

IBILCE – Instituto de Ciências, Letras e Ciências Exatas

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

TRANSIÇÃO VESÍCULA-MICELA EM MISTURAS DE DISPERSÕES DE VESÍCULAS COM SOLUÇÕES DE MICELAS

Norma Miriã Bonassi

Orientador: **Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa**

Tese de Doutorado de Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, do departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp de São José do Rio Preto.

28/04/2003

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de solubilização da membrana biológica por surfactante na extração e purificação de proteínas de membranas.⁴

Figura 2 – Estrutura molecular de $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS.

Figura 3 – (a) Representação esquemática de uma micela aniônica esférica e (b) mudanças na forma e estrutura micelar com aumento da concentração de surfactante.¹⁰

Figura 4 – Modelo do mosaico fluido da membrana biológica.¹³

Figura 5 – Estrutura molecular dos surfactantes formadores de vesículas: catiônicos DDAB, DODAB e DODAC, aniônico DHP e zwitteriônico DPPC.

Figura 6 – Modelos de agregados supramoleculares de surfactantes em meio aquoso (a) bicamada, (b) vesícula e (c) micela.¹³

Figura 7 – Cadeias hidrocarbônicas de fosfatidilcolina nas conformações (a) *anti* e (b) *gauche*.²³

Figura 8 – Representação estrutural da bicamada lipídica entre a pré-transição e a transição de fase principal.²³

Figura 9 – Tamanhos relativos de vesículas unilamelares e configurações de vesículas multilamelares.^{4,23}

Figura 10 - Modelo de três estágios de transição vesícula-micela em mistura de fosfatidilcolina (PC) com surfactante: (a) vesícula de PC, (b) vesícula mista (**1**), (c) vesícula e micela mistas, (d) desintegração das vesículas mistas (**2**) e (e) micelas mistas (**3**).³⁰

Figura 11 – Imagens de cryo-TEM de mudança morfológica de dispersões vesiculares de DODAB 5,0 mM, (a) em água, (b) em solução de NaCl 20 mM (25 °C),³⁴ e (c) *i* dispersão de CTAC 10 mM e *ii* com a mistura de CTAC/DDAB, para $x_{DDAB} = 0,25$.⁶⁶ Escala bar = 100 nm.

Figura 12 – O modelo de três estágios de transição vesícula-micela em misturas de vesículas e micelas, observada pela turbidez em função da razão molar [surfactante/anfifílico].

Figura 13 – DSC de DPPC 1.0 mM (MLV) pH = 4,5 com efeito da adição da droga clorpromazine (CPZ).³⁸

Figura 14 – Diagrama de Jablonsky de processos fotofísicos e fotoquímicos.

Figura 15 - Estrutura molecular de sondas fluorescentes trans-difenilpolienos (t-Dpo).

Figura 16 – Esquema de um espectrômetro EPR.⁵³

Figura 17 – Estrutura química do marcador de spin 16-MESL.⁵⁶

Figura 18 - Espectros de EPR de 5-SASL em vesículas de DODAB em água, abaixo da T_m (45 °C) do surfactante, indicando os parâmetros de fluidez $A_{\max}$ e $A_{\min}$.⁵⁶

Figura 19 - Espectros EPR de 5-MESL, (i) abaixo 15 °C e (ii) acima 50 °C da $T_m \sim 42,7$ °C de vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM.⁵⁷

Figura 20 - Turbidez em função do Tempo após a preparação das vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em diferentes concentrações de NaCl, $\lambda = 240$ nm (a) e 400 nm (b).

Figura 21 - Turbidez de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM, em função da razão molar surfactante/DODAC, para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 (a) e 15 min. (b).

Figura 22 - Turbidez de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em função da razão molar surfactante/DODAB, para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 (a) e 15 min. (b).

Figura 23 - Turbidez, em função do comprimento de onda da radiação incidente, de vesículas espontâneas e extrudadas ($F = 0.1 \mu\text{m}$) de DODAB 1,0 e 5,0 mM.

Figura 24 - Efeito da razão molar surfactante/DODAX na turbidez de vesículas extrudadas ($F = 0.1 \mu\text{m}$) de DODAB (a) e DODAC 1,0 mM (b) para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 min.

Figura 25 - Efeito de uréia, glicose e sacarose na turbidez de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em função da razão molar para $C_{12}E_n$ /DODAB, medidas com intervalo de tempo de 5 min.

Figura 26 - Turbidez de vesículas espontâneas de dodab 1,0 mm, em solução de nacl 1,0 mm, em função da razão molar surfactante/dodab para $c_{12}e_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e hps, medidas com intervalo de tempo 5 min.

Figura 27 - Turbidez, em função do comprimento de onda da radiação incidente, de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM em água e em solução de NaCl 1,0 mM e uréia, sacarose e glicose 100 mM.

Figura 28 – Turbidez, em função do comprimento de onda, da radiação incidente, de vesículas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, para diferentes concentrações de DHP.

Figura 29 - Turbidez de vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, em função da razão molar surfactante/DHP, para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$, e 8) e HPS, medidas nos intervalos de tempo de 5 (a) e 15 min. (b).

Figura 30 – Efeito da razão molar surfactante/DHP na turbidez de vesículas extrudadas ($\lambda = 0.1 \mu\text{m}$) de DHP 1,0 mM para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 min.

Figura 31 - Turbidez de vesículas espontâneas de dppc 1,0 mM em tampão fosfato, pH = 7,4, em função da razão molar surfactante/dppc para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e hps, medidas com intervalos de tempo 5 min., e após 1 (a) e 7 (b) dias do preparo das vesículas.

Figura 32 – (a) Turbidez em função do comprimento de onda da radiação incidente, para diferentes tempos e concentração de DDAB. (b) Turbidez em função da razão molar co-surfactante/DDAB, realizadas em intervalos de 5 min. após cada mistura.

Figura 33 – Curvas DSC de aquecimento (up-scan), de vesículas espontâneas de DODAB em dispersão aquosa, em diferentes concentrações.

Figura 34 – Curvas de aquecimento e resfriamento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM, em diferentes tempos de equilíbrio antes da obtenção da curva de resfriamento, para os tempos de equilíbrio de 0,1 a 4 h.

Figura 35 – Curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água (a) e em solução de NaCl 1,0 (b), 10,0 (c) e 20,0 mM (d).

Figura 36 – Curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na presença e ausência de $C_{12}E_5$. $R = C_{12}E_5/DODAX$.

Figura 37 – As curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na presença e ausência de $C_{12}E_7$. $R = C_{12}E_7/DODAX$.

Figura 38 – Curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na presença e ausência de HPS. $R = HPS/DODAX$.

Figura 39 – Curvas de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10 mM, pH = 8,0, a diferentes concentrações DHP.

Figura 40 – Curvas de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DHP 0,6 mM em tampão HEPES 10 mM, pH = 8,0. O pico em azul representa DHP puro e em vermelho DHP com sonda 4H4A a 3,0 μ M.

Figura 41 – Curvas de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, na ausência e presença de $C_{12}E_7$. $R = C_{12}E_7/DHP$.

Figura 42 – Curva de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4.

Figura 43 – Curva de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DDAB 5,4 mM em meio aquoso.

Figura 44 – Espectros de emissão de fluorescência de DPB em vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na ausência e presença de $C_{12}E_7$ (30 °C).

Figura 45 – Rendimento quântico de fluorescência de DPB e B4A em vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, em função da razão co-surfactante/DODAX (30 °C).

Figura 46 – Anisotropia de fluorescência de DPB em vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, em função da razão co-surfactante/DODAX (30 °C).

Figura 47 – (a e c) Rendimento quântico de DPB em função de surfactante/DODAX; (b e d) Anisotropia de DPB em função de surfactantes/DODAX (30 °C).

Figura 48 – Efeito da temperatura no rendimento quântico (a) e anisotropia de fluorescência (b) de DPB 6,5 μ M em vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM em tampão fosfato pH = 7,4.

Figura 49 - Variação (a) da largura do espectral (ΔH_0) e (b) da razão b/a dos espectro RPE de 16-MESL em DODAB/água 5,0 mM e em NaCl 1,0 mM, em função da temperatura por aquecimento e resfriamento.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Formas de empacotamento possíveis de moléculas tensoativas em função do valor do parâmetro de empacotamento crítico.⁵

Tabela 2 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas espontâneas de DODAX (X = Cl⁻ e Br⁻) 1,0 mM, com C₁₂E_n (n = 5, 7 e 8) e HPS, para dois diferentes intervalos de tempo de espera entre as medidas.

Tabela 3 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas extrudadas ($F = 0.1 \mu m$) de DODAB e DODAC 1,0 mM, com C₁₂E_n (n = 5, 7 e 8) e HPS, obtidos por medidas de turbidez em intervalos de 5 min. de mistura.

