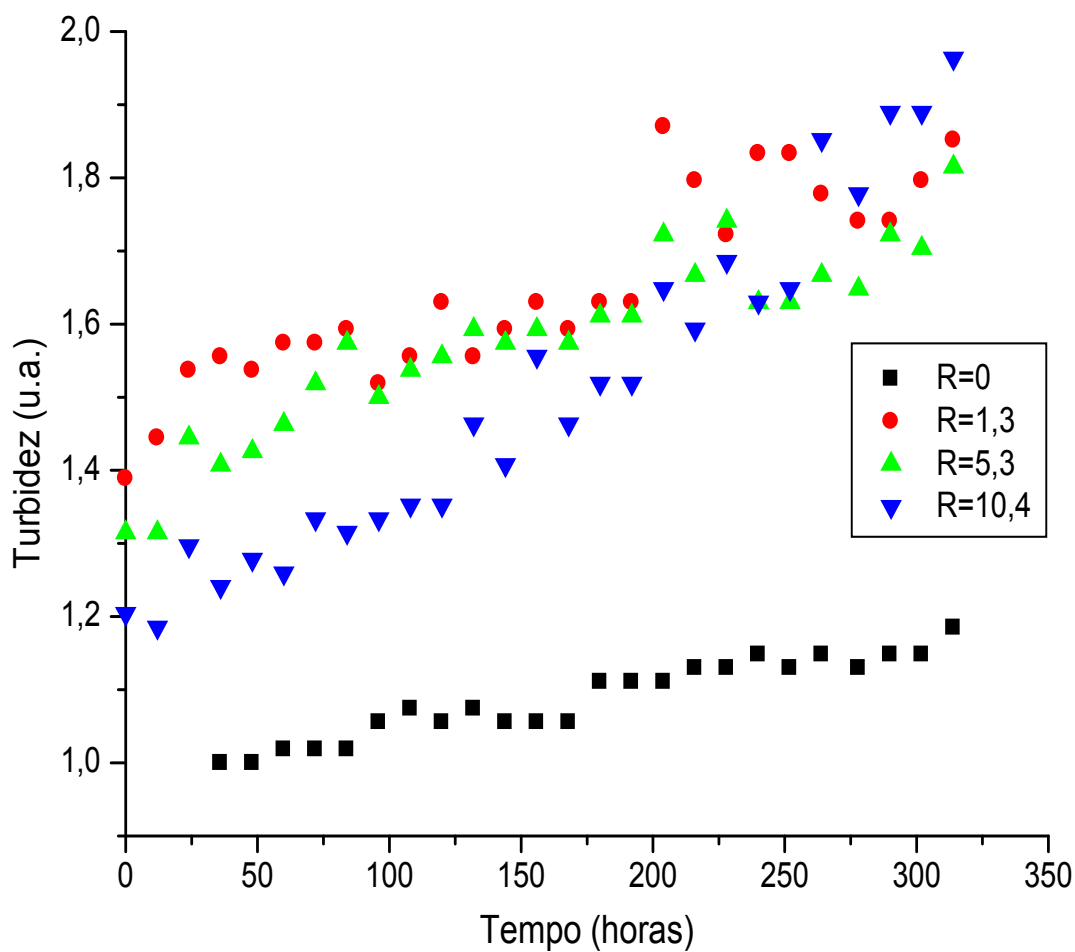


Figura 12 - Efeito do tempo na turbidez ($\lambda = 550$ nm) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) não sonicadas em água, e concentrações crescentes de PEG_{12K}, para $R = \text{PEG}/\text{DODAB} = 0; 1; 3; 5,3$ e $10,4$ a 25 °C (curvas normalizadas).

A interação de PEG com as vesículas de DODAB em água foi monitorada por medidas de turbidez, fluorescência e DSC. Essas medidas deram informações sobre a estabilidade do sistema, a T_m de DODAB e a polaridade da região de bicamada das vesículas, na ausência e presença de PEG. Soluções estoques de DODAB 5,0 mM (0,31% p/p) e de PEG 20 mM (PEG_{12K} 24% p/p e PEG_{35K} 70% p/p) foram preparadas e as soluções misturadas de maneira a obter a concentração final desejada dos componentes. As medidas de turbidez em função do tempo foram iniciadas imediatamente após a mistura das amostras (tempo zero). As Figuras 12 e 13 mostram as curvas de turbidez em função do tempo, para diferentes concentrações de PEG_{12K} e DODAB 1 mM em dispersões não sonicadas e sonicadas, respectivamente. Assim como na ausência do polímero, a turbidez da mistura aquosa PEG/DODAB aumenta com o tempo. Esse aumento se deve, possivelmente, a um processo lento de agregação de vesículas ou agregados, formando estruturas maiores, ou vesículas multilamelares co-existindo com as vesículas unilamelares predominantes nas dispersões de DODAB 1 mM.

De acordo com as medidas de turbidez, o tamanho das vesículas, ou complexos vesiculares de PEG/DODAB, varia pouco com a adição do polímero, sugerindo que não ocorrem mudanças profundas na estrutura desses agregados, ou complexos polímero-surfactante, uma vez que o efeito de PEG é aumentar, discretamente, a T_m de DODAB, conforme veremos a seguir. Sendo PEG um polímero hidrossolúvel, provavelmente, ele interage com a região da superfície das vesículas e não com o interior da bicamada, dessa forma variando de modo pouco acentuado o estado conformacional das caudas dos surfactantes.

As curvas das Figuras 11; 12 e 13 foram normalizadas para efeito de comparação, visto que as medidas de turbidez são importantes para caracterizar os agregados.

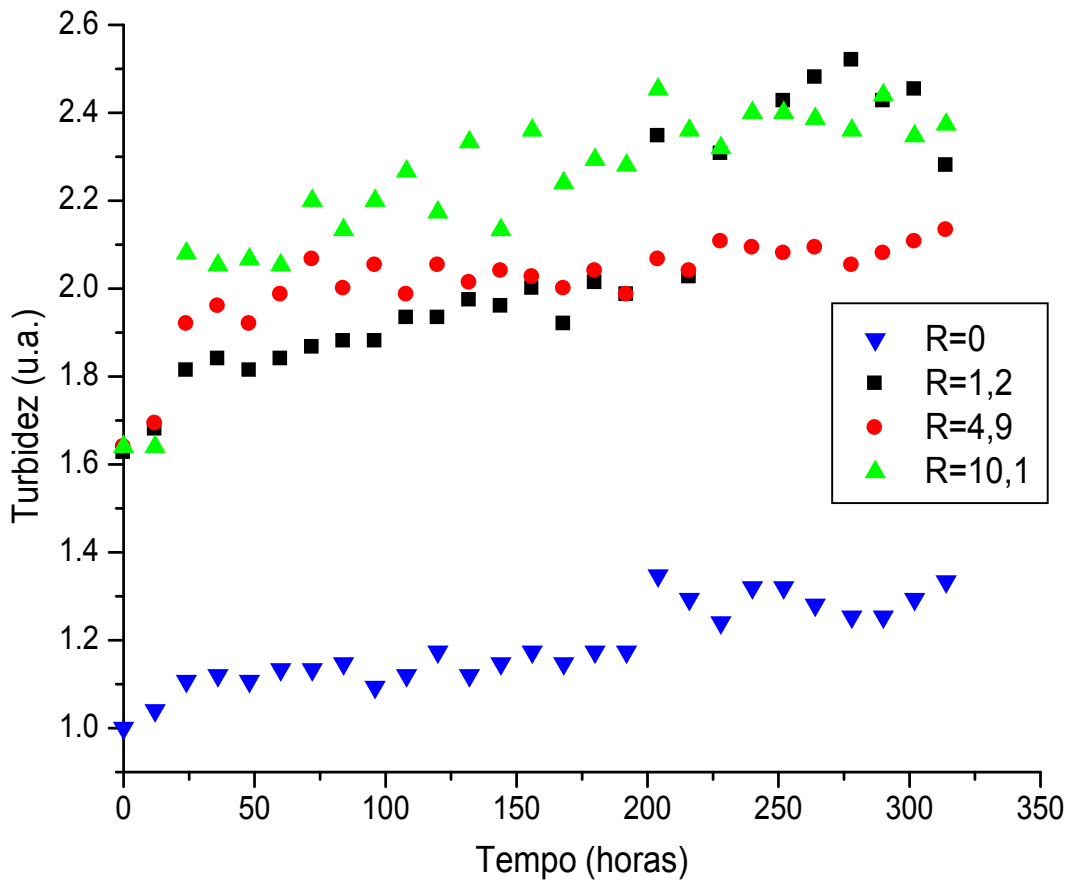


Figura 13 - Efeito do tempo na turbidez ($\lambda = 550$ nm) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) sonicadas em água, e concentrações crescentes de PEG_{12K}, para R = PEG/DODAB = 0; 1; 2; 4,9 e 10,1 a 25 °C (curvas normalizadas).

Alternativamente, nas Figuras 14 e 15 vemos o efeito da adição do PEG_{12k} na turbidez das vesículas de DODAB 1 mM, medidas em diferentes tempos após a mistura dos componentes (150, 250 e 300 horas). Em ambas as figuras, observamos que as curvas tendem a um patamar para a concentração de PEG acima de 4 mM (ou R > 4), indicando maior estabilidade do sistema.

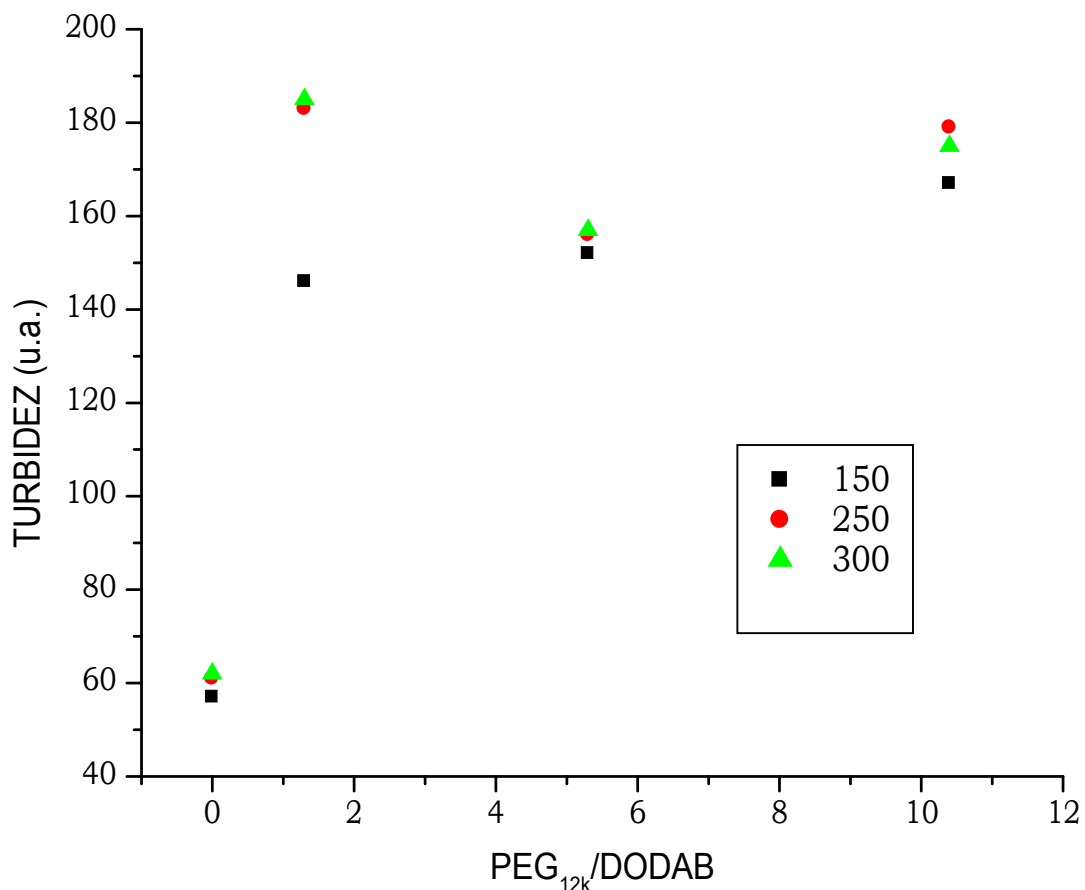


Figura 14 - Efeito da concentração de PEG_{12K} na turbidez ($\lambda = 550$ nm) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) não sonicadas em água, a 25 °C, após os tempos de 150, 250 e 300 horas conforme legenda.