Tabela 4 – Efeito de co-solutos em R_{sat} e R_{sol} de C₁₂E₈/DODAB/água em vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM obtidos por medidas de turbidez.

Tabela 5 – Valores de R_{sat} e R_{sol} de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em solução de NaCl 1,0 mM, com C₁₂E_n e HPS, obtidos por medidas de turbidez. Os valores entre parênteses são em água.

Tabela 6 – Valores de R_{sat} e R_{sol} , obtidos por medidas de turbidez, das vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em solução tampão HEPES 10,0 mM pH = 8,0, com C₁₂E_n (n = 5, 7 e 8) e HPS, para diferentes intervalos de tempo entre as medidas.

Tabela 7 – Valores de R_{sat} e R_{sol} de vesículas extrudadas ($F = 0.1 \mu m$) de DHP 1,0 mM, em solução tampão HEPES 10,0 mM pH = 8,0, com C₁₂E_n e HPS, obtidos por medidas de turbidez com intervalo de tempo de 5 min.

Tabela 8 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4, para C₁₂E_n (n = 5, 7 e 8) e HPS.

Tabela 9 – Valores de T_m , ΔH e $\Delta T_{1/2}$ de vesículas espontâneas de DODAB em diferentes concentrações.

Tabela 10 – Valores de T_m , ΔH e $\Delta T_{1/2}$ das vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em diferentes tempo de equilíbrio a 60 °C, obtidos por aquecimento (up-scan) e resfriamento (down-scan) da amostra à taxa de 60 °C/h. O sinal negativo na entalpia.

Tabela 11 – Parâmetros associados à transição de fase das vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água e em solução de NaCl.

Tabela 12 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de $C_{12}E_5$.

Tabela 13 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM na ausência e presença de $C_{12}E_5$.

Tabela 14 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de $C_{12}E_7$.

Tabela 14 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de $C_{12}E_7$.

Tabela 16 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de HPS.

Tabela 17 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM na ausência e presença de HPS.

Tabela 18 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10,0 mM pH = 8,0.

Tabela 19 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, na presença e ausência de $C_{12}E_7$.

Tabela 20 – Valores de ΔH , $\Delta T_{1/2}$ e T_m das vesículas espontâneas de DHP 0,6 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, com e sem a sonda fluorescente 4H4A 3,0 μ M, DPPC em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4, e DDAB 5,4 mM.

Tabela 21 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas espontâneas de DODAX 1,0 mM com $C_{12}E_n$ e HPS, obtidos por medidas de Φ_f (RQ) e $\langle r \rangle$ (AF) de DPB.

Tabela 22 - Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas sonificadas de DODAX 1,0 mM com $C_{12}E_n$ e HPS, obtidos por medidas de Φ_f (RQ) e $\langle r \rangle$ (AF) da sonda DPB.

Tabela 23 – T_m (°C) obtida dos espectros RPE de 16-MESL em vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água e em NaCl. Valores obtidos por aquecimento e resfriamento.

Tabela 24 – Resumo dos valores de R_{sat} e R_{sol} de DODAX, na presença de $C_{12}E_n$ (n = 5, 7 e 8) e HPS, obtidos por diferentes métodos.

SÍMBOLOS e ABREVIATURAS

DODAX	Haletos de dioctadecildimetilamônio (X = Cl- e Br-)
DDAB	Brometo de didodecildimetilamônio
PC	Fosfatidilcolina
DPPC	DL - α dipalmitoil fosfatidilcolina
DHP	Dihexadecil fosfato
SUVs	Vesículas unilamelares pequenas
LUVs	Vesículas unilamelares grandes
IUVs	Vesículas unilamelares intermediárias
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes
MLVs	Vesículas multilamelares
?	Diâmetro da vesícula
C12En	Etileno glicol n – dodecil mono éter (n = 7 e 8)
HPS	1 - 1-(N - hexadecil, N N, dimetilamônio) – propano, 3, sulfonato
t-Dpo	Ts Trans – difenilpolienos
DPB	Trans, trans - Difenil butadieno
DPH	Tr Trans, trans, trans – difenil hexatrieno
B4A	T Trans, trans – 1,4 difenil – p – carboxi propil – 1, 3 butadieno
4H4A	Trans, trans, trans – 1,6 – difenil – p, - n – butil – p – carboxi-propil-1, 3, 5 hexatrieno
16-MESL	Metil éster do ácido esteárico
CMC	Concentração crítica micelar
RX	R = cadeia hidrocarbônica e X = cabeça polar (região hidrofílica)
DSC	Microcalorimetria diferencial de varredura
Cp	Capacidade calorífica
Tm	Temperatura de transição de fase
?T1/2	Meia largura do pico
?H	Variação de entalpia
Rsat	Razão molar de saturação
R_{sol}	Razão molar de solubilidade

UV – Vís	Região do ultra – violeta e visível
ϵ	Absortividade molar
t	Turbidez
F_f	Rendimento quântico de fluorescência (RQ)
I_f	Intensidade de fluorescência
$\langle r \rangle$	Anisotropia de fluorescência (AF)
$l_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
$A_{\text{máx}}$	Comprimento máximo do desdobramento hiperfino
$A_{\text{mín}}$	Comprimento mínimo do desdobramento hiperfino
$?H_o$	2ª hiperfina, corresponde ao campo médio central
b/a	Razão das amplitudes a e b da 1ª hiperfina

Resumo

Utilizamos as técnicas de espectrofotometria UV-visível (turbidez), a calorimetria diferencial de varredura (DSC), fluorescência de estado estacionário e ressonância paramagnética eletrônica (EPR), a fim de investigar mudanças estruturais em vesículas de anfifílicos sintéticos catiônicas de brometo de didodecildimetilamônio, DDAB, e haletos de dioctadecildimetilamônio, DODAX ($X = Cl^-$ ou Br^-), aniônicas de dihexadecil fosfato, DHP, e zwitteriônicas de DL - α dipalmitoil fosfatidilcolina, DPPC, na ausência e na presença de surfactantes não-iônicos etileno glicol n - dodecil mono éter, $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8), e zwitteriônico 1 - (N – hexadecil, N N' dimetilamônio) – propano, 3, sulfonato, HPS, formadores de micelas.

Observamos que a transição vesícula-micela causada pela adição de surfactantes monoalquiladas às vesículas depende da natureza do contra-íon de DODAX ($X = Cl^-$ ou Br^-), do método de preparação das vesículas e do co-soluto. Para todos os sistemas investigados, determinamos a temperatura de transição da fase gel para líquido-cristalina (T_m) e as razões de concentrações críticas dos surfactantes na mistura, R_{sat} e R_{sol} , no processo de transição estrutural. Os resultados desse trabalho são coerentes com os reportados na literatura para sistemas análogos.

Abstract

Structural change processes in vesicular systems made up of synthetic cationic double chain amphiphiles didodecyldimethylammonium bromide, DDAB, dioctadecyldimethylammonium halide, DODAX ($X = Cl^-$ or Br^-), anionic dihexadecyl, DHP, and zwitterionic DL - α dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC, have been investigated by UV-visible (turbidity) spectroscopy, differential scanning calorimetric (DSC), steady-state fluorescence and electron paramagnetic resonance (EPR) in the absence and presence of nonionic ethylene glycol n - dodecyl monoether, $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ and 8), and zwitterionic 1-(N - hexadecyl, N N' dimethylammonium) - propane, 3, sulphonate, HPS, surfactants.

The addition of single chain surfactant to the vesicle dispersion caused vesicle-micelle transition. We observed that DODAX vesicle counterion shows distinguished interaction and define the extent of the surfactant solubilization. The effects of the vesicles preparation protocol, relative concentration of the surfactant species and co-solutes on the vesicle-micelle transition have been investigated.

We determined the gel to liquid crystalline phase transition temperature (T_m) and the surfactant critical molar concentration ratios R_{sat} and R_{sol} in the vesicle-micelle transition. Results of the present work are consistent with others for similar systems reported elsewhere.

1. Introdução

Há anos estudos bioquímicos e biofísicos, que enfocam a aplicação de surfactantes como potencial de incorporação de drogas em vesículas têm sido realizados, a fim de diminuir a dosagem e os efeitos colaterais de drogas no organismo vivo.¹ O surfactante pode modificar as propriedades das membranas, como a permeabilidade, fluidez, potencial eletrostático e suas funções biológicas.¹ O transporte através de uma membrana só é possível se, de um lado, houver um líquido que solubiliza a parede da membrana e, do outro lado, um líquido no qual o componente transportado seja miscível. Surfactantes formadores de micelas são extensamente utilizados em membranologia e distribuição de droga mediada por lipossomos, incluindo a desintegração das biomembranas em misturas com micelas no processo de extração e purificação de proteínas de membranas.¹⁻³

A mistura de surfactantes com lipídios naturais é muito explorada na formação de vesículas, e tem múltiplas aplicações. Na extração de proteína de membrana (Fig. 1), o surfactante deve ter grande poder de solubilização dos lipídios e baixo potencial de desnaturação protéica. O estudo da interação proteína/surfactante e lipídio/surfactante é, portanto, relevante na bioquímica de membranas naturais.²⁻⁴

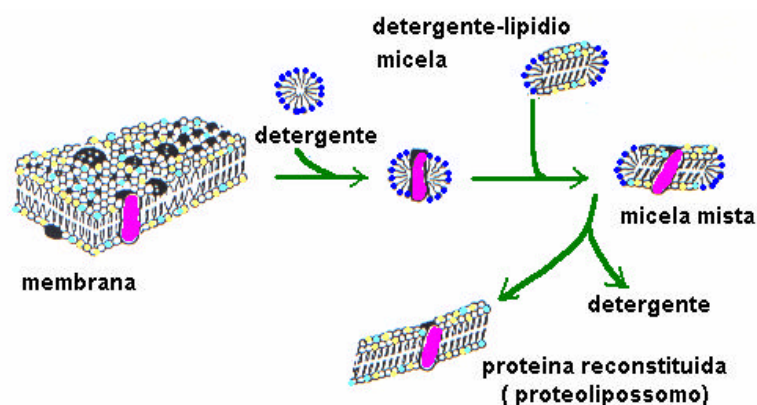


Figura 1 – Processo de solubilização da membrana biológica por surfactante na extração e purificação de proteínas de membranas.⁴

1.1. Micelas

As micelas são agregados supramoleculares de surfactantes, ou moléculas tensoativas, que têm estruturas RX, onde R representa uma única cadeia hidrocarbônica, que contém no mínimo 8 carbonos, um radical alquil benzeno, ou outras cadeias hidrofóbicas, e X é um grupo hidrofílico iônico, não-iônico ou zwitteriônicos.⁵

A baixas concentrações, surfactantes em solução aquosa comportam-se como eletrólitos fortes e encontram-se na forma de monômeros; em concentrações maiores, eles se auto-associam em micelas, numa estreita faixa de concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), na qual se verifica uma mudança abrupta nas propriedades físicas da solução, como a condutividade, tensão superficial, turbidez, etc.⁵ A micelização é, em geral, um processo cooperativo e a CMC é bem definida e dependente da estrutura do surfactante, temperatura, pressão e da presença de co-solutos.⁶

O aumento do comprimento da cadeia hidrofóbica do surfactante diminui a sua solubilidade em água (mas aumenta em solvente orgânico) e aumenta o seu ponto de ebulição e a tendência para formar micelas, diminuindo a CMC.⁷ A micelização se baseia na baixa solubilidade dos surfactantes em água, que leva ao efeito hidrofóbico.⁸ O tamanho das micelas é determinado pela interação repulsiva entre as cabeças polares, e o diâmetro das micelas esféricas é limitado pelo comprimento da cadeia hidrocarbônica do surfactante. A Fig. 2 mostra a estrutura molecular dos surfactantes não-iônicos $C_{12}E_n$ e zwitteriônico HPS usados neste trabalho.

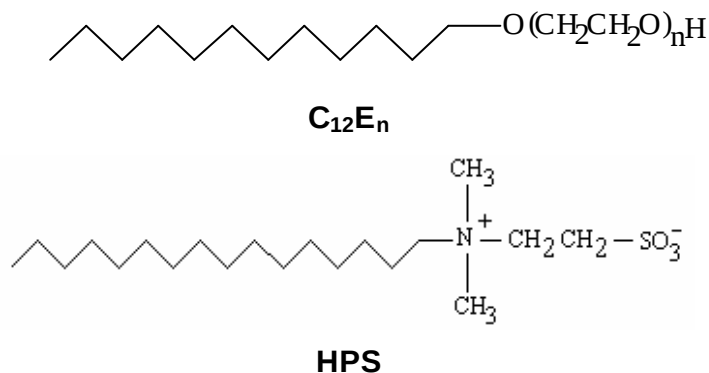


Figura 2 – Estrutura molecular de $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS.

Segundo o modelo clássico proposto por Hartley⁹ (Fig. 3a), as micelas em solução diluída são agregados esféricos constituído de três regiões distintas: uma região hidrofóbica constituída pelas cadeias hidrocarbônicas dos surfactantes, que formam o núcleo da micela; uma região contendo grupos polares dos surfactantes e contra-íons aglomerados ao redor da micela (camada de Stern), cuja espessura depende do tamanho do grupo polar e uma dupla camada elétrica de Gouy-Chapman, contendo os contra-íons dissociados. Em concentrações maiores de surfactantes, as micelas adquirem a forma cilíndrica, podendo haver transição da fase isotrópica para a hexagonal ou lamelar (Fig. 3b).¹⁰ Em concentrações elevadas, ie., na presença de pouca água, estruturas reversas hexagonais e micelares podem ser formadas.

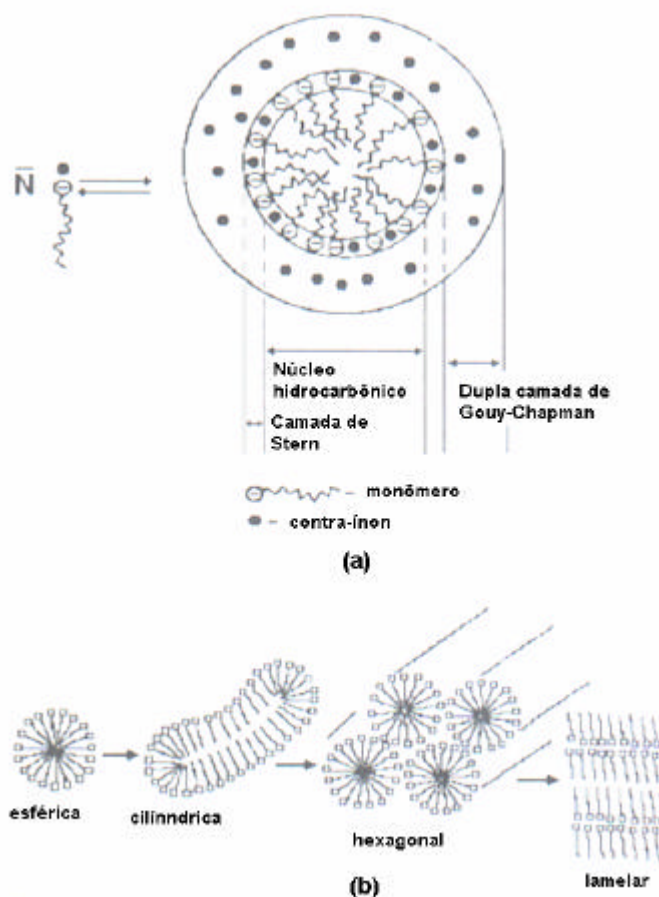


Figura 3 – (a) Representação esquemática de uma micela aniônica esférica e (b) mudanças na forma e estrutura micelar com aumento da concentração de surfactante.¹⁰

A formação dos agregados depende da estrutura dos surfactantes, da concentração, temperatura, pH, salinidade, entre outras. Existem compostos que exercem uma modificação estrutural da água, sendo classificados como estruturantes (ex: xilose e frutose) ou desestruturantes (ex: uréia e formamida) da água. Os compostos desestruturantes aumentam a CMC e os estruturantes diminuem.

Essas estruturas são freqüentemente formadas pelo mesmo surfactante, sendo que transição estrutural pode ser induzida por uma simples mudança na concentração do tensoativo em solução.

1.2. Vesículas

As membranas biológicas são constituídas basicamente por lipídios, proteínas e glicídios (Fig. 4)¹¹⁻¹³ Os fosfolipídios constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem uma certa insolubilidade em água, por apresentarem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, e formam bicamada em meio aquoso que funciona como barreira ao fluxo de moléculas polares. O interior da membrana é fluido devido às interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídeos e das proteínas se movam lateralmente no plano da membrana.

Embora as membranas biológicas seja meta estável, elas são dinâmicas e suficientemente flexíveis para permitir a fusão com outras membranas e interação com macromoléculas biológicas.¹⁴ As caudas hidrofóbicas estão em movimentação constante devido à livre rotação das ligações simples carbono-carbono das cadeias alquílicas.