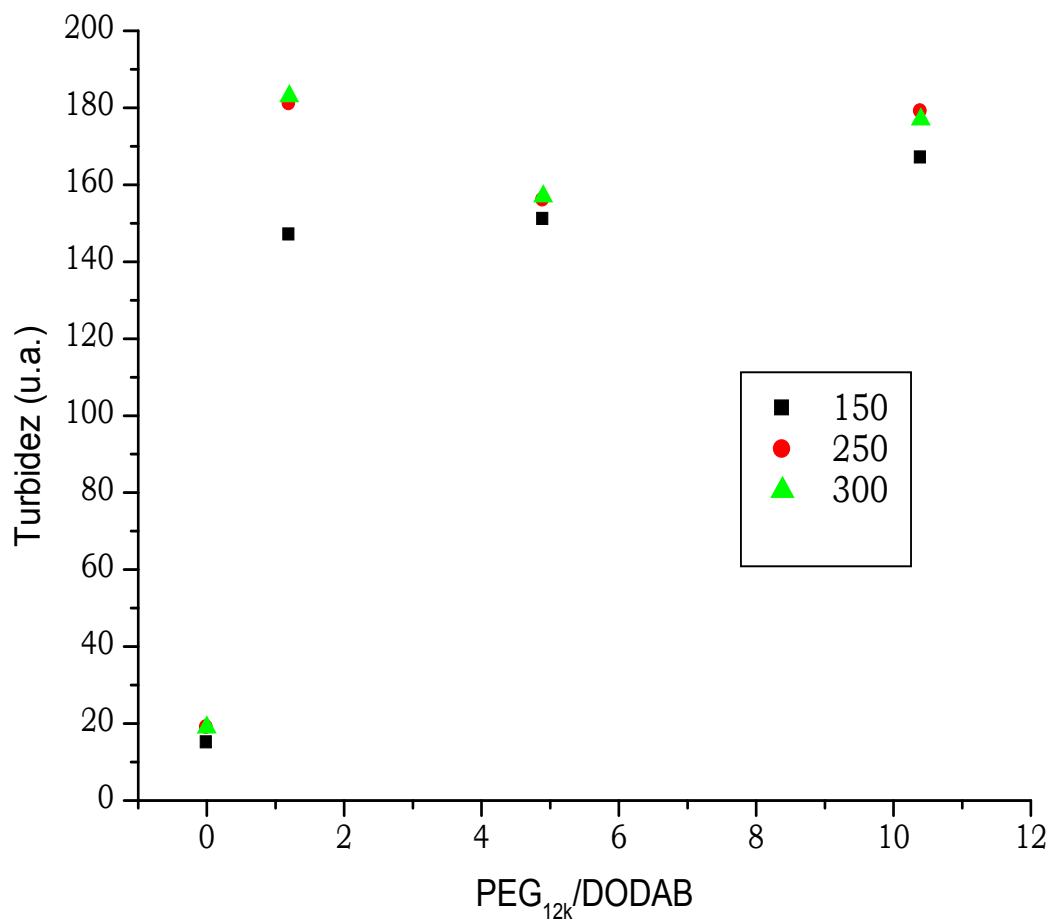


Figura 15 - Efeito da concentração de PEG_{12K} na turbidez ($\lambda = 550$ nm) de vesículas de DODAB 1,0 mM (0,06% p/p) sonicadas em água, a 25 °C, após os tempos de 150, 250 e 300 horas, conforme legenda.

Em seguida, monitoramos a 25°C a turbidez da amostra em função da razão de concentração molar $R = \text{PEG}_{12K}/\text{DODAB}$ pela adição de PEG_{12K} a DODAB 1 mM (0,06% p/p) as medidas foram feitas considerando o tempo zero da adição de PEG (Figura 16). O perfil desta curva revela a tendência de diminuição inicial da turbidez, passando por um valor mínimo em $R = 1,5$ e um valor máximo em $R = 4,0$ (Figura 16). Após a adição de PEG_{12K} , o tamanho médio das vesículas inicialmente diminui até alcançar um valor mínimo quando $R = 1,5$ (uma vez que o sistema não floclula, provavelmente tamanho das vesículas diminui), que em seguida aumenta até um valor máximo quando $R = 4$ quando passa então, a diminuir novamente.

É difícil associar o comportamento da turbidez na Figura 16 ao tamanho dos agregados sem resultados de medidas experimentais complementares usando outras técnicas. Provavelmente, o polímero inicialmente envolve as vesículas (até $R = 1,5$) afetando o estado das cadeias de DODAB na bicamada, tornando-as mais rígidas, aumentando desse modo a T_m , conforme mostraremos a seguir, e o tamanho médio das vesículas diminui por efeito osmótico. Quando $1,5 < R < 4$, o aumento do tamanho médio das vesículas se deve ao acúmulo de polímero envolvendo o complexo, e para $R > 4,0$, o PEG tem um efeito desestabilizador nas vesículas que diminuem de tamanho, sem, entretanto, alterar a T_m , conforme mostraremos a seguir, indicando que existem vesículas íntegras nos complexos com PEG. Cabe observar que a variação da turbidez não se deve necessariamente a variação do tamanho das vesículas, mas também à variação na estrutura das vesículas, por exemplo, formação de vesículas multilamelares ou multiestruturais. Uma conclusão definitiva sobre a estrutura do agregado de DODAB-PEG formado não é possível com base apenas nos resultados experimentais que temos disponíveis.

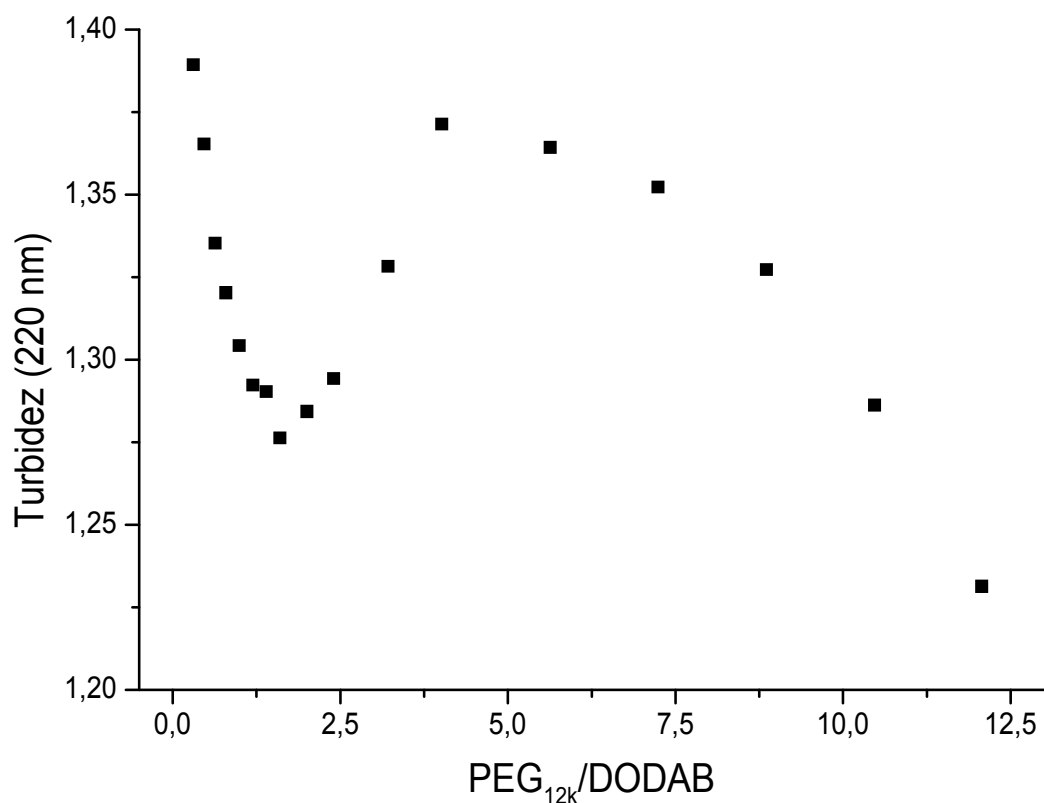


Figura 16 – Efeito da razão molar $R = \text{PEG}_{12k}/\text{DODAB}$ na turbidez do sistema $\text{DODAB}/\text{PEG}_{12k}/\text{água}$, para 1 mM de DODAB não sonicada, a 25°C.

Monitoramos também a turbidez em função da temperatura para DODAB 1 mM ($R = 0$, sem PEG) não sonicada, e razões $R = \text{PEG}_{12k}/\text{DODAB} = 2$ e 6 (Figura 17). Em torno da T_m a turbidez sofre uma grande diminuição. Acima da T_m a turbidez independe da presença de PEG, porém, abaixo da T_m , a turbidez aumenta com a temperatura apenas na presença de PEG, permanecendo constante na ausência de PEG. As curvas mostram que a T_m tende a aumentar com a concentração de PEG_{12k} (ou R). Foram obtidos os seguintes valores de T_m : 44,8; 46,2 e 47,1 °C, respectivamente, para $R = 0$; 2,0 e 6,0 (Tabela 1). Essa dependência de T_m com R está de acordo com a obtida por DSC, mostrados a seguir. A Tabela 2 resume os valores da T_m de DODAB, obtidos para $R = 0$; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 indicando a tendência de aumentar com R . As curvas de turbidez para outras razões não tiveram o mesmo comportamento, ou seja, não apresentaram a variação esperada na região da T_m e, por isso, não são mostradas aqui.

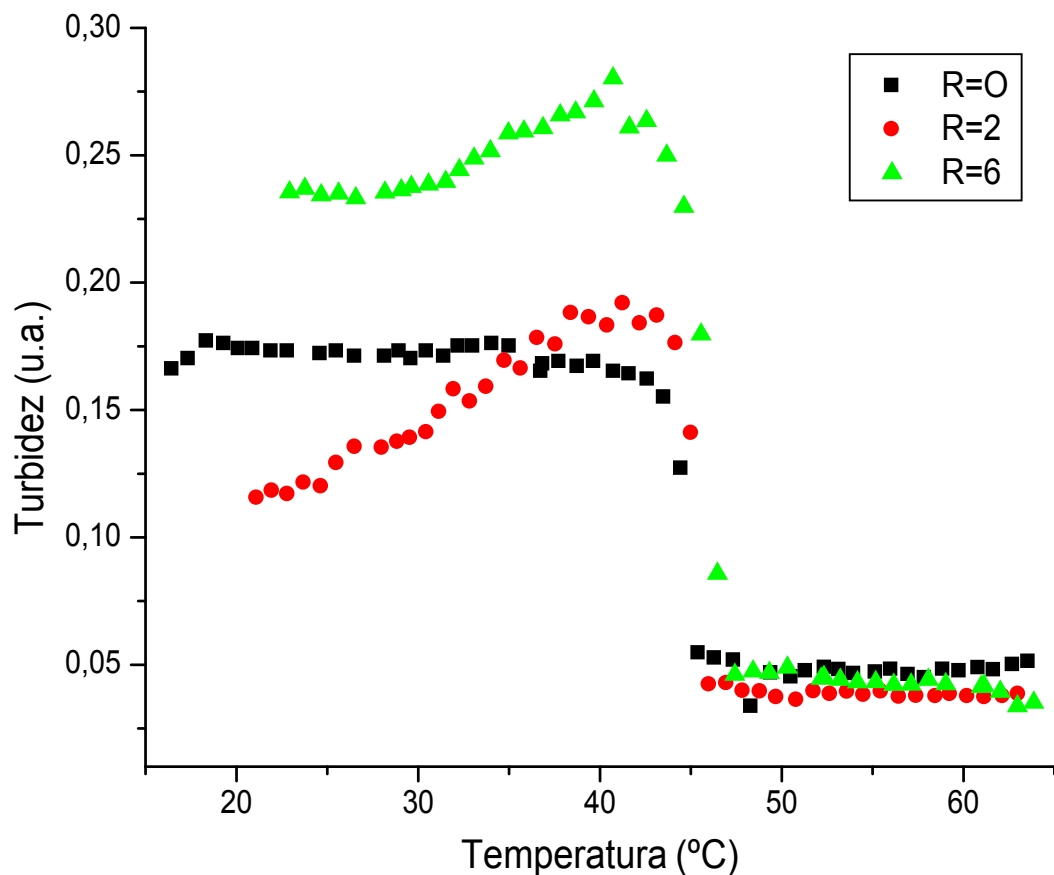


Figura 17 – Turbidez ($\lambda = 500 \text{ nm}$) de DODAB 1 mM, na ausência e presença de PEG_{12K}, em função da temperatura, para as razões molares $R = \text{PEG}_{12K}/\text{DODAB} = 0, 2 \text{ e } 6$. Amostra não sonicada.

A Tabela 1 mostra valores da T_m obtidos das curvas de turbidez em função da razão R, mostradas na Figura 16, para diferentes comprimentos de onda (λ) da luz incidente na dispersão aquosa de DODAB 1mM. Observamos que a presença do PEG_{12k} tende a aumentar a T_m de DODAB (valor mínimo obtido foi de 44,5°C para $R = 0$) e verificou-se também que, dentro do erro experimental ($\pm 0,5$), a T_m independe de .

Tabela 1 – Valores de T_m do sistema PEG_{12K}/DODAB (dispersões não sonicadas) para diferentes valores de R, obtidos por turbidez em diferentes comprimentos de onda (λ). Incerteza nas medidas: $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

R	T_m ($^\circ\text{C}$)			
	240 nm	300 nm	400 nm	500 nm
0	44,9	45,0	44,5	44,8
2,0	46,3	46,0	46,2	46,2
6,0	47,0	46,7	47,2	47,1

Resultados de fluorescência

A Figura 18 apresenta efeito de PEG_{12k} no espectro de fluorescência da sonda DPB em vesículas não sonicadas de DODAB 1 mM. A Figura 19 a intensidade de fluorescência da sonda DPB, em função da razão molar $R = \text{PEG}_{12k}/\text{DODAB}$, respectivamente. Esta técnica é comumente usada no estudo de co-solutos e co-surfactantes na T_m e na polaridade e micro-viscosidade da região da bicamada das vesículas (BARRELEIRO *et al.*, 2002; FEITOSA, BARRELEIRO & OLOFSSON, 2000; BENATTI *et al.*, 1999; FEITOSA & BROWN, 1997).

A intensidade de fluorescência depende do grau de liberdade do fluoróforo e, quando incorporado na bicamada da vesícula, abaixo da T_m , no estado de maior rigidez das cadeias, o fluoróforo apresenta um baixo grau de liberdade e fluoresce mais intensamente (aumenta o rendimento quântico de fluorescência). Acima da T_m a bicamada é mais fluída, o grau de liberdade dos fluoróforos é maior e a fluorescência diminui. A fluorescência é, portanto, regida pela viscosidade do ambiente de solubilização do fluoróforo (BENATTI *et al.*, 1999).