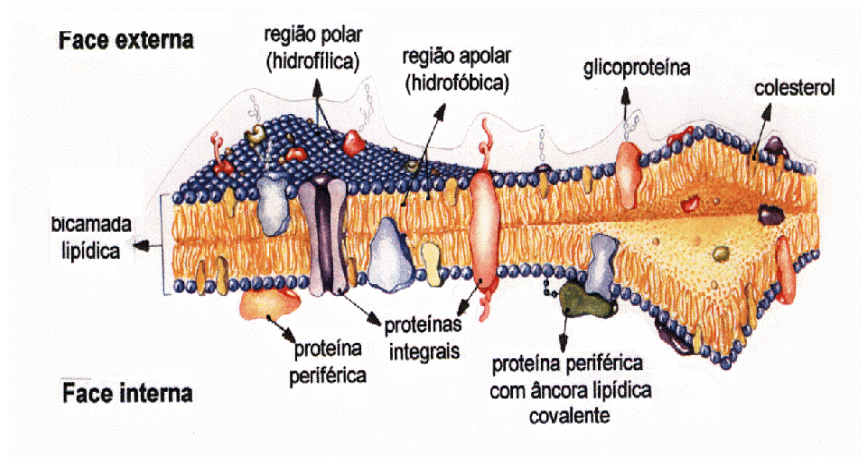


Figura 4 – Modelo do mosaico fluido da membrana biológica.¹³

O grau de fluidez das membranas depende da composição lipídica e da temperatura. Em baixas temperaturas há pouca movimentação lipídica, mantendo-se quase que cristalina (estado gel). Acima de uma certa temperatura os lipídeos apresentam grande movimentação (estado líquido-cristalino), e, em geral, a transição entre esses dois estados ocorre numa temperatura bem determinada.

Além da migração lateral dos componentes da membrana e da flexibilidade das cadeias alquílicas, existe uma terceira espécie de movimento restrito, a difusão “basculante” (“flip flop”) do lipídio de uma face da bicamada para a outra.¹³

Devido às dificuldades em estudar as membranas naturais *in vivo*, as vesículas têm sido usadas como sistemas miméticos de membranas biológicas.¹⁶ Vesículas zwitteriônicas de 1,2 - dipalmitoil - *sn* - glicero - 3 - fosfocolina, DPPC, catiônicas de brometo e cloreto de dioctadecildimetilamônio, DODAB, e DODAC, e aniônicas de fosfato de dihexadecil, DHP (Fig. 5), com duas longas cadeias hidrocarbônicas, têm sido muito investigadas.^{17,18} Quando dispersos em meio aquoso, essas moléculas tendem a formar estruturas de bicamada ou vesículas.

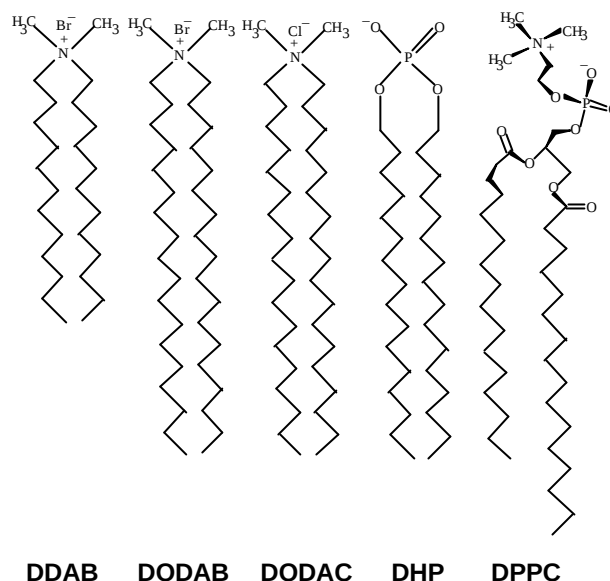


Figura 5 – Estrutura molecular dos surfactantes formadores de vesículas: catiônicos DDAB, DODAB e DODAC, aniônico DHP e zwitteriônico DPPC.

Moléculas anfifílicas são encontradas tanto em membranas celulares como em formulações tecnológicas, despertando grande interesse em diversas áreas como na bioquímica, biofísica, físico-química, farmacologia, medicina, indústria de alimentos, entre outras.¹⁹

Vesículas são estruturas de bicamada que possuem em seu interior um compartimento aquoso. A formação de vesículas ocorre quando os lipídios são dispersos em meio aquoso, formando bicamada lipídica separando o compartimento aquoso interno da fase aquosa externa (Fig. 6).¹³

Nas vesículas os grupos polares dos lipídeos ficam expostos às fases aquosa interna e externa, e as cadeias hidrocarbônicas voltadas para o interior do núcleo, formando a bicamada lipídica (Fig. 6). Esses sistemas chamam a atenção por conduzirem naturalmente a compartimentalização de reagentes localizados na região da bicamada, da interface externa e interna, ou na fase aquosa interna e externa. As interações hidrofóbicas favorecem o empacotamento das caudas, minimizando o número de cadeias hidrocarbônicas expostas em meio aquoso. As interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio entre as cabeças polares e as moléculas de água ajudam a estabilizar a

estrutura vesicular. Possivelmente as primeiras células vivas assemelham-se a lipossomos, segregando o conteúdo aquoso, como uma concha hidrofóbica.¹³

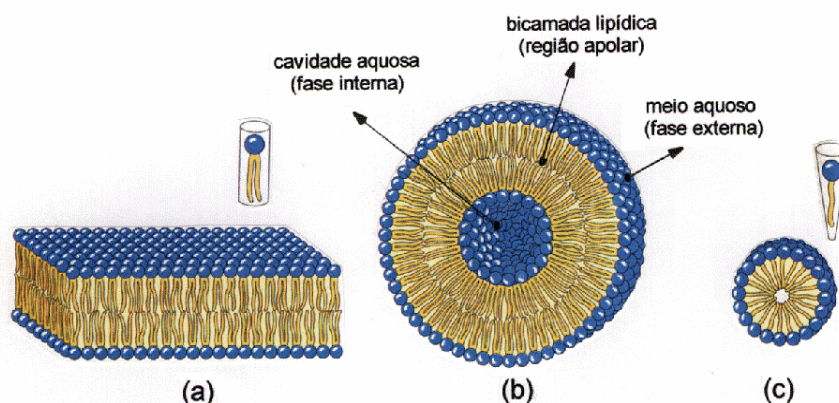


Figura 6 – Modelos de agregados supramoleculares de surfactantes em meio aquoso (a) bicamada, (b) vesícula e (c) micela.¹³

Em geral, moléculas lipídios que apresentam duas cadeias alquílicas possuem unidades individuais cilíndricas (a área da secção transversal da cabeça polar é igual à da cadeia alquílica), podendo formar bicamadas ou vesículas, e anfifílicos em forma de cone, com secção transversal da cabeça polar maior do que a da cadeia alquílica, formam micelas (Fig. 6).¹³

1.3. Temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina (T_m)

Dependendo da temperatura do meio onde se encontra, a bicamada lipídica pode estar no estado gel (rígido ordenado) ou no estado líquido-cristalino (fluido). A temperatura na qual esta transição de fase ocorre denomina-se temperatura de transição de estado gel líquido-cristalino (ou transição principal), T_m , que, em geral, é maior quando obtida por aquecimento do que por resfriamento (efeito histerese). A rigor, a transição ocorre em uma faixa de temperatura, e T_m corresponde à temperatura na qual se tem o máximo da transição.^{20,38}

Calorimetria diferencial de varredura, DSC, é um dos métodos muito usados para determinar a T_m , que depende de fatores como o comprimento da

cadeia alquílica, insaturação, natureza da cabeça polar, etc.^{20-22,38} Medidas de T_m e fluidez de bicamadas lipídicas são importantes na preparação e exploração de vesículas como agentes miméticos, pois estão relacionadas a propriedades como permeabilidade, fusão, agregação e ligação com proteínas; propriedades essas relevantes na estabilidade, estrutura e função dos lipídios na membrana celular.²³

As cadeias hidrocarbônicas dos anfifílicos são flexíveis e podem existir em um grande número de conformações, pois cada ligação simples entre C-C tem completa liberdade de rotação. A conformação mais provável (de energia mínima) é a completamente estendida (conformação *anti*), que tende a adotar uma conformação flexível, ou *gauche* (Fig. 7) com o aumento da temperatura.

Ao ocorrer mudança conformacional *anti-gauche* da cadeia hidrocarbônica do lipídio, aumenta o espaço ocupado pelas cadeias reduzindo a espessura da bicamada (Fig. 8).²³ Para DPPC, a transição da fase gel para a líquida-cristalina ocorre em duas etapas: a pré-transição aproximadamente 5 °C abaixo da transição principal ($T_m = 41$ °C) e faz mudar a orientação do grupo de cabeça polar. Entre essas duas transições, a membrana adota uma aparência ondulada com uma periodicidade regular.²³ Para DODAB, a pré-transição e a transição principal são aproximadamente 36 e 45 °C, respectivamente. DODAC não apresenta pré-transição, mas apenas transição principal em torno de 49 °C.