Os resultados de fluorescência exibem o mesmo perfil com o aumento da concentração de PEG. O aumento inicial na fluorescência até $R \approx 1,5$ se deve, provavelmente, a um rearranjo da sonda no interior da bicamada, cujas caudas dos surfactantes se tornam mais rígidas, resultando no aumento da T_m . Após atingir o valor máximo a fluorescência diminui assintoticamente até um patamar quando $R \approx 10-12$; essa diminuição se deve a um aumento contínuo na maleabilidade da sonda no interior da bicamada, resultado da interação de PEG com as vesículas de DODAB.

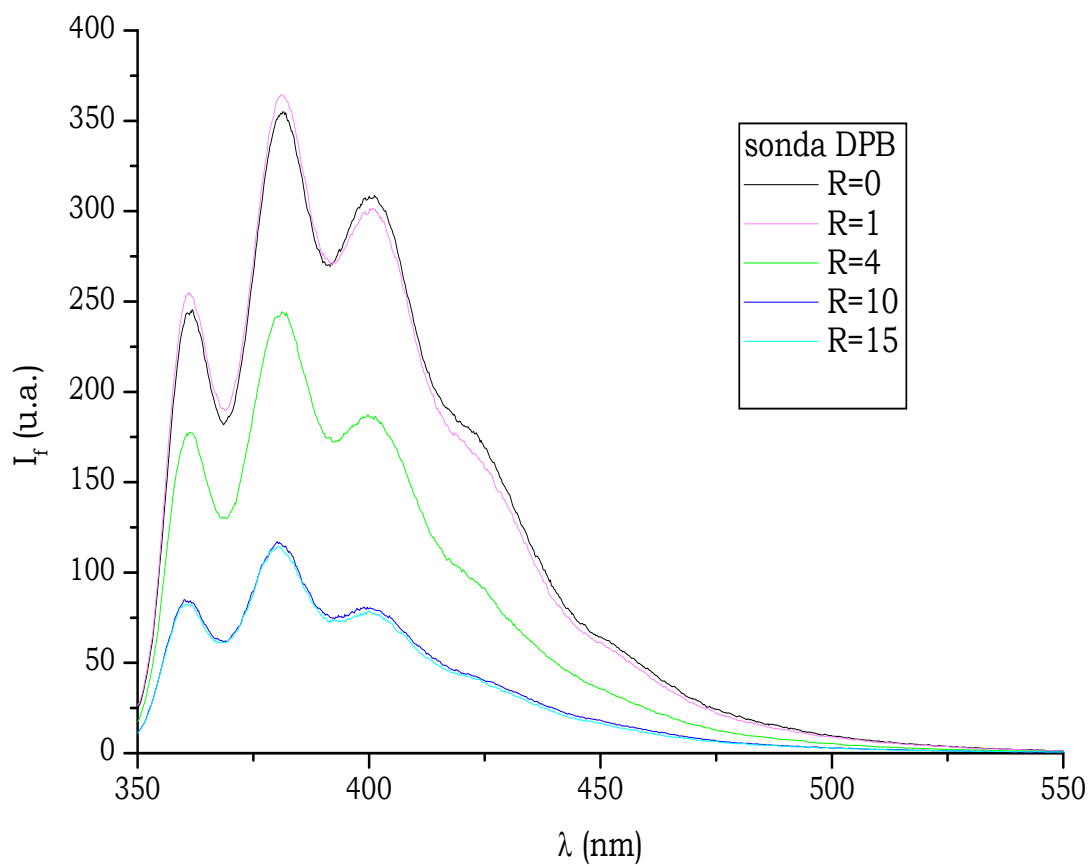


Figura 18 - Efeito de PEG_{12k} no espectro de fluorescência de DPB ($\lambda_{MAX} = 330$ nm) em vesículas não sonicadas de DODAB 1,0 mM (25 °C).

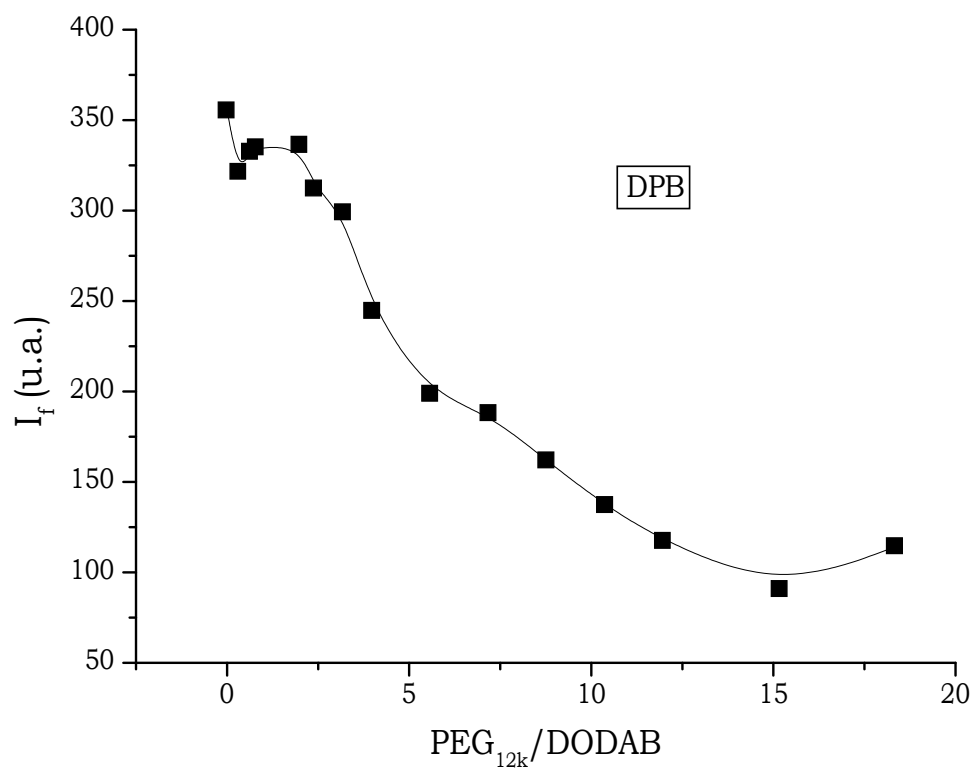


Figura 19 - Intensidade de fluorescência de DPB ($\lambda_{MAX} = 330$ nm) em função da razão molar $PEG_{12k}/DODAB$, para vesículas não sonicadas 1,0 mM (25 °C).

Resultados de DSC

Os termogramas DSC de DDAB e DODAB 5 mM em dispersão aquosa não-sonicada são mostrados na Figura 20. Esta técnica é relevante no estudo da transição de fase gel-líquido cristalino, ao qual está associado um pico no termograma. Cada pico do termograma corresponde a uma transição de fase ou estrutural específica, que deve ser convenientemente identificada.

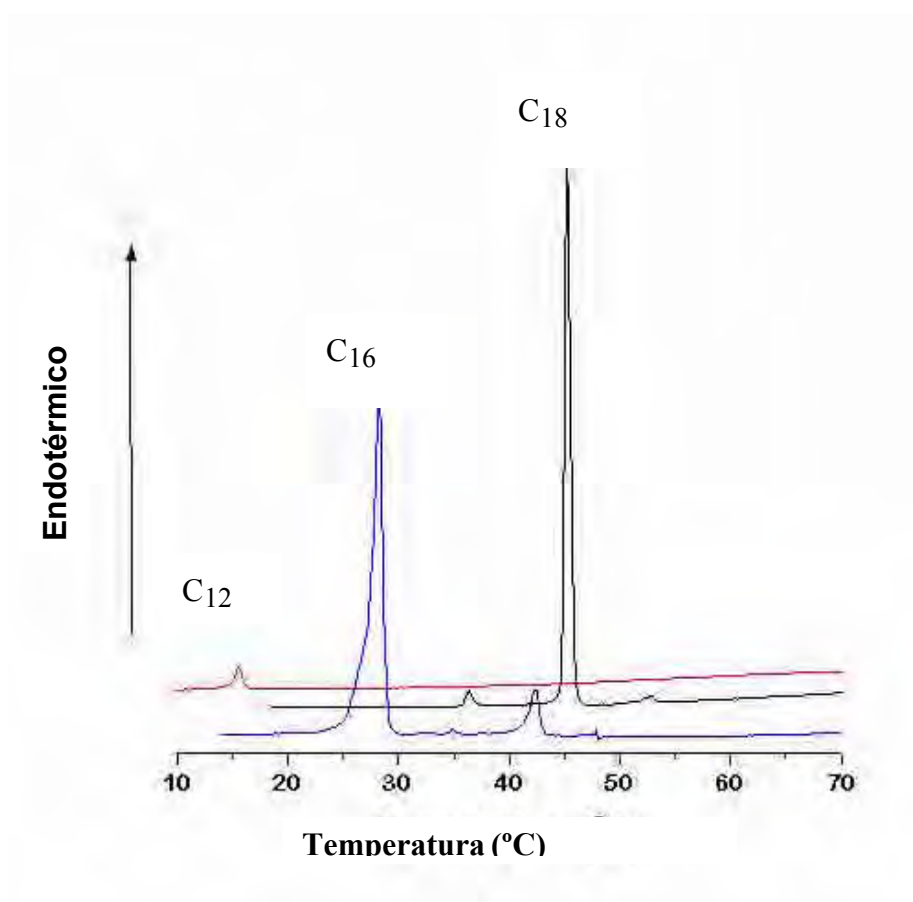


Figura 20 – Termograma DSC de DODAB e DDAB 5 mM preparada espontaneamente. Para fins de comparação, mostramos também o termograma para o surfactante homólogo C₁₆ (brometo de dihexadecildimetilamônio) não investigado nesta Tese.

A Figura 21 mostra os termogramas DSC de DODAB e PEG_{12k}/DODAB para as razões R = 0, 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0, mostrando a tendência de T_m aumentar com a concentração de PEG. O efeito da razão PEG/DODAB na T_m é mostrado na Figura 22 e na Tabela 2. Nesta Tabela também são mostrados os valores de T_{1/2} e

H para esse sistema. Ao contrário da T_m , que aumenta com a concentração de PEG até atingir um patamar, não observamos nenhuma clara dependência de $T_{1/2}$ ou H com a concentração de PEG. Para o sistema PEG_{35k}/DODAB verificamos um comportamento semelhante, e na Tabela 3 resumimos os valores de T_m , $T_{1/2}$ e H para esse sistema.

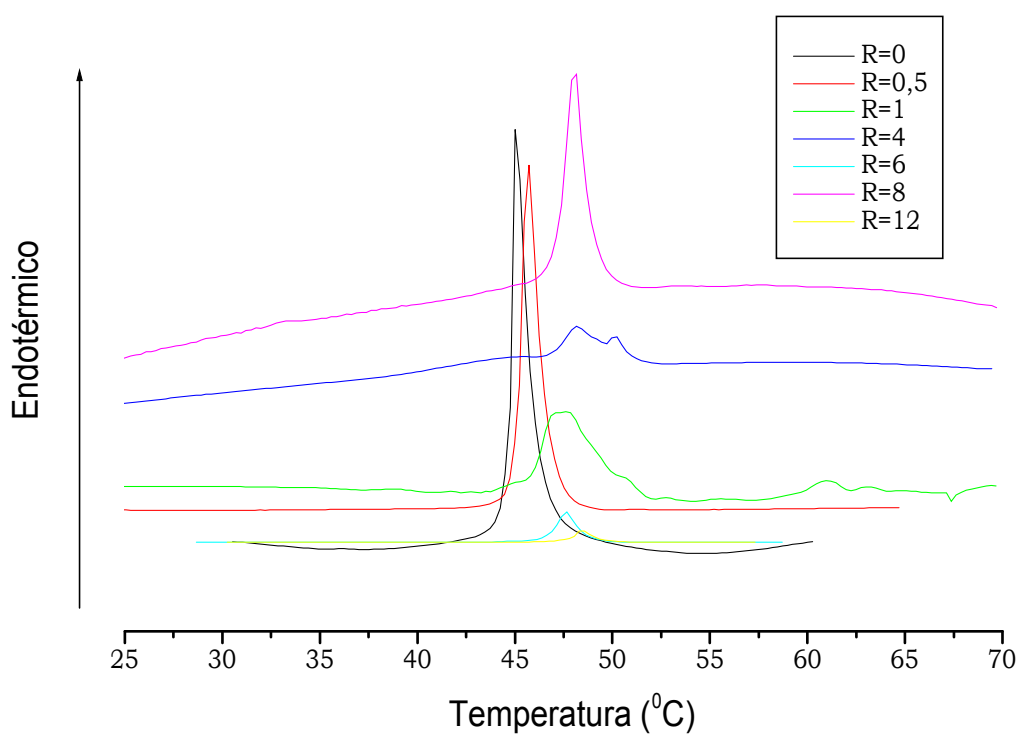


Figura 21 – Termograma de DSC de DODAB1mM em dispersão aquosa de vesícula não-sonicada na ausência e presença de PEG_{12k} (R= 0, 0,5; 1,0; 4,0; 6,0 e 12,0).

Tabela 2 – Valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ e ΔH para o sistema PEG_{12k}/DODAB (vesícula não sonicada) para diferentes razões R = PEG_{12k}/DODAB, obtidas por DSC.

Incerteza nas medidas: $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

R	T_m ($^\circ\text{C}$)	$\Delta T_{1/2}$ ($^\circ\text{C}$)	ΔH (kcal/mol)
0	45,0	1,0	8,3
0,5	45,7	1,0	10,1
1,0	47,9	2,8	5,6
4,0	48,2	3,1	2,6
6,0	47,7	1,3	1,0
12,0	48,6	1,0	3,9

Tabela 3 – Valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ e ΔH para o sistema PEG_{35k}/DODAB (vesícula não sonicada) para diferentes razões R = PEG/DODAB, obtidas por DSC.

Incerteza nas medidas: $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

R	T_m ($^\circ\text{C}$)	$\Delta T_{1/2}$ ($^\circ\text{C}$)	ΔH (kcal/mol)
0	45,0	1,0	8,3
0,5	43,5	1,3	11,7
1,0	47,6	1,3	4,4
2,0	46,3	1,0	2,7
4,0	46,7	1,5	3,8
6,0	46,5	1,3	3,6

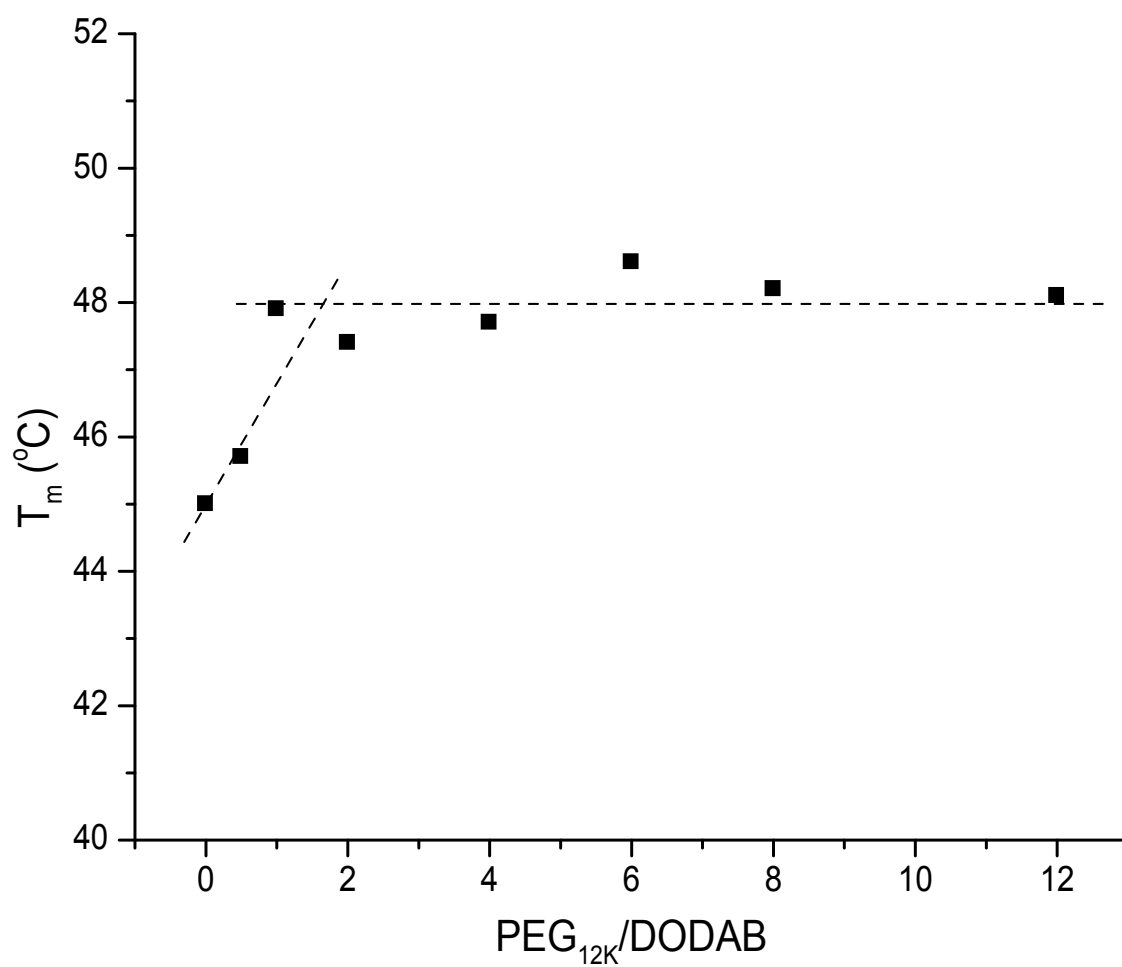


Figura 22 – Temperatura de transição (T_m), obtida por DSC, em função da razão de concentração molar $R = PEG_{12K}/DODAB$, para amostra não sonicada.

Resultados de calorimetria por titulação isotérmica (ITC)

As medidas de ITC foram realizadas por titulação de uma dispersão aquosa não sonicada de DODAB 1,0 mM e do solvente (água) por uma solução estoque 14,5 mM de PEG_{12K}, a 25°C e a 50°C.

A Figura 23 mostra uma curva típica do calor de interação de PEG_{12K} com vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, correspondente a cada adição de alíquotas da solução de PEG 14,5 mM, em intervalos de 10 min., obtidas a 25 °C, indicando uma seqüência de picos endotérmicos cujas áreas são proporcionais à entalpia de interação das moléculas de PEG com as vesículas de DODAB. Uma curva similar foi obtida para o mesmo sistema a 50°C (resultado não mostrado). A energia (entalpia) de interação PEG-DODAB e PEG-água, obtidas dos termogramas a 25 e 50°C, respectivamente, em função da concentração de PEG, é mostrado nas Figura 24 e 25.

A entalpia de interação de PEG com as vesículas de DODAB foi calculada pela diferença entre as entalpias de interação de PEG com a dispersão de DODAB e da interação com a água (solvente). A 25°C, a entalpia de interação diminui com o aumento da concentração de PEG, de aproximadamente 20 kJ/mol para zero, enquanto que a 50°C, a entalpia de interação de PEG com DODAB é praticamente constante e igual a 15 kJ/mol. Esses resultados indicam que existe uma interação mais forte a 50°C (acima, portanto, da T_m de DODAB), ou seja, no estado líquido-cristalino, do que a 25°C (abaixo da T_m), no estado gel. Essa interação mais forte pode estar relacionada à maior hidrofobicidade de PEG a 50°C do que a 25°C, que induz uma interação maior da cadeia do polímero com a região da bicamada das vesículas, que é facilitada pelo estado mais flexível das cadeias do polímero e das vesículas nesta temperatura.

A diminuição da entalpia de interação, observada a 25°C, indica possivelmente que um número cada vez menor do polímero interage com a região da bicamada das vesículas.

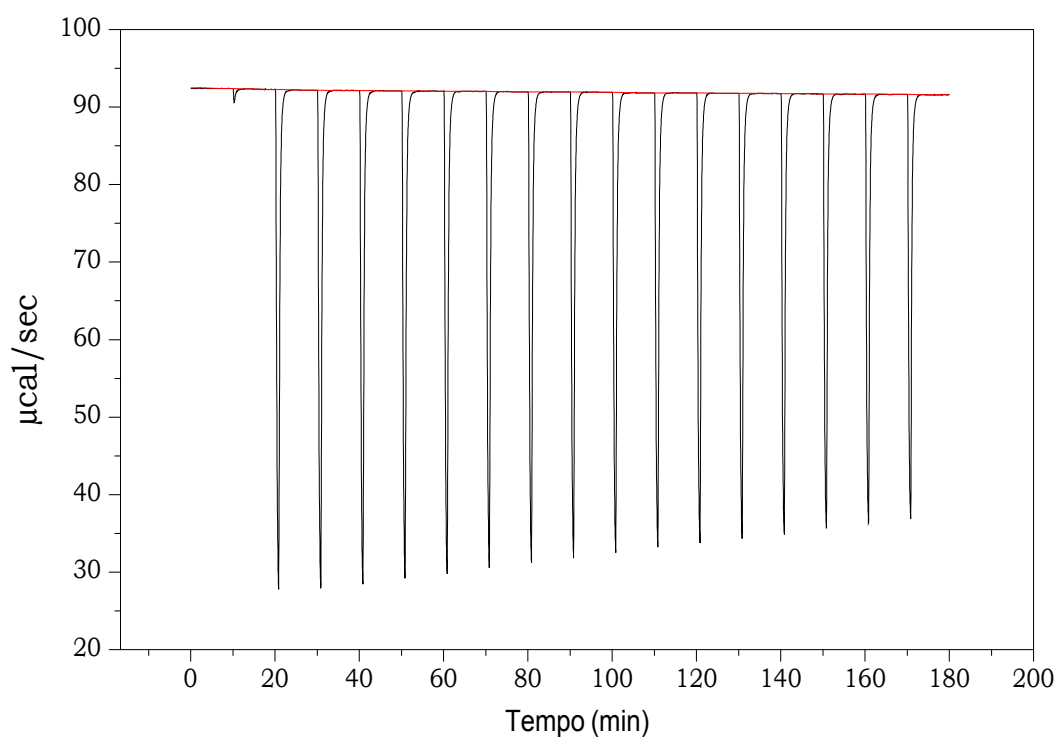


Figura 23 – Calor de interação (25°C) de PEG_{12K} com vesículas (não sonicadas) de DODAB 1,0 mM.

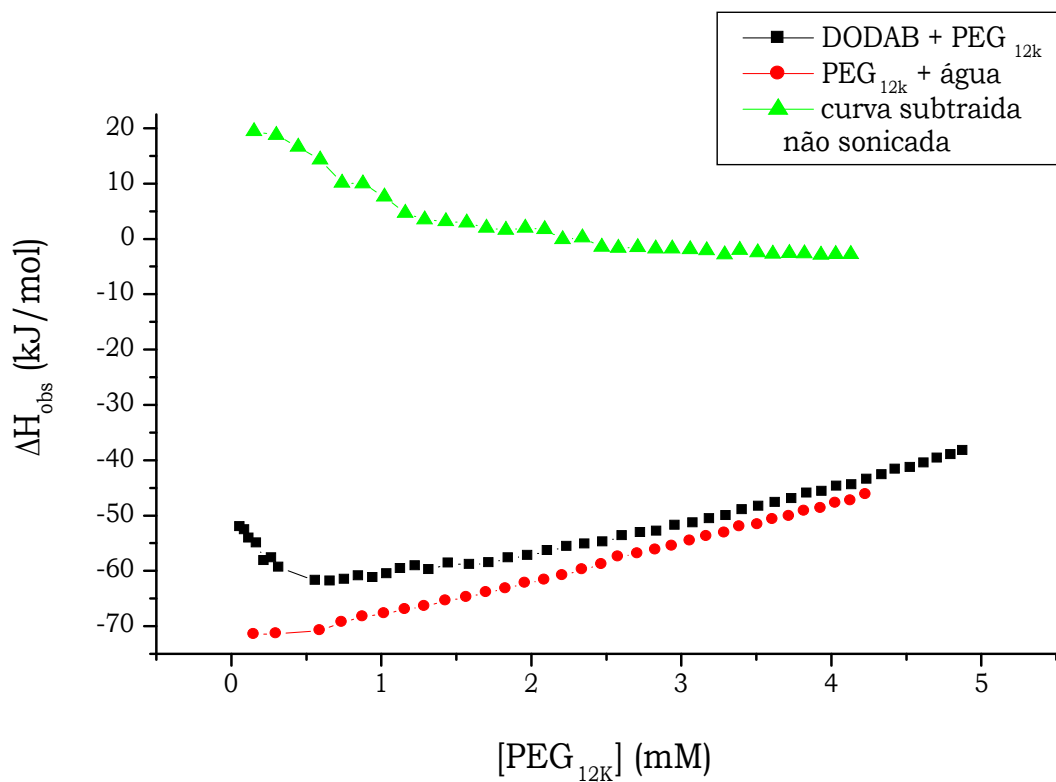


Figura 24 – Variação da entalpia medida em função de PEG_{12K} adicionado a solução de DODAB 1,0 mM (25°C, < T_M).

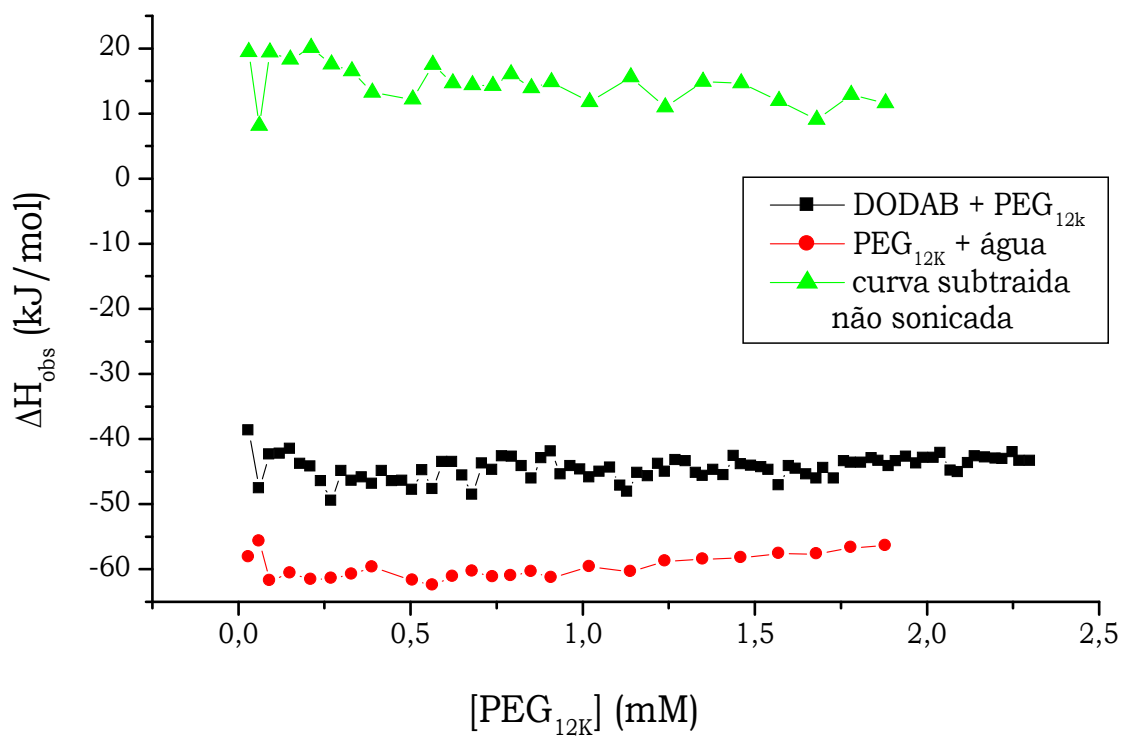


Figura 25 – Variação da entalpia medida em função de $\text{PEG}_{12\text{K}}$ adicionado a solução de DODAB 1,0 mM (50°C , $>T_M$).