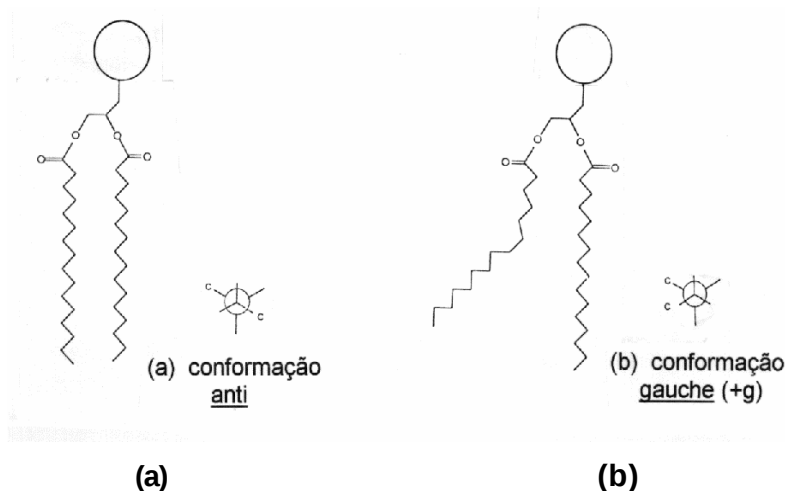


Figura 7 – Cadeias hidrocarbônicas de fosfatidilcolina nas conformações (a) *anti* e (b) *gauche*.²³

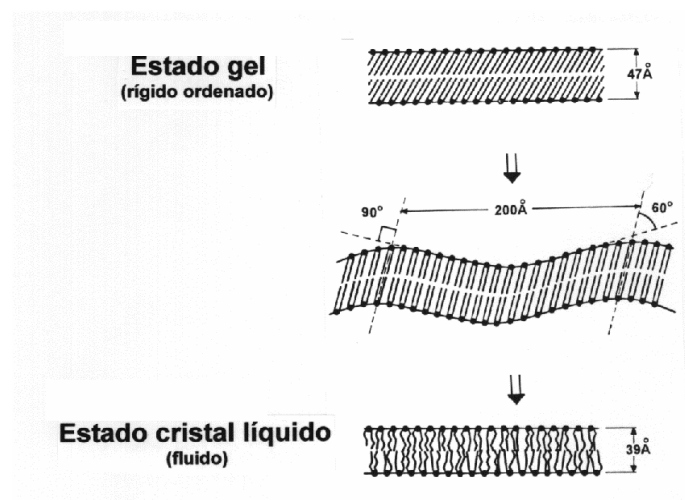


Figura 8 – Representação estrutural da bicamada lipídica entre a pré-transição e a transição de fase principal.²³

1.4. Formação de agregados por moléculas anfifílicas

Existe uma variedade de formas de agregação de moléculas anfifílicas em meio aquoso devido ao favorecimento do efeito hidrofóbico, que tende a diminuir a área interfacial por molécula (região polar) e a aumentar essa área (região apolar), e outros tipos de interações mais complexas, tais como repulsão eletrostática e de hidratação e impedimento estérico.

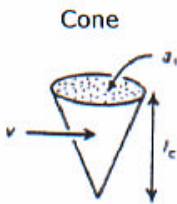
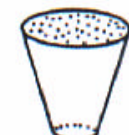
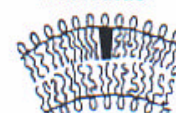
Sugere-se que, nas condições de equilíbrio termodinâmico, para moléculas anfifílicas se auto-agregarem é necessário apresentar uma área superficial ideal a_0 da região da cabeça polar, com uma energia de interação mínima, e, assumindo que as cadeias hidrocarbônicas se comportem como fluidos, ou seja, que seu volume v seja constante a uma temperatura fixa, podemos definir um parâmetro, denominado “parâmetro de empacotamento crítico”, $v/a_0 l_c$, onde l_c é o comprimento máximo ou crítico da cadeia hidrocarbônica. Especificando o valor desse parâmetro para uma determinada molécula anfifílica, é possível estimar o tipo de agregação dessas moléculas.⁵

Moléculas anfifílicas em meio aquoso tendem a formar agregados como micelas ou vesículas, e assumir diferentes formas, tais como: micelas esféricas ou cilíndricas, bicamada flexíveis ou vesículas, bicamadas planares, micelas

inversas, etc. As formas de empacotamento possíveis, de acordo com Tanford e Israelachvili (1992)⁵ são mostradas na Tab.1.

Deve-se também considerar o efeito do método de preparação e o solvente no qual são preparados esses agregados como em meio de co-solutos.⁵ Existem vários métodos de preparação de vesículas, tais como: método espontâneo, sonicação em banho ou ponta de titânio, injeção ou extrusão. Esses procedimentos podem produzir vesículas de diferentes formas e tamanho (Fig. 9) e podem ser classificados como vesículas pequenas unilamelares (SUV), vesículas intermediárias unilamelares (IUV), vesículas grandes unilamelares (LUV), vesículas gigantes unilamelares (GUV) e vesículas multilamelares (MLV).²³

Tabela 1 – Formas de empacotamento possíveis de moléculas tensoativas em função do valor do parâmetro de empacotamento crítico.⁵

Tensoativo	Parâmetro de empacotamento Crítico ($v/a_0 l_c$)	Forma do empacotamento Crítico	Estruturas formadas
Tensoativos de cadeia simples com áreas de cabeça polar grandes (ex.: SDS em presença de baixos teores de sal)	$< 1/3$	Cone 	Micelas esféricas 
Tensoativos de cadeia simples com áreas de cabeça polar pequenas (ex.: SDS em presença de altos teores de sal)	$1/3-1/2$	Cone truncado 	Micelas cilíndricas 
Tensoativos de cadeias duplas com áreas de cabeça polar grandes (ex.: fosfatidilcolina)	$1/2-1$	Cone truncado 	Bicamadas flexíveis, vesículas 
Tensoativos de cadeias duplas com áreas de cabeça polar pequenas (ex.: fosfatidiletanolamina)	$= 1$	Cilindro 	Bicamadas planares 
Tensoativos de cadeias duplas com áreas de cabeça polar pequenas (ex.: fosfatidiletanolamina)	> 1	Cone truncado invertido 	Micelas inversas 

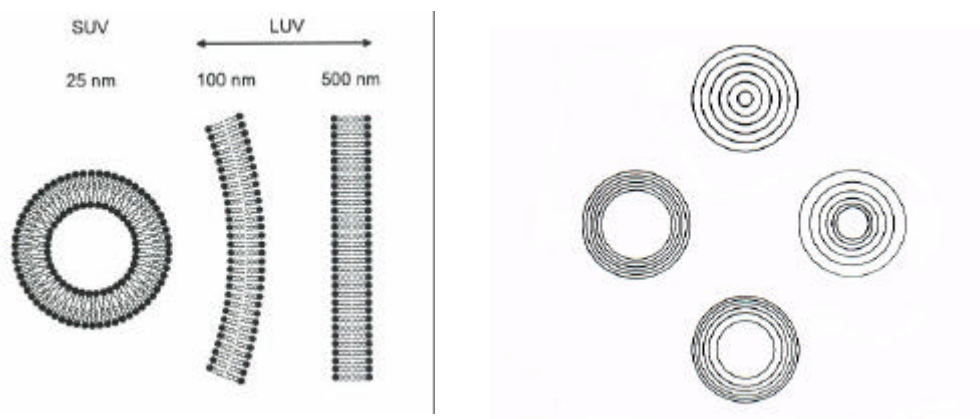


Figura 9 – Tamanhos relativos de vesículas unilamelares e configurações de vesículas multilamelares.^{4,23}

1.5. Mistura de soluções de vesículas e micelas

É grande o interesse pelo uso de moléculas tensoativas interagindo com membranas naturais e sintéticas, pois causam mudanças estruturais que podem afetar a fluidez e permeabilidade da membrana, alterando (em geral diminuindo) a temperatura de transição de fase T_m , afetando, portanto, o mecanismo de transporte e encapsulamento de drogas e aplicações químicas em geral.²⁴

A mistura de espécies tensoativas pode levar a transição vesícula-micela e vice-versa. Na adição de surfactante em dispersões de vesículas, a transição vesícula-micela pode ocorrer em três estágios, dependendo da concentração do surfactante: (1) a baixas concentrações o surfactante é solubilizado pelas vesículas, formando vesículas mistas, (2) a concentrações intermediárias têm-se uma mistura de micelas e vesículas, e, (3) a elevadas concentrações, micelas mistas são formadas (Fig. 10).²⁵⁻³²

O tamanho e a forma das estruturas intermediárias dependem da estrutura molecular dos componentes anfífilicos, e do método utilizado na obtenção das vesículas, ou seja, da estrutura inicial das vesículas. A ação do surfactante na transição morfológica das vesículas é usualmente investigado com relação à estabilidade das vesículas, permeabilidade, fusão ou agregação.