Diagramas ternários de fases

Com o objetivo de identificar a região de fase isotrópica vesicular (ISO), construímos diagramas de fases ternários parciais (triângulo de Gibbs) até a concentração de água de 99% p/p, para os sistemas DDAB/PEG/água e DODAB/PEG/água, para o polímero com massa molecular variando entre 200 Da e 2 MDa. As seguintes fases foram identificadas nesses diagramas, conforme apresentadas nas Figuras 26 e 27:

- Fase isotrópica (ISO), contendo vesículas em solução.
- Fase isotrópica birrefringente por fluxo (ISO'), contendo vesículas e estruturas lamelares em solução.
- Fase birrefringente (D_1), contendo estruturas lamelares.
- Fase isotrópica não birrefringente, constituída de vesículas multilamelares (ISO").
- Fase não isotrópica e não birrefringente, constituída de agregados (AG).

As Figuras 26 e 27 também são mostradas nas Figuras 28 e 35, juntamente com os diagramas de fases correspondentes aos PEG com massas moleculares de 200 Da, 12 kDa, 35 kDa, 100 kDa.

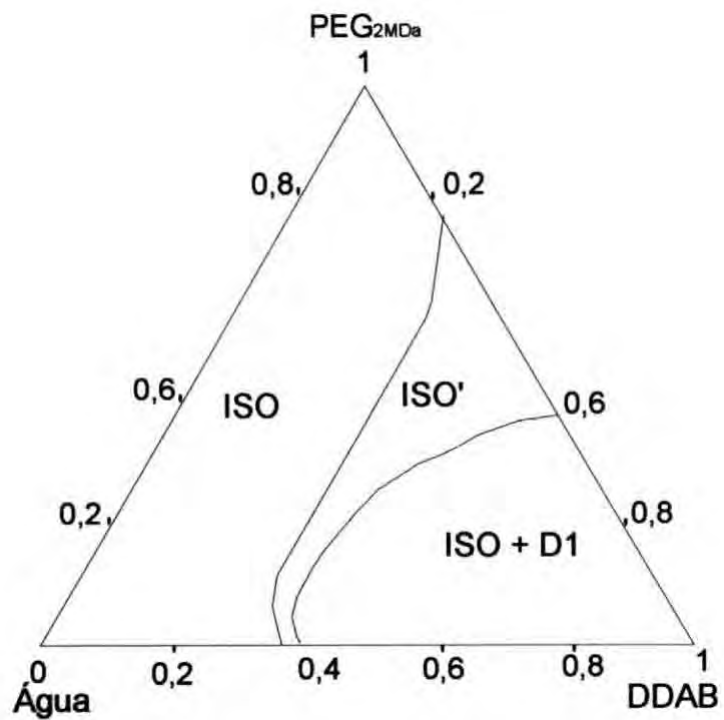


Figura 26 – Diagrama ternário de fases do sistema PEG/DDAB/água, para o PEG com massa molecular de 2 MDa, 25°C.

Notação: ISO, Isotrópica contendo vesículas em solução; ISO', isotrópica birrefringente por fluxo contendo vesículas e estruturas lamelares em solução; D₁, birrefringente contendo estruturas lamelares.

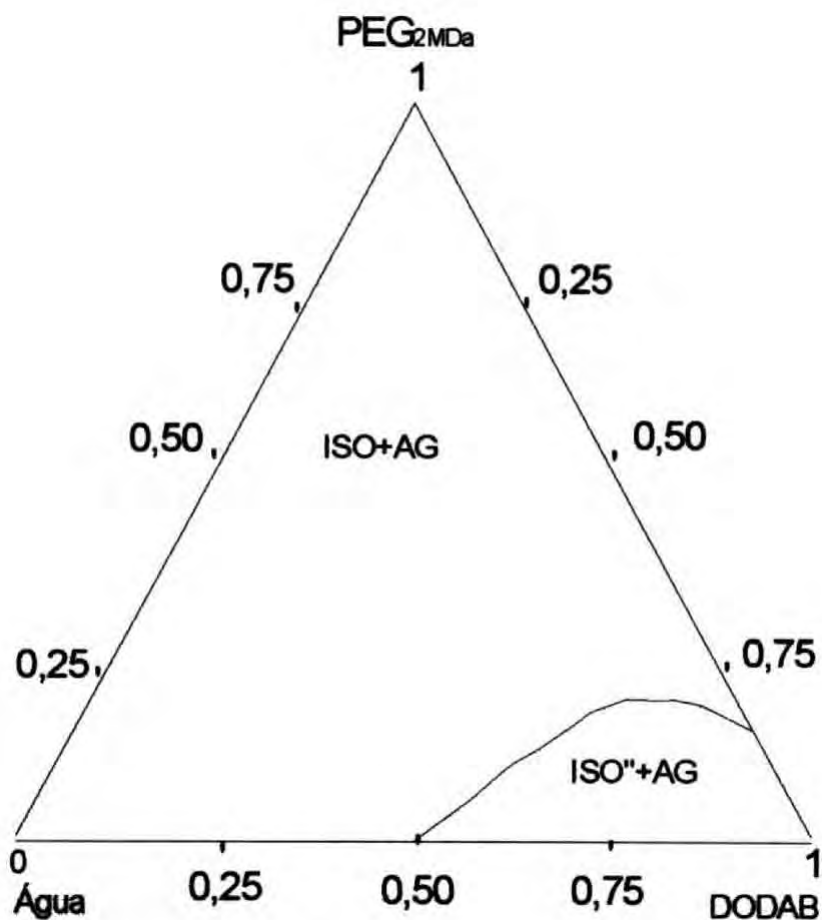


Figura 27 – Diagrama ternário de fases do sistema PEG/DODAB/água, para o PEG com massa molecular de 2 MDa, 25°C.

Notação: ISO', isotrópica birrefringente por fluxo contendo estruturas uni e multilamelares; ISO'', isotrópica não birrefringente, contendo vesículas multilamelares (leitosa); AG, fase não isotrópica e não birrefringente, constituída de agregados.

Sistema PEG /DDAB/água

Diagramas de fases dos sistemas PEG /DDAB/água

A Figura 28 mostra os diagramas ternários de fases dos sistemas PEG/DDAB/água, a 25°C, para PEG com massa molecular variando de 200 Da a 2 MDa, e concentração máxima de surfactantes de 1,0% p/p, ou seja, 99% p/p de água. Pode-se observar, nesses diagramas, três regiões distintas:

(a) fase isotrópica (ISO) consistindo de estruturas de vesículas predominantemente unilamelares, de cor azulada e não birrefringente ocupando de 47,5 a 59,1 % da área total do diagrama de fases, dependendo da massa molecular do PEG 200Da a 2MDa;

(b) fase intermediária, também isotrópica (ISO'), porém com característica de birrefringência por fluxo da amostra. Esta fase consiste da mistura de vesículas uni e multilamelares, com a tendência de formação de fases lamelas sob agitação mecânica; e

(c) a terceira região do diagrama consiste de duas fases, uma isotrópica e a outra birrefringente característica de fase lamelar (ISO + D₁). Essa fase é semelhante à de DDAB 1,0 % em água descrita na literatura (MARQUES *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 1999). Observa-se que no sistema binário DDAB-água, a transição da fase ISO para a ISO + D₁ ocorre em torno de 0,4% de DDAB, e os sistemas ternários DDAB/PEG_{12K}/água essas fases são estendidas, possibilitando a formação de vesículas com diferentes frações de polímero e surfactante. Observa-se também que a fase ISO' afunila quando a quantidade de surfactante e polímero diminuem.

A Tabela 4 resume as áreas das fases isotrópicas vesiculares (ISO) nos diagramas para as diferentes massas moleculares de PEG. As amostras nas três regiões ficaram em repouso por meses à temperatura ambiente para garantia de equilíbrio da mistura. Além disso, uma vez preparadas, à temperatura ambiente e resfriadas a 5°C, ou seja, abaixo da T_m do sistema, as amostras se desestabilizaram, com o surgimento de cristais hidratados. É importante observar que a fase das vesículas (ISO) ocupa cerca de 50-60% da área total do diagrama, independentemente da massa molecular do PEG. Esses diagramas de fases estão de acordo com o reportado na literatura para o sistema DDAB/PEG_{600Da}/água (CARIA,

REGEV & KHAN, 1998). Neste trabalho, os autores mostraram que a fase de vesículas (ISO) se estende até aproximadamente 22% em peso de PEG. Além disso, a fase vesicular é bem menor do que a encontrada por nós. Outra diferença observada é que, no diagrama de fases de Caria e cols., a fase vesicular não se estende até o região binária DDAB/água, o que não pode ser verdade, pois sabemos que o sistema DDAB/água forma vesículas em excesso de água (MARQUES *et al.*, 1999). Essa diferença nos diagramas de fases do nosso trabalho e de Caria e cols., não pode ser devido à massa molecular o PEG, pois, conforme vimos, PEG altera muito pouco (Figura 28) o diagrama de fases, mas, provavelmente, devido ao tempo de equilíbrio que se mantém a amostra. Esse tempo de equilíbrio pode variar de amostra para amostra. Em nossos estudos, as amostras foram deixadas em repouso por meses, sob observação freqüente.

Tabela 4 – Área das fases ISO, ISO' e ISO + D₁ nos diagramas ternários de fases do sistema DDAB/PEG/água.

Polímero	Área ocupada pelas fases (%)		
	ISO	ISO'	ISO + D ₁
PEG _{200Da}	59,1	4,1	36,8
PEG _{12K}	50,6	8,6	40,8
PEG _{35K}	58,0	9,6	32,4
PEG _{100K}	47,5	16,8	35,7
PEG _{2MDa}	51,0	15,7	33,3

Notação: ISO, Isotrópica contendo vesículas em solução; ISO', isotrópica birrefringente por fluxo contendo vesículas e estruturas lamelares em solução; D₁, birrefringente contendo estruturas lamelares.

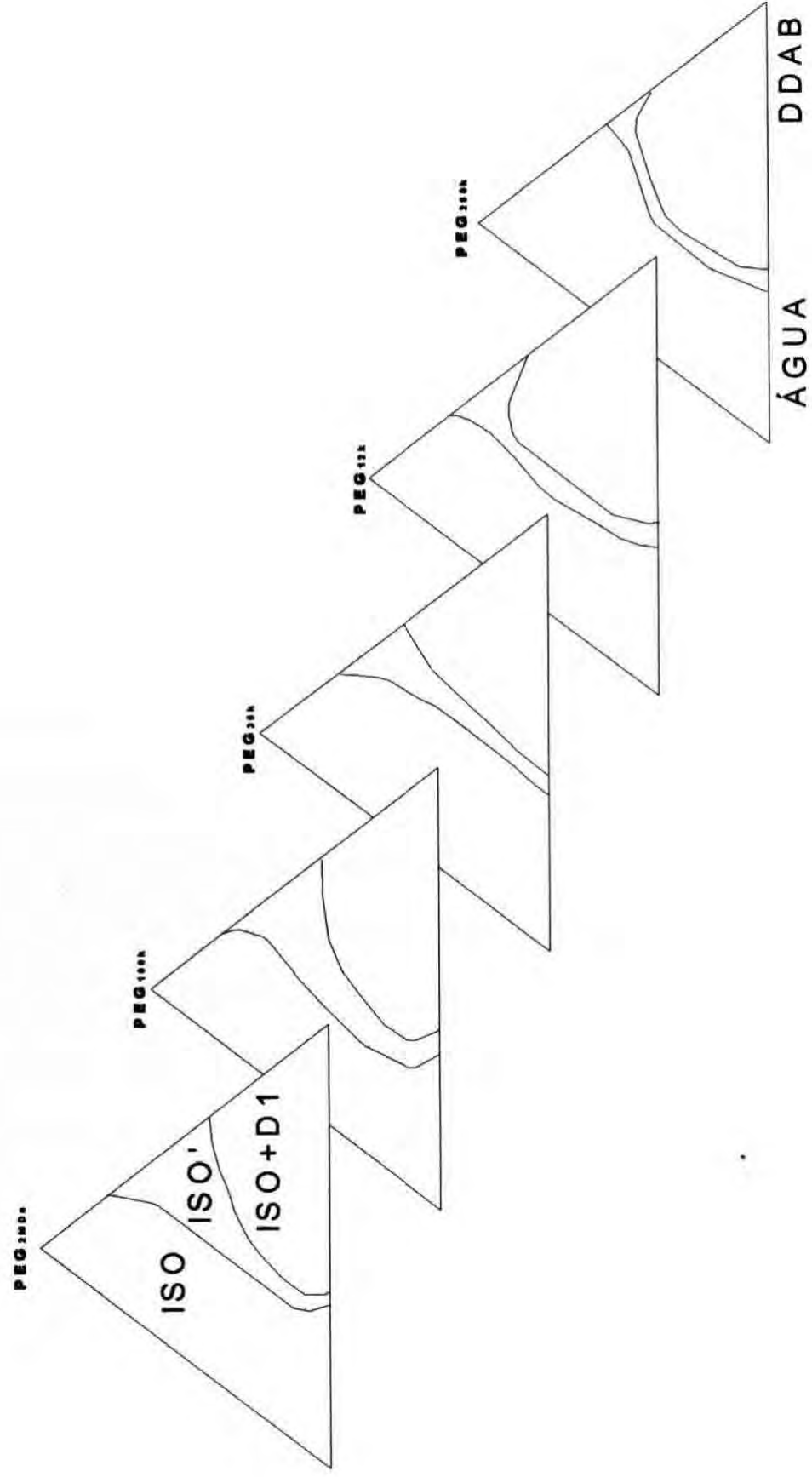


Figura 28 - Diagramas ternários de fases do sistema PEG/DDAB/água, para o PEG com massa molecular variando de 200 Da a 2 MDa, 25°C.