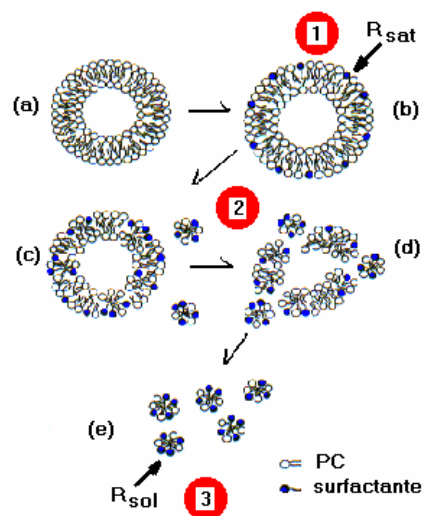


Figura 10 - Modelo de três estágios de transição vesícula-micela em mistura de fosfatidilcolina (PC) com surfactante: (a) vesícula de PC, (b) vesícula mista **(1)**, (c) vesícula e micela mistas, (d) desintegração das vesículas mistas **(2)** e (e) micelas mistas **(3)**.³⁰

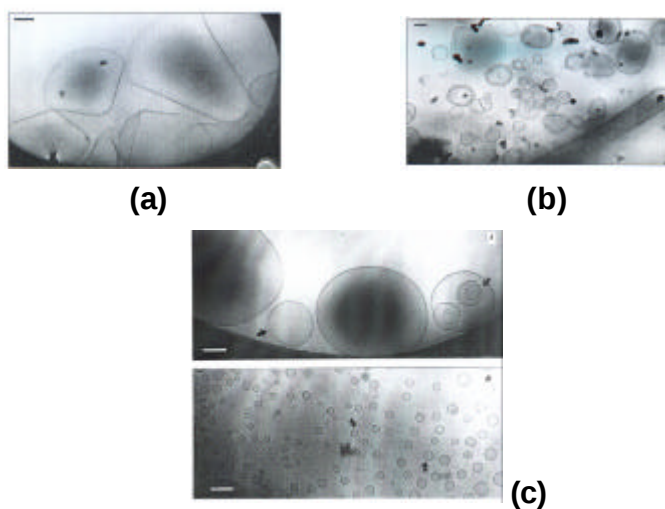


Figura 11 – Imagens de cryo-TEM de mudança morfológica de dispersões vesiculares de DODAB 5,0 mM, (a) em água, (b) em solução de NaCl 20 mM (25 °C),³⁴ e (c) *i* dispersão de DTAC 10 mM e *ii* com a mistura de DTAC/DDAB, para $x_{DAB} = 0,15$.⁶⁶ Escala bar = 100 nm.

As técnicas mais usadas para investigar variação morfológica de vesículas, na ausência ou presença de aditivos em geral, são: espalhamento

dinâmico e estático de luz, NMR, ESR, calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica isotérmica, microscopia de transmissão eletrônica por criogênese (cryo-TEM) Fig.11,³⁴ fluorescência, tensão superficial e viscosidade.^{2-4,25-34,66}

1.6. Absorbância e turbidez

Medidas de espalhamento de luz são relevantes na determinação do tamanho, forma e interações de partículas.³⁵ A turbidez é uma grandeza definida de maneira idêntica à absorbância, e que pode ser determinada em qualquer espectrofotômetro. A diferença entre a turbidez e a absorbância é o seguinte: no primeiro caso, a transmitância é reduzida pelo espalhamento da luz, no segundo caso, é reduzida pela absorção da luz.

Embora a turbidez seja uma grandeza fácil de medir, ela é extremamente poderosa no estudo de dispersões de agregados complexos como de vesículas e micelas.

Por medidas de turbidez podemos verificar mudanças estruturais de vesículas, pela delinação na mudança da propriedade da turbidez em função do aumento da razão molar [surfactante/anfifílico], extrapolando os resultados em baixas e altas concentrações do surfactante para dois pontos de intersecção, que se dá a R_{sat} e R_{sol} , como no processo de transição vesícula-micela (Fig.12).

O processo inicia com adição de surfactante não-iônico as vesículas de DODAB, altera a turbidez do sistema; inicialmente a turbidez aumenta até a razão [surfactante/anfifílico] máxima de saturação (R_{sat}). Nesta região o tamanho das vesículas tende a aumentar. Acima de R_{sat} as vesículas são desintegradas num processo dependente do sistema, até a completa transição vesícula-micela, que ocorre na razão de solubilidade do surfactante (R_{sol}).²⁵⁻³²

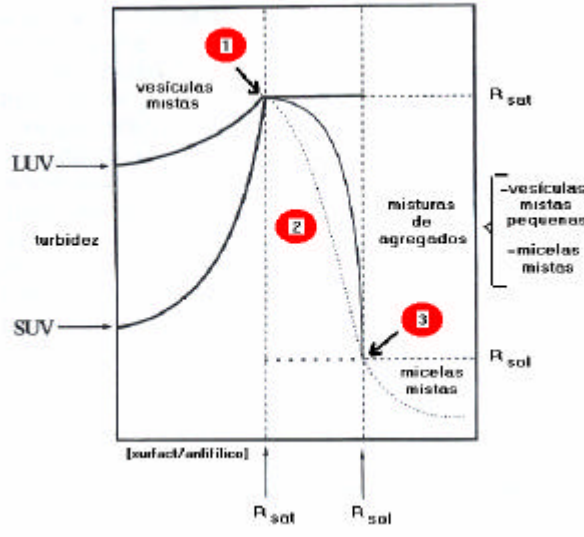


Figura 12 – O modelo de três estágios de transição vesícula-micela em misturas de vesículas e micelas, observada pela turbidez em função da razão molar [surfactante/anfifílico].²⁵⁻³⁴

A razão da intensidade de luz transmitida (I_t) pela intensidade de luz incidente (I_0), e a absorbância por unidade do caminho óptico e_{abs} (ou turbidez, na ausência de absorção) estão relacionadas pela equação:⁵

$$e_{abs} = -\ln(I_t / I_0) \quad (1)$$

Para material não absorvente,

$$I_t = I_0 - I_{esp.} \quad (2)$$

onde $I_{esp.}$ é a intensidade de luz espalhada por uma partícula em todas as direções. Combinando as equações 1 e 2,

$$e_{abs} = -\ln\left(\frac{I_0 - I_{esp.}}{I_0}\right) = -\ln\left(1 - \frac{I_{esp.}}{I_0}\right) \cong \frac{I_{esp.}}{I_0} \quad (3)$$

Somando para todas as partículas no volume de espalhamento, temos:

$$\frac{I_{esp.}}{I_0} = \sum_{\text{Todos angulos}} \frac{i_{esp.}}{I_0} \quad (4)$$

que relaciona a turbidez (τ) à intensidade de luz espalhada.

1.7. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

DSC é muito utilizado no estudo do comportamento termotrópico de fases de sistemas anfífilos para obter a T_m de vesículas na ausência e presença de aditivos como drogas, surfactantes, polímeros e outros (Fig. 13).^{20,34,36-38}

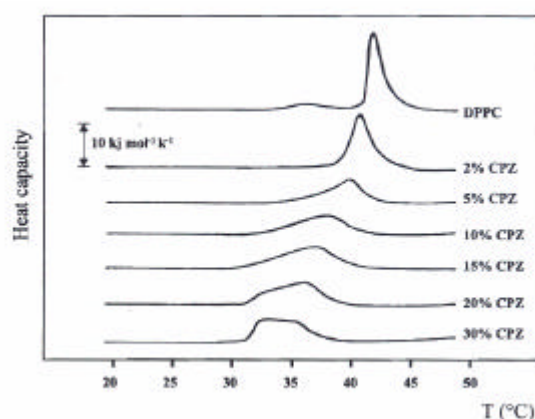


Figura 13 – DSC de DPPC 1.0 mM (MLV) pH = 4,5 com efeito da adição da droga clorpromazine (CPZ).³⁸

As propriedades térmicas em sistemas estruturados de moléculas anfífilas naturais ou sintéticas em dispersões aquosas são importantes, a temperatura de transição, é análoga ao ponto de fusão dos ácidos graxos. Essa mudança de fase é devido à alteração do grau de interação das cadeias de hidrocarbônica constituintes da bicamada.

O entendimento das transições de fase e da fluidez das membranas lipídicas é relevante tanto na preparação quanto no uso das vesículas, desde que o comportamento de uma membrana determina as propriedades como a permeabilidade, fusão, agregação e sua ligação à proteína. Todas podem afetar a estabilidade das vesículas ou lipossomos e seu comportamento em sistemas biológicos.