DSC para o sistema PEG /DDAB/água

A fim de verificar a presença de vesículas na fase ISO dos diagramas de fases dos sistemas PEG/DDAB/água, mostrados na Figura 28, realizamos medidas de DSC de uma amostra de cada diagrama, correspondente a um mesmo ponto, com a seguinte composição (p/p): 0,1%/0,1%,99,8%. Os termogramas obtidos foram comparados ao termograma do sistema binário DDAB/água, na composição (p/p) 0,1%/99,9%. Esses termogramas são mostrados nas Figuras 29 e 30, e os parâmetros T_m , $\Delta T_{1/2}$ e ΔH obtidos, estão resumidos na Tabela 5. A presença do pico de transição de fase gel-líquido cristalina em todas as amostras, indicam a presença de vesículas complexadas com PEG, cuja T_m é cerca de 1°C maior do que a T_m das vesículas de DDAB em água (sem PEG, que é igual a 14,7°C), independentemente da massa molecular do polímero, conforme também observado para os sistemas PEG/DODAB/água descritos anteriormente. Na presença de PEG, a largura do pico de transição ($\Delta T_{1/2}$) diminui aproximadamente de 50% do valor inicial, sem PEG, indicando maior cooperatividade da transição. Observamos também que a massa molecular de PEG praticamente não afeta a largura do pico, mas o aumento da entalpia de transição (ΔH) tende a estabilizar o estado gel. Com exceção de PEG 200 Da, a entalpia da transição é maior do que na ausência do polímero. Essa comparação, no entanto, fica um pouco prejudicada, pois, nesta concentração (0,1% \approx 2,2 mM), o sinal do termograma de DDAB/água é muito fraco, acarretando num erro maior no cálculo da área e, portanto, da entalpia. Surpreendentemente, a entalpia para PEG 2MDa é muito elevada, o que não pode ser explicado pela simples variação da massa molecular do polímero.

Tabela 5 – Valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ e ΔH para o sistema PEG/DDAB/água (0,1%/0,1%/99,8%) para diferentes massas moleculares de PEG, obtidas por DSC.

PEG	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH (kcal/mol)
Sem PEG	14,7	0,9	0,024
200Da	16,1	0,4	0,016
12k	16,0	0,4	0,071
35k	16,2	0,4	0,185
100k	16,0	0,5	0,093
2MDa	15,9	0,5	0,643

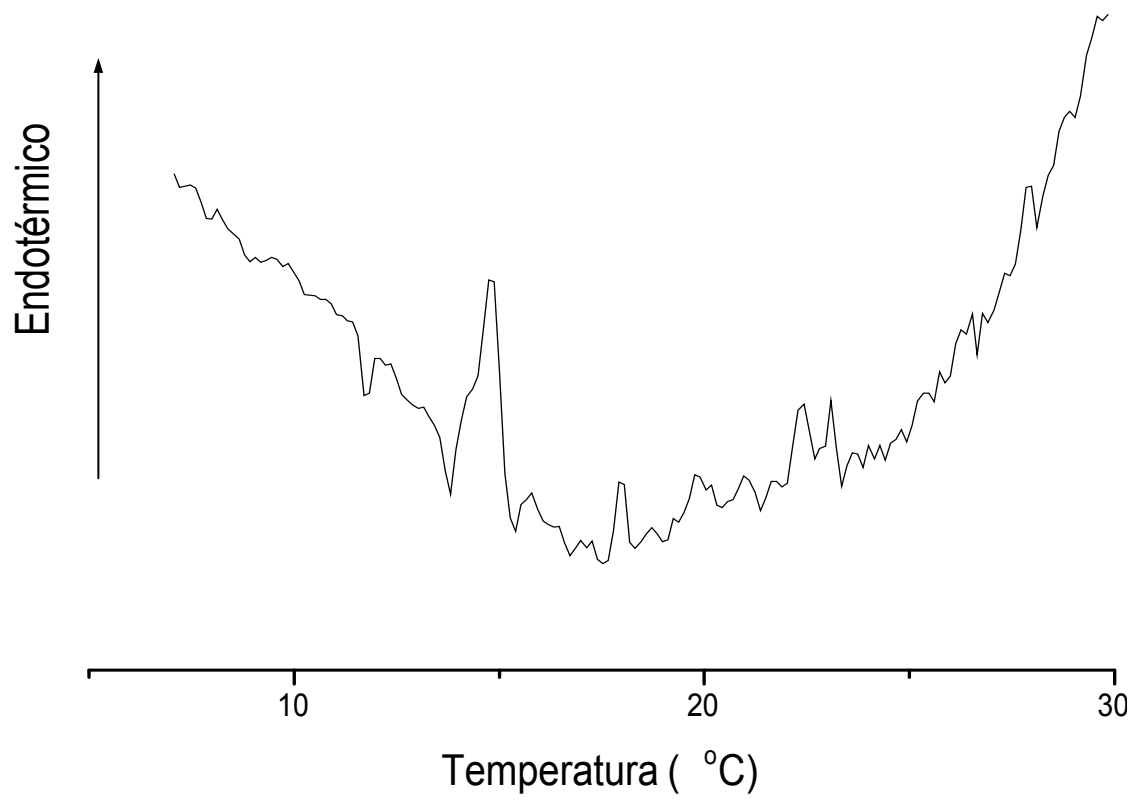


Figura 29 - Termograma DSC, obtido por aquecimento da amostra, para o sistema DDAB/água (0,1%/99,9%).

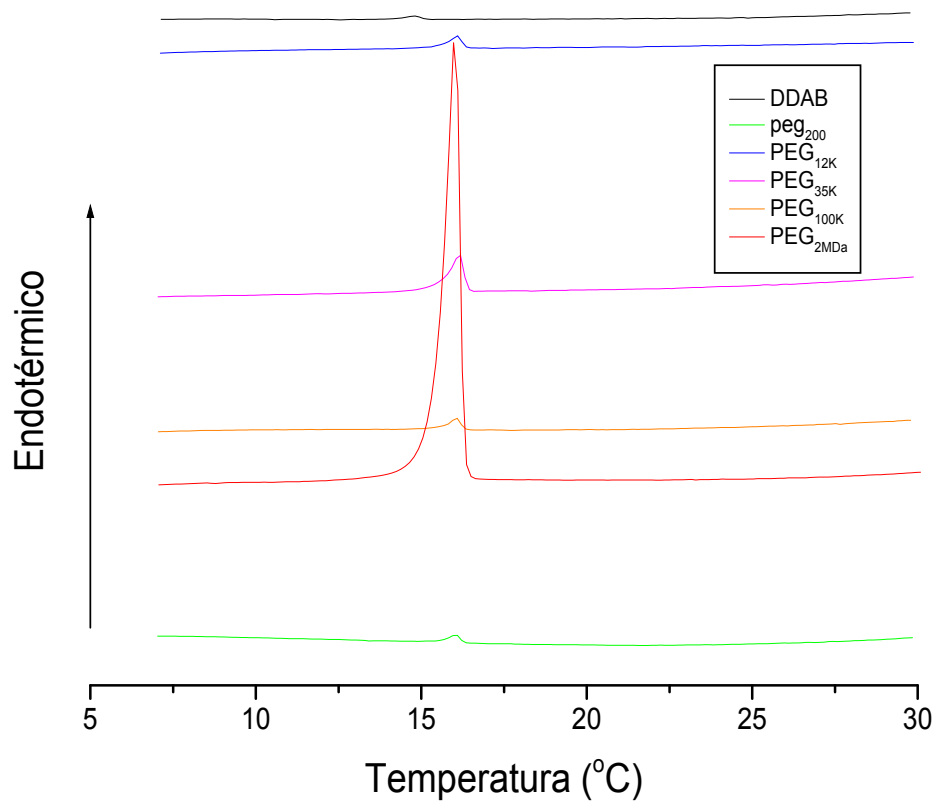


Figura 30- Termograma DSC, obtido por aquecimento das amostras, para os sistemas PEG/DDAB/água (0,1%/0,1%/99,8), para PEG_{200Da}, PEG_{12K}, PEG_{35K}, PEG_{100K} e PEG_{2MDa}

Sistema PEG /DODAB/água

Diagramas de fases dos sistemas PEG/DODAB/água

A Figura 31 mostra os diagramas ternários de fases do sistema DODAB/PEG/água, a 25°C, para o polímero (PEG) com massa molecular também variando de 200 Da a 2 MDa, e concentração máxima de surfactantes de 1,0% p/p, ou seja, 99% p/p de água. Pode-se observar nesses diagramas duas regiões distintas:

(a) fase isotrópica birrefringente por fluxo com presença de pequenas quantidades de precipitados (ISO' + AG) consistindo de estruturas uni- e multilamelares, de cor azulada, e ocupa de 80 a 98 % da área total do diagrama de fases, (dependendo da massa molecular do PEG, de 200 Da a 2 MDa). Essa fase é uma extensão da fase binária observada para o sistema DODAB/água, em excesso de água. Nota-se que na escala do diagrama não é possível observar a fase de vesículas unilamelares puras; e

(b) fase constituída de vesículas multilamelares (leitosa) juntamente com agregados (ISO'' + AG), que aumentam com a concentração de DODAB. Observa-se que no sistema binário DODAB/água, a transição da fase ISO' + AG para a fase ISO'' + AG ocorre em torno de 0,5% de DODAB, e para o sistema DODAB/PEG_{35K}/água a fase AG é mais extensa em relação aos demais sistemas.

Para este sistema, ao contrário do sistema DDAB/PEG/água, PEG não favorece a formação de vesículas unilamelares, não servindo, portanto, para esse fim.

A Tabela 6 resume os valores das áreas das fases ISO' + AG e ISO'' + AG nos diagramas, para as diferentes massas moleculares de PEG empregadas. As amostras nas duas regiões são estáveis por meses à temperatura ambiente.

Tabela 6 – Área das fases ISO' + AG e ISO''+ AG nos diagramas de fases PEG/DODAB/água.

Polímero	Área ocupada pelas fases (%)	
	ISO' + AG	ISO''+ AG
PEG _{200Da}	92,0	8,0
PEG _{12K}	96,6	3,4
PEG _{35K}	80,1	19,9
PEG _{100K}	97,6	2,4
PEG _{2MDa}	87,2	12,8

Notação: ISO', isotrópica birrefringente por fluxo contendo estruturas uni e multilamelares; ISO'', isotrópica não birrefringente, contendo vesículas multilamelares (leitosa); AG, fase não isotrópica e não birrefringente, constituída de agregados.