A temperatura de transição da fase gel para a líquido-cristalina (T_m) é uma característica específica da molécula anfifílica que forma o sistema vesicular em estudo. Essa propriedade indica se há formação de estruturas organizadas (bicamadas) no processo de hidratação de moléculas anfifílicas puras ou em misturas, como no caso de lipídios/surfactante, pois estas interações modificam as propriedades como o potencial da membrana e a permeabilidade afetando o mecanismo de ação de drogas como os anestésicos locais a fenômenos de transporte através da membrana.³⁸

Em medidas de microcalorimetria (DSC) a amostra em estudo é aquecida ou resfriada a uma valor constante de transferência de calor e a capacidade calorífica (C_p) do sistema é determinada.³⁸

Para uma definição geral da capacidade calorífica (C_p), observa-se que o calor é freqüentemente visto em relação aos seus efeitos sobre um sistema, para o qual ele transfere ou recebe calor, medindo assim a C_p do sistema. Quanto menor a variação de temperatura do sistema causada pela transferência de uma determinada quantidade de calor, maior a sua capacidade calorífica. A capacidade calorífica (capacidade térmica), pode ser definida como:

$$C = \frac{dQ}{dT} \quad (5)$$

A capacidade calorífica a pressão constante é definida por.^{38,39}

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (6)$$

A C_p está, relacionado a uma taxa de variação da entalpia com a temperatura. Para uma variação infinitesimal com temperatura, em um processo a pressão constante, a equação (6) pode ser escrita como:

$$dH = C_p dT \quad (P \text{ constante}) \quad (7)$$

donde, podemos calcular a variação de entalpia DH :

$$DH = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (P \text{ constante}) \quad (8)$$

Onde essa transição de fase T_m esta associada ao pico de energia DH , e quando o pico é bem definido (estreito) a transição é cooperativa (lipídio/água).

Várias substâncias solúveis na fase hidrofóbica das vesículas são capazes de diminuir a T_m de acordo com o mesmo princípio termodinâmico que causa o abaixamento do ponto de fusão de um cristal comum quando um aditivo comum está presente na fase líquida.

1.8. Fluorescência

1.8.1. Processos fotofísico e fotoquímico

Nas moléculas, a absorção (Abs) de um quantum resulta em uma transição do estado fundamental singlete (S_0) a um dos estados excitados singlete (S_1 ou S_2), onde todos os spins estão emparelhados. A conversão do estado fundamental singlete (S_0) ao primeiro tripleto excitado (T_1) é de probabilidade extremamente pequena e somente é atingido por processos indiretos.⁴⁰

A dissipação de energia da molécula eletronicamente excitada pode ocorrer por processos fotofísicos e fotoquímicos. No primeiro caso ocorre uma conversão entre estados, com transferência de energia e dissipação radiativa e, no outro, ocorre a formação de radicais livres, ciclização e rearranjo intramolecular.⁴⁰

Um fluoróforo excitado nos níveis eletrônicos S_1 ou S_2 tem suas moléculas em fases condensadas que relaxam rapidamente para o nível vibracional mais baixo. Este processo, não radiativo, chamado conversão interna, ocorre em $\sim 10^{-12}$ s. O excesso de energia vibracional que as moléculas adquirem é dissipado sob forma de calor através de colisões com moléculas adjacentes, ocorrendo a relaxação vibracional.

A partir do estado S_1 a molécula pode decair através de vários processos, perdendo energia e voltando a S_0 por emissão de radiação em um comprimento de onda apropriado, num processo chamado fluorescência, com tempos de vida de 10^{-7} - 10^{-9} s. Pode também perder energia como calor e retornar a S_0 processo não radiativo, reagir quimicamente (fotoquímica do S_1) ou sofrer transição sem emissão de radiação, com alteração do spin, indo a T_1 (o primeiro estado

excitado tripleto) no processo de cruzamento entre sistemas, com tempo de vida $\sim 10^{-11}$ - 10^{-7} s, suficientemente rápido para competir com a fluorescência para desativação do S_1 .⁴⁰

O cruzamento entre sistemas seguidos de conversão interna é um processo exotérmico. O tempo de vida é maior no estado T_1 do que o estado S_1 . À emissão de radiação associada à conversão $T_1 \rightarrow S_0$ dá-se à fosforescência. As conversões ($T_1 \rightarrow S_0$) têm, assim como as conversões ($S_1 \rightarrow T_1$), probabilidade muito pequena de ocorrer.⁴⁰ Em geral, a emissão de fluorescência é definida por uma transição entre estados de mesma multiplicidade ($S \rightarrow S$) e fosforescência por uma transição entre estados de diferentes multiplicidades ($T \rightarrow S$). Estes dois processos são radiativos e resultam na emissão de luz, que ocorre sempre do nível vibracional mais baixo do estado excitado para os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental (Fig. 14).

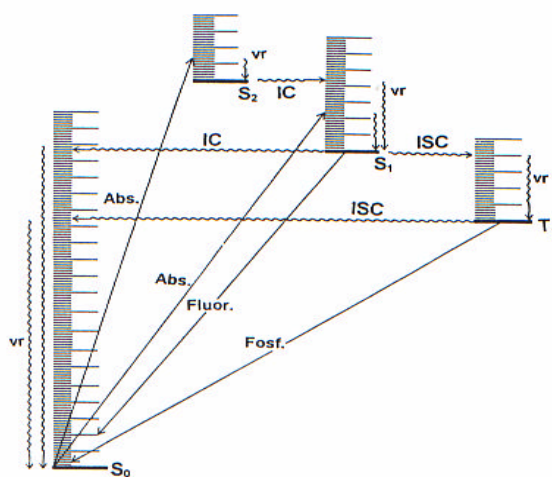


Figura 14 – Diagrama de Jablonsky de processos foto-físicos e foto-químicos.

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. Se todas as moléculas excitadas fluorescessem, o rendimento quântico seria unitário.⁴⁰⁻⁴²

1.8.2. Fluorescência de trans-difenilpolienos

Os trans-difenilpolienos (t-Dpo), Fig.15, e seus derivados são compostos que possuem ligações duplas conjugadas responsáveis pela absorção de luz e emissão de fluorescência, resultado da excitação de um elétron, que retém seu spin segundo orientação do estado fundamental, e sua emissão de luz é sensível ao meio ambiente no qual se encontram, pois a intensidade de fluorescência é função da micro-viscosidade.^{42,43}

Sondas fluorescentes, como, DPB e DPH, têm sido estudadas como modelo de comportamento fotoquímico e fotofísico em sistemas micro-heterogêneos, como as micelas e vesículas, os quais influenciam suas propriedades fotoquímicas.⁴³ Estas sondas possuem grande potencial de solubilização em meios apolares, como as bicamadas das vesículas ou interior o interior micelar.

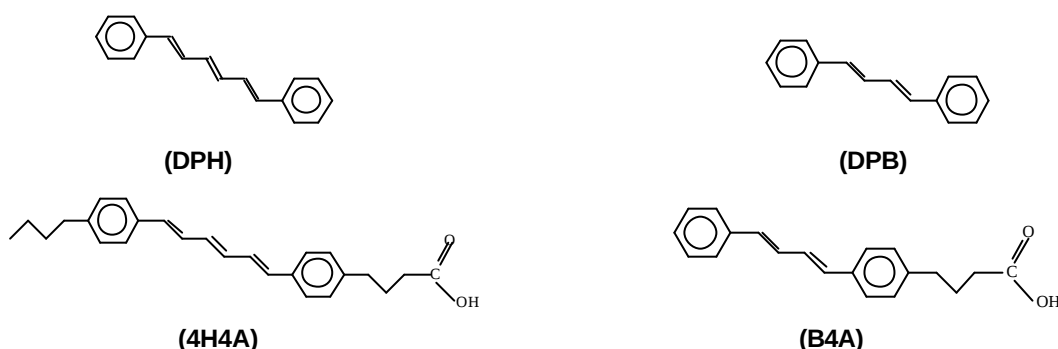


Figura 15 - Estrutura molecular de sondas fluorescentes trans-difenilpolienos (t-Dpo).