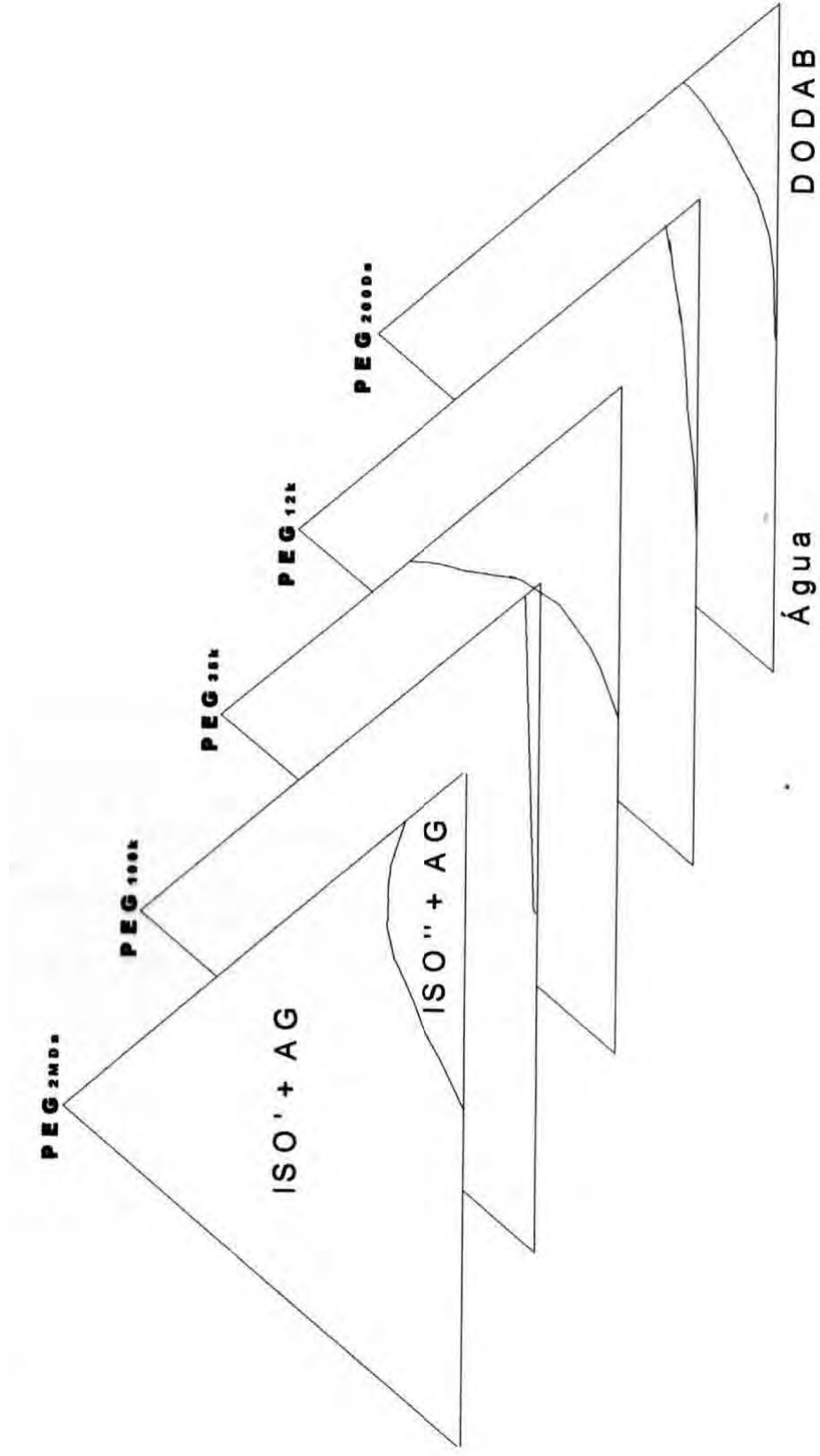


Figura 31 - Diagramas ternários de fases do sistema PEG/DODAB/água, para PEG com massa molecular variando de 200 Da a 20000 Da, 25°C.

Atividade Bactericida dos sistemas DODAB/água e DODAB/PEG/água

Utilizamos o Método da Diluição de Uso e Cilindros Carreadores (BELOIAN, 1990) para a avaliação da atividade bactericida dos seguintes sistemas DODAB, PEG_{200Da}/DODAB e PEG_{2MDa}/DODAB, para 1 mM do surfactante em água, sonicado e não-sonicado, empregando os seguintes microrganismos testes: *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O cultivo foi realizado após o contato do microrganismo teste com o desinfetante, seguido da verificação de microrganismos sobreviventes.

O resultado pode ser descrito como: presença de crescimento bacteriano ou Ausência de crescimento bacteriano, sendo que, para o desinfetante ser considerado satisfatório, deve ser capaz de matar os microrganismos testes sobre 59 a 60 cilindros utilizados, de um total de 60, o que confere um nível de confiança de 95% (BELOIAN, 1990).

Em nosso estudo, nenhuma das amostras analisadas apresentou atividade bactericida satisfatória para os microrganismos de referência (microrganismos teste), quando utilizadas na forma pura, em 10 minutos de contato.

O comportamento diferenciado do registrado na literatura (CAMPANHÂ, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1999; MARTINS, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1997) pode ser justificado pela diferença dos métodos empregados na avaliação da atividade bactericida, pois o método oficial (ROMÃO *et al.*, 1999; BELOIAN, 1990) é muito rigoroso em relação ao tempo de contato (10 minutos) enquanto que o descrito na literatura varia de 1 a 5 horas (CAMPANHÂ, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1999; MARTINS, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1997). O resultado obtido pelo método oficial (BELOIAN, 1990) refere-se ao crescimento ou não de bactérias, observado pela turvação do meio de cultura em 10 minutos de contato, enquanto que os ensaios descritos na literatura (CAMPANHÂ, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1999; MARTINS, MAMIZUKA & CARMONA-RIBEIRO, 1997) referem-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em água, após o tratamento de uma quantidade conhecida de bactérias ($2,5 \times 10^7$ bactéria/mL) com solução aquosa de DODAB de concentração entre 5 e 50 μM e tempo de exposição de 1 a 5 horas.

O rigor do método a que foram submetidos os sistemas testados é justificado, uma vez que a redução microbiana deve ser em níveis legalmente aceitáveis, para

que sejam conferidas atribuições de prevenção da infecção hospitalar, como um benefício para a saúde pública (ROMÃO *et al.*, 2005; HERRUZO-CABRERA; VIZCAINO-ALCAIDE & FERNÁNDEZ-ACEÑERO, 2004; McDONNELL & RUSSELL, 1999).

Em nosso estudo foi testada a atividade antibacteriana das vesículas de DODAB 1 mM, sonicada e não sonicada, na presença e na ausência de PEG_{200Da} e PEG_{2MDa}, (1% p/p) utilizando o método dos cilindros carreadores (BILOIAN, 1990), que é o método oficial para a classificação legal da categoria e aplicação do surfactante como desinfetante. Como os testes não revelaram atividade bactericida para os microrganismos de referência (*Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*), quando utilizadas na forma pura, ou seja, 10 mL da solução aquosa de DODAB 1 mM e 10 mL de DODAB 1 mM com 1% p/p de PEG_{200Da} ou PEG_{2MDa} em 10 minutos de contato, tais sistemas não poderiam, de acordo com nossos estudos, ser classificados como eficazes, por exemplo, para uso hospitalar (ROMÃO *et al.*, 2005).

Conclusões

De acordo com o observado por Benatti *et al.* (1999), os termogramas DSC para dispersões não sonicadas de DODAB 1,0 mM apresentam um único pico bem definido em 45,3 °C (T_m), que pode ser traduzido como comportamento de transição cooperativa de fase gel-líquido cristalino das cadeias do surfactante, resultado este de acordo com os obtidos por nós ($T_m = 45$ °C), para os sistemas DODAB e DODAB/PEG em solução aquosa.

Com a adição de PEG observamos um aumento da T_m até um valor limite, sendo que os picos tendem a se alargar com relação ao obtido para DODAB 1 mM não sonicado, indicativo de menor cooperatividade da transição resultado da interação das vesículas de DODAB com PEG. Alternativamente, medidas de fluorescência da sonda DPB em vesícula não-sonicada de DODAB 1,0 mM revelaram que a intensidade de fluorescência diminui com o aumento da concentração de PEG adicionado, confirmando também a interação de PEG com as vesículas de DODAB. Lembramos que um comportamento oposto foi observado para o efeito de surfactante derivado de PEG, p.ex., C₁₂E₈, que diminui a T_m de DODAB (BARRELEIRO *et al.*, 2002.), sugerindo que PEG e C₁₂E₈ interagem de

modo diferente com as vesículas de DODAB. Alguns surfactantes catiônicos monoalquilados, por exemplo, o brometo de octadeciltrimetilamônio (OTAB), têm o potencial de aumentar a T_m de DODAB (BLANDAMER, *et al.*, 1998), apesar de PEG e OTAB aumentarem a T_m de DODAB, o efeito de OTAB é muito mais intenso, mas o resultado final é de estabilizar a fase gel, tornando as caudas mais distendidas.

A interação polímero-surfactante altera as características micro e macroscópicas do sistema, uma vez que o efeito do PEG é de aumentar a T_m de DODAB, e sendo o PEG um polímero hidrossolúvel, provavelmente interage com a região da superfície das vesículas e não com o interior da bicamada, estabilizando a fase gel das caudas de DODAB no interior da bicamadas das vesículas.

De acordo com as medidas de turbidez, o tamanho das vesículas, ou complexos vesiculares de PEG/DODAB, varia muito pouco e lentamente com a adição do PEG, pois, de acordo com Feitosa, Barreleiro e Olofsson (2000), vesículas de DODAB 1,0 mM, preparadas espontaneamente, são grandes e unilamelares, de modo que a variação de tamanho dos complexos provavelmente se deve a um processo de agregação das vesículas e mudança estrutural.

Com relação ao comportamento evidenciado no diagrama de fases dos sistemas DODAB/PEG/água, podemos destacar que há predominância da fase isotrópica, birrefringente por fluxo, constituída de estruturas vesiculares uni e multilamelares, e os agregados aumentam com a concentração de DODAB, até ocorrer floculação. Na escala do diagrama, não é possível identificar as vesículas estáveis que só acontecem na região muito diluída de quase 100% de água. De acordo com os diagramas de fases, PEG, no entanto, estabiliza as vesículas de DDAB, cuja região de vesículas nos diagramas de fases ocupam de 50 a 60% da área total dos digramas, mas forma agregados com DODAB. Esse fenômeno não é muito bem entendido, mas indica a importância do comprimento das caudas do surfactante na formação de vesículas estáveis. A presença de vesículas na região ISO do diagrama de fases de DDAB/PEG/água foi confirmada por medidas de DSC de amostras coletadas dessa fase.

A atividade bactericida de DODAB, em dispersões sonicadas e não sonicadas, e na ausência e presença de PEG, não foi detectada pelo sistema analisado, provavelmente devido ao rigor e sensibilidade do método oficial empregado, quando comparado aos sistemas relatados na literatura, uma vez que o meio líquido, como o utilizado no método oficial, dá condições para as bactérias se multiplicar e provocar turvação, o que é facilmente visualizado. Além disso, o meio líquido permite a recuperação de células injuriadas pela ação do surfactante. Portanto, se uma única célula for recuperada, a amostra testada será considerada sem atividade bactericida para os microrganismos de referência, enquanto que o meio sólido, descrito por alguns autores, pode não permitir o crescimento de bactérias estressadas pela interação com o surfactante. Neste sentido, propomos um estudo comparativo mais detalhado entre a metodologia empregada por alguns pesquisadores e o método oficial em diferentes concentrações do surfactante, utilizado nesta tese.

REFERÊNCIAS

- ALARGOVA, R. G.; KOCHIASHKY, I. I.; STERRA, M. L.; ZANA, R. - Micelle aggregation numbers of surfactants in aqueous solutions: a comparison between the results from steady-state and timeresolved fluorescence quenching. *Langmuir*,14(19):5412-18, 1998.
- ALLEN, M. T.;MIOLA, L.; WHITTEN, D. G. - Host-guest interactions: a fluorescence investigation of the solubilization of diphenylpolyene solute molecules in lipid bilayers. *Journal of the American Chemical Society*.,110: 3198-3206,1988.
- ALLEN, M. T.; MIOLA, L.; SHIN, D.M.; SUDDABY, B. R.; WHITTEN, D. G- Solubilization sites in phospholipid bilayers: studies with photochemically reactive probes, *Journal of Membrane Science*,33: 201-19,1987
- ALMEIDA, N. L.; OLIVEIRA, C. L. P.; TORRIANI, I. L.; LOH, W. - Calorimetric and structural investigation of the interaction of lysozyme and bovine serum albumin with poly(ethylene oxide) and its copolymers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (38):67-76, 2004.
- AOKI, H.; KODAMA, M. – Calorimetric investigation of the behavior of interlamellar water in phospholipid-water systems, *Thermochimica Acta*.308:77-83, 1998
- ATKINS, P. W. - **Físico-Química - Fundamentos**, LTC, Rio de Janeiro, 3 ed.,2003, 476p.
- BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G. FEITOSA, E - Vesicles-to-micelle transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and dioctadecyldimethylammonium chloride dispersions induced by octaethylene glycol n-dodecyl monoether.an isothermal titration calorimetry study. *Programme Colloid Polymer Science*, 116:33-6, 2000.
- BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G.; BROWN, W.; EDWARDS, K.; BONASSI, N. M.; FEITOSA, E. - Interaction of octaethylene glycol *n*-dodecyl monoether with dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles. *Langmuir*, 18 (4):1024-9, 2002.

BLANDAMERA, M. J.; BRIGGSA, B.; CULLISA, P. M.; IRLAMA, K. D.; KIRBYA, S. D.; ENGBERTSB, J. B. F. N. - Formation of vesicular bilayers in aqueous solutions containing mixtures of dialkyldimethylammonium bromides, *Journal of Molecular Liquids*, 75 (2): 181- 7, 1998.

BELOIAN, A. - Disinfectants In: **Official methods of analysis**. !5 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990, cap.6.

BENATTI, C. R.; FEITOSA, E.; FERNANDEZ, R. M.; LAMY-FREUND, M. T. - Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spin labels, *Chemistry and Physics of Lipids*, 111:93 - 104, 2001.

BENATTI, C. R.; TIERA, M. J.; FEITOSA, E.; OLOFSSON, G. - Phase behavior of synthetic amphiphile vesicle investigated by calorimetry and fluorescence methods, *Thermochimica Acta*, 328:137 - 42, 1999.

BRADLEY A. J.; DEVINE, D. V.; ANSEL, S. M. - Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly (ethylene glycol)-lipids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357(2) 185-94, 1998.

BRASIL - Portaria nº15, de 23 de agosto de 1988. Determinar que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. Estabelecer o prazo até as respectivas revalidações dos registros para que os produtos aqui abrangidos e anteriormente registrados se adequem ao novo regulamento. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, p.17041-3, 5 set 1988, Seção I.

BRITO, R. O.; MARQUES, E. F. - Neat DODAB vesicles: effect of sonication time on the phase transition thermodynamic parameters and its relation with incomplete chain freezing, *Chemistry and Physics of Lipids*, 137: 18-28,2005.

CAMPANHÃ, M. T. N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. - Interaction between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bacterial action, *Journal of Lipid Research*., 40: 1495-1500, 1999.

CARIA, A.; REGEV, O.; KHAN, A. - Surfactant-polymer interactions: phase diagram and fusion of vesicle in the didodecyldimethylammonium bromide-poly(ethylene oxide)-water system, *Journal of Colloid and Interface Science*, 200:19-30, 1998.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. - interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72(1), 39 - 43, 2000.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CHAIMOVICH, H. - Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated. *Biochimica et Biophysica Acta*, 733;172-9, 1993.

CARVALHO, L. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. - Interactions between cationic vesicles and serum proteins. *Langmuir*, 14(21), 6077-81, 1998.

EVANS, F.D.; WENNERSTRÖM, H. - **The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet**, Wiley-VCH, Nova Iorque, 2nd.Ed., 1999, 672p.

FEITOSA, E.; JANSSON, J.; LINDMAN, B. - The effect of chain length on the phase behavior of dialquyldimethylammonium bromide vesicles in aqueous solution, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2005 (no prelo).

FEITOSA, E.; KARLSSON, G. - Dioctadecyldimethylammonium bromide vesicles prepared by the surfactant removal method. *Journal Colloid Interface Science*, 2005 (no prelo).

FEITOSA, E.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. - Unilamellar vesicles obtained by simply mixing dioctadecyldimethylammonium chloride and bromide with water. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2005 (no prelo).

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P.C. - The effect of ionic strength on the structural organization of dioctadecyldimethylammonium bromide in aqueous solution. *Colloid Polymer Science*, 128:163 - 8, 2004.

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P.C.A.; OLOFSSON, G. - Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods, *Chemistry and Physics of Lipids*, 105:201-213, 2000

FEITOSA, E.; BROWN, W. - Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide, *Langmuir* 13:4810-6, 1997.

FENDLER, J. H. - **Membrane Mimetic Chemistry**. Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1982, 522p.

FENDLER, J. H. - Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization. *Accounts of Chemical Research*. 13: 7-13, 1980.

FONTELL, K - Cubic phases in surfactant and surfactant-like lipid systems, *Colloidal Polymer Science.*, 268: 264 - 85, 1990.

GODDARD, E. D.,; ANANTHAPADMANABHAN, K. P. - **Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins**. CRC Press, Boca Raton, 1993, 427p.

GOODWIN, J. - **Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers: an Introduction**, John Wiley: Nova Iorque, 2004, 296p.

HEERKLOTZ, H. H.; BINDNER, H.; EPAND, R. M. - A "Release" protocol for isothermal titration calorimetry, *Biophysical Journal*, 76:2606-13, 1999.

HERRUZO - CABRERA, R.; VIZCAINO - ALCAIDE, M. J.; FERNÁNDEZ - ACEÑERO, M. J. - The influence of laboratory adaptation on test strains, such as *Pseudomonas aeruginosa*, in the evaluation of the antimicrobial efficacy of ortho-phthalaldehyde, *Journal of Hospital Infection*, 57 :217-22, 2004.

HIEMENZ, P. C. RAJAGOPALAN, R. - **Principles of Colloids and Surface Chemistry**, Marcel Dekker Inc., Nova Iorque, 1997, 650p.

HIEMENZ, P. C. - **Polymer Chemistry: The Basic Concepts**, Marcel Dekker inc., 1984, 752p.

ISRAELACHVILI, J. – The different faces of poly(ethylene glycol), *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 94:8378-9, 1997.

JOHNSSON, M.; EDWARDS, K. – Phase behaviour and aggregate structure in dioleoylphosphatylethanoamin and poly (ethylene glycol)-lipids, *Biophysical Journal* 80 (1): 313-23, 2001.

JÖNSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, B.; KRONBERG, B. - **Surfactants and Polymers in aqueous Solutions**, John Wiley: Nova lorque, 1998, 438p.

JUNGERMANN, E. - **Cationic Surfactants**, Marcel Dekker Inc., Nova lorque, 1970.

KALYANASUNDARAM, K. - **Photochemistry in Microheterogeneous Systems**. Academic Press, Orlando, 1987, 388p.

KANO, K; ROMERO, A.DGERMOUNI, B.; ACHE, H. J.; FENDER, J. H.- Characterization of surfactant vesicles as membrane mimetic agents. 2. temperature-dependent changes of the turbidity, viscosity, fluorescence polarization of 2-methylanthracene, and positron annihilation in sonicated dioctadecyldimethylammonium chloride. *Journal of the American Chemical Society*, 101(18): 4030-7, 1979.

KEYS, K. B.; ANDREOPOULOS, F.M.; PEPPAS, N. A. - Poly (ethylene glycol) star polymer hydrogels, *Macromolecules*, 31(23): 8149-56, 1998.

KODAMA, M.; MIYATA, T.- Effect of Na⁺ concentrations on both size and multiplicity of multilamellar vesicles composed of negatively charged phospholipid as revealed by differential scanning calorimetry and electron microscopy, *Thermochimica Acta*. 267:365-72, 1995.

KODAMA, M.; INOUE, H.; TSUCHIDA, Y.- The behavior of water molecules with structural changes in phosphatidylrthanolamine assembly as studied by DSC, *Thermochimica Acta*. 266:373-84, 1995.

KODAMA, M.; TSUJII, K.; SEKI, S. - Calorimetric investigations of the stability of octadecyltrimethylammonium halide-water systems, *Journal of Physical Chemistry* 94:815-9, 1990.

KONDO, Y.; ABE, M.; OGINO, K.; UCHIYAMA, H.; TUCKER, E. E.; SCAMEHORN, J. F.; CHRISTIAN, S. D- Stability of surfactant vesicle formed from cationic

didodecyldimethylammonium bromide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (1):51-6, 1993.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y - A totally synthetic bilayer membranes – *Journal of American Chemical Society* 99(11): 3860-1, 1977.

LAKOWICZ, J. R. - **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Plenum Press, Nova Iorque, 1999, 725p.

LASIC, D. D. - The mechanism of vesicle formation, *Biochemical Journal*, 256(1):1-11, 1988.

LAUGHLIN, R.G. - **The Aqueous Phase Behavior Of Surfactants**, Academic Press, Londres, 1996, 558p.

LICHTENBERG, D.; FREIRE, E.; SCHMIDT, C.F.; BARENHOLZ, Y.; FELGNER, P.L.; THOMPSON, T.E. – Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar, *Biochemistry*, 20: 3462-7, 1981.

LIN, Z; FU-CHANG, Y. - Spontaneous vesicle formation in aqueous solutions of alkylbenzenesulfonate and a linear alkylbenzenesulfonate/nonionic surfactant mixture upon addition of divalent ions, *Journal of Colloids and Interface Science*, 184:325-7, 1996.

LINDMAN, B.; TIBERG, F.; PICULLEL, L.; OLSSON, U.; ALEXANDRIDIS, P.; WENNERSTRÖM, H. - Surfactant self-assembly structures at interfaces, in polymer solutions, and in bulk: micellar size and connectivity In: **Micelles, Microemulsions, and Monolayers: Science and Technology**, Marcel Dekker, Inc, Nova Iorque, cap.4: 101-126, 1998.

MANO, E. B; MENDES, L. C. - **Introdução a Polímeros**, Ed. Edgard Blücher, 2ªed. São Paulo, 2004, 208p.

MANO, E. B.; DIAS, M. L.; OLIVEIRA, C. M. F. – **Química Experimental de Polímeros**, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2004, 344p.

MARQUES, E.F.; KHAN, A.; LINDMAN, B. – A calorimetric study of the gel-to-liquid crystal transition in cationic surfactant vesicles, *Thermochimica Acta*, 394(1/2):31-37, 2002.

MARQUES, E.F.; REGEV, O.; KHAN, A. MIGUEL, M. G.; LINDMAN, B. - Interaction between cationic vesicles and oppositely charged polyelectrolytes-phase behavior and phase structure, *Macromolecules*, 32 (20):6626-37, 1999.

MARQUES, E.F.; REGEV, O.; KHAN, A. MIGUEL, M. G.; LINDMAN, B. - Vesicles formation and general phase behavior in the cationic mixture sds-ddab-water. the cationic-rich side. *Journal of Physical Chemistry B*, 103:8353-63, 1999.

MARQUES, E.F.; REGEV, O.; KHAN, A. MIGUEL, M. G.; LINDMAN, B. - Vesicles formation and general phase behavior in the cationic mixture sds-ddab-water. the anionic-rich side *Journal of Physical Chemistry B*, 102:6746-58, 1998.

MARQUES, E.; KHAN, A.; MIGUEL, M. G.; LINDMAN, B. - Self-assembly in mixtures of a cationic and anionic surfactant: the sodium dodecyl sulfate-didodecyltrimethylammonium bromide-water system, *The Journal of Physical Chemistry*, 97(18):4729:36, 1993.

MARTHOT, V. B. F.; BENOIST, L. – **Calorimetry and Thermal analysis of Polymers**, Hanser Gardner, Holanda, 1994, 368p.

MARTINS, L. M. S.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. - Cationic vesicles as bactericides, *Langmuir*, 13(21), 5583-87, 1997.

MARTINS, L; CARDOSO, D. - Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas do óxido de eteno, *Química.Nova*, 28(2): 264-73, 2005.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A .D. - Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1):147-179, 1999.

MIGUEL, M. da G.; BURROWS, H.D.; FORMOSINHO, S.J.; LINDMAN, B. - Fluorescence studies of polymer-surfactant association, *Journal of Structure* 563-564:89-98, 2001.

MISHIMA, K.; SATOH, K.; SUZUKI, K. – Optical birefringence of multilamellar gel phase of cholesterol / phosphatidylcholine mixtures, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 7:83-9,1996

MYERS, D. - **Surface, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**, Wiley-VCH, Nova Iorque, 1999, 501p.

NASCIMENTO, D. B.; RAPUANO, R.; LESSA, M. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.- Counterion effects on properties of cationic vesicles, *Langmuir*,14:7387-91, 1998.

OLOFSSON, G.; WANG, G. - Isothermal titration and temperature scanning calorimetric studies of polymer-surfactant systems. In: Jan C.T.Kwak editor. **Polymer-Surfactant Systems**. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., 1998. cap.8, p.317-56.

PICULELL, L.; LINDMAN, B.; KARLSTRÖM, G. - Phase behavior of polymer-surfactant systems. In: Jan C.T.Kwak editor. **Polymer-Surfactant Systems**. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., 1998. cap.3, p.64-141.

ROMÃO, C. M. C. P. A.; FARIA, Y. N.; PEREIRA, L. R.; ASENSI, M. D.- Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (5):541-8, 2005.

ROVIRA-BRU, M.; THOMPSON, D. H.; SZLEIFER, I. - Size and spontaneously forming liposome in lipid/PEG-lipid mixtures, *Biophysical Journal*, 83(5): 2419-39, 2002.

SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G.; CUCCOVIA, I. M. - Estrutura e propriedades físico-químicas de lipossomas, *Infarma*,7(1/2):4 -7,1998.

SLADE, P. E. - **Polymer Molecular Weights (Techniques and Methods of Polymer Evaluation)**, Marcel Dekker, 1975, 304p.

SHINODA. K. - **Solvent Properties of Surfactant Solution** Marcel Dekker, Nova Iorque, 1967, 365p.

SILVA, R. C.; LOH, W.; OLOFSSON, G. - Calorimetric investigation of temperature effect on the interaction between poly(ethylene oxide) and sodiumdodecylsulfate in water, *Thermochimica Acta*, 417:295-300, 2004.

SOLTERO, J. F. A.; BAUTISTA, F.; PECINA, E.; PUIG, J. E.; MANERO, O.; PROVERBIO, Z.; SCHULZ, P. C. - Rheological behavior in the dididecyldimethylammonium bromide/water system, *Colloid Polymer Science*, 278:37-47,2000.

SORAI, M. - **Comprehensive Handbook of Calorimetry and Thermal Analysis**, John Wiley& Sons, Inglaterra, 2004, 556p.

TEXTER, J. - Characterization of surfactants. In: Lange K. R. **Surfactant: A Pratical Handbook**. Cincinatti:Hanser,1999. p.1-66.

TIPLER, P. A. – **Física: Mecânica, Oscilações e ondas, Termodinâmica**. 4.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, cap.19-21, p. 527-605.

TSONG, T. Y. – Kinetics of the crystalline-liquid crystalline phase transition of dimyristoyl l- α -lecithin bilayers, *Proceedings of the National Academy of. Sciences. USA*, 71(7):2684-8,1974.

VALEUR, B. - **Molecular Fluorescence: Principles and Aplications**, Wiley-VCH, Weinheim, 2001, 250p.

WENNERSTRÖM, H. - Surfactant self-assembly structures at interfaces, in polymer solutions, and in bulk: micellar size and connectivity In: **Micelles, Microemulsions, and Monolayers: Science and Tecnology**, Marcel Dekker, Inc, Nova Iorque, cap.4: 101-26, 1998.

WINTERHALTER, M.; BURNER, H.; MARZINKA, S.; BENZ, R.; KASIANOWICZ, J. J. - Interaction of poly (ethylene-glycols) with air-water interfaces and lipid monolayers: investigations on surface pressure and surface potential, *Biophysical Journal*, 69:1372-81, 1995

ZANA, R. - Dimeric and oligomeric surfactants. Behavior at interfaces and in aqueous solution: a review, *Advances in Colloid and Interface Science*, 97:205-53, 2002.