As bandas do espectro de absorção destas sondas se encontram na região do UV-Vís. Os diferentes comprimentos de onda de absorção obtidos para as sondas se referem ao aumento de duplas conjugadas no cromóforo, efeito batocrômico (deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ para o vermelho), com aumento da intensidade de absorção e absortividade molar (ϵ). Estas características atribuem a tais compostos excelentes propriedades fotoquímicas. Com absorção de luz pela dupla ligação ocorre interconversão do isômero *trans* a *cis* (fotoisomerização), uma vez que esses isômeros são termicamente estáveis à temperatura ambiente.⁴³

Os t-Dpo e seus derivados são muito usados no estudo de vesículas,⁴²⁻⁴⁵ pois fotoisomerizam quando expostos à luz ultravioleta, permitindo ser monitorados como sondas fluorescentes.⁴⁰ A isomerização fotoquímica *cis-trans* da dupla ligação C=C em polienos conjugados é de grande importância, por exemplo, em estudos de polienos biológicos, como retinol, β -caroteno e vitamina D.⁴³⁻⁴⁵ Os t-Dpo, podem ser usados como moléculas-modelo para estes processos, pois a intensa de fluorescência, e o tempo de vida são relativamente longos e apresentam sensibilidade ao micro-ambiente, tornando assim, compatíveis com as bicamadas lipídicas, onde são incorporadas.^{42-43,45}

Dependendo do meio no qual se encontram, ocorre uma competição entre a isomerização e a fluorescência das moléculas expostas à luz UV.^{42,43} Em meio de baixa viscosidade ocorre um aumento na isomerização, que tende a 1, mas quando a molécula se encontra em meio rígido, a isomerização é dificultada e a fluorescência tende a 1. O aumento da velocidade de rotação no estado excitado *trans-cis* é provocado pelo aumento da temperatura, da polaridade do solvente e diminuição da micro-viscosidade do meio. Esses fatores são responsáveis no processo de isomerização da molécula.^{42,43}

1.8.3. Anisotropia de fluorescência

Informações sobre o grau de ordem ou fluidez, de bicamada lipídicas são dadas por técnicas espectroscópicas como fluorescência e EPR.⁴⁶⁻⁴⁹

Uma das técnicas mais usadas na medida de fluidez de membrana é a de polarização de fluorescência, na qual as emissões de fluorescência de polarização de cromóforos incorporados às membranas são usadas como medida da intensidade do movimento ao acaso da sonda, durante o seu tempo de vida no estado excitado, que é limitado pelo grau da ordem das cadeias hidrocarbônicas. O método fornece uma medida da ordem da cadeia hidrocarbônica.^{41,45,48,49}

A luz polarizada excita preferencialmente os cromóforos cujos eixos moleculares estão orientados em uma direção particular em relação ao plano de polarização. Se o cromóforo permanecer imóvel durante o seu tempo de vida do

estado excitado, a luz fluorescente será também altamente polarizada. Se o cromóforo girar durante o tempo de vida de fluorescência, a fluorescência resultante torna-se bem menos polarizada (anisotrópica).^{41-43,50-52} Esse movimento relativo depende da viscosidade do meio e do tamanho e formato das sondas.

A anisotropia de fluorescência, $\langle r \rangle$, é uma média da taxa de rotação da molécula em estudo. Durante o tempo de vida no estado excitado, $\langle r \rangle$ decresce com a livre rotação do cromóforo.^{41,50-52}

$\langle r \rangle$ é definido pela eq. 9.^{51,52}

$$r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \quad (9)$$

onde, $I_{//}$ e $I_{\perp}$ são as intensidades de fluorescência medidas através de um polarizador orientado paralelamente e perpendicularmente ao plano da radiação de excitação.

Para medida de $\langle r \rangle$ em um fluorímetro com um único canal de emissão (formato em “L”), utilizamos um fator de correção (G) eq. 10 das lentes polarizadoras, dado pela relação entre as intensidades de luz polarizada verticalmente e horizontalmente.^{43,44}

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{//}} \quad (10)$$

1.9. Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

O paramagnetismo é um fenômeno que envolve elétrons desemparelhados. Os níveis de energia do elétron em um campo magnético B são:

$$E_{ms} = g_e m_b B, \quad m_s = \pm \frac{1}{2} \quad (11)$$

onde m_b é o magnéton de Bhor e $g_e = 2,0023$ é rotação radial (fator radial do elétron com o campo magnético).

Moléculas que possui elétrons desemparelhados na presença de um campo magnético, os seus spin eletrônicos alinham-se com o campo de forma quantizada em dois estados energéticos diferentes, e com duas orientações possíveis em relação ao campo aplicado: a energia de um elétron *a* ($m_s = + 1/2$) aumenta (spin antiparalela) e a de um elétron *b* ($m_s = -1/2$) diminui (spin paralela), quando a intensidade do campo magnético aumenta, chamado de efeito Zeeman, e essa separação entre os níveis é dado como:

$$DE = E_b - E_a = g_e m_b B \quad (12)$$

Quando a amostra é exposta à radiação eletromagnética a frequência *n*, a absorção ressonante ocorre na condição de ressonância $hn = g_e m_b B$.⁵³ A ressonância do spin do elétron de moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, se dá pela presença de radiação eletromagnética monocromática. Os campos magnéticos usados são da ordem de 0,3 T e correspondem a ressonâncias com campos eletromagnéticos de frequências de 9 GHz e comprimento de onda de 3 cm.⁵³

Um espectrômetro de EPR consiste de uma fonte de microondas (Klystron), uma cavidade que recebe a amostra num vaso de vidro ou de quartzo, um detector de microondas e um eletroímã (Fig. 16). O espectro de EPR é obtido pelo registro da absorção de microondas em função do campo magnético.⁵³

A técnica é insensível a moléculas normais com spin emparelhados e requer, portanto, o uso de sondas paramagnéticas ou marcadores de spin (spin labels) no interior da macro-molécula. Como exemplo, a molécula 16-MESL (Fig. 17), possibilita o estudo da relação estrutura – função do micro-ambiente do marcador. A aplicação da técnica de EPR é relevante em estudos biofísico-químicos em sistemas coloidais.⁵³⁻⁵⁶

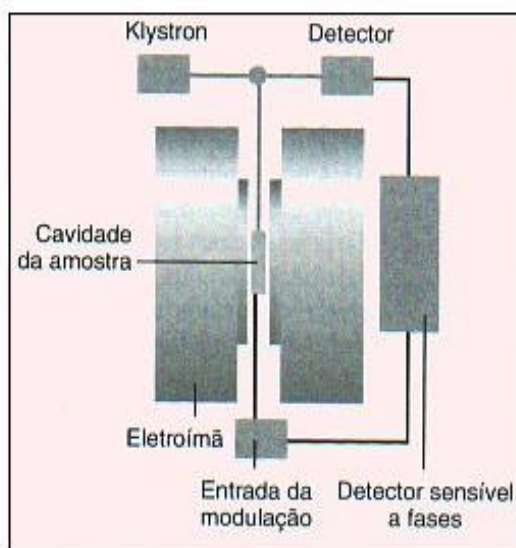


Figura 16 – Esquema de um espectrômetro EPR.⁵³

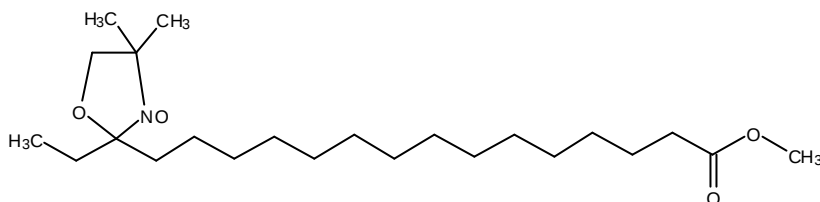


Figura 17 – Estrutura química do marcador de spin 16-MESL.⁵⁶

A “estrutura hiperfina” é a interação magnética do spin do elétron com os momentos de dipolo magnético dos núcleos do radical.⁵³ O radical nitróxido é muito estável e inerte, e sua interação hiperfina possui três linhas da estrutura do nitrogênio ($I = 1$, $m_I = -1, 0$ e $+1$).^{54,55} O desdobramento hiperfino, A , do nitróxido (NO) varia com a orientação do campo magnético relativo ao eixo do NO (interação anisotrópica). A anisotropia da interação hiperfina nuclear surge da interação dipolar do momento magnético do elétron com o momento magnético do núcleo e é caracterizada por três valores: A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} , onde o eixo-x dá a direção da ligação NO e o eixo-z está ao longo do orbital $2p_z$ do nitrogênio.

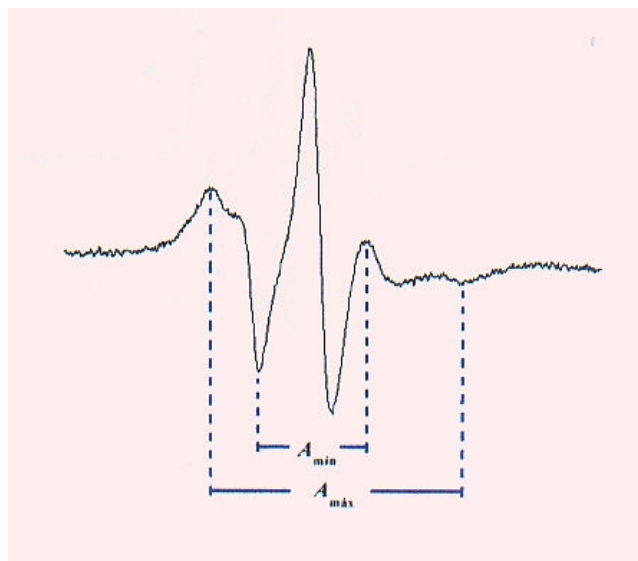


Figura 18 – Espectros de EPR de 5-SASL em vesículas de DODAB em água, abaixo da T_m (45 °C) do surfactante, indicando os parâmetros de fluidez $A_{máx}$ e $A_{mín}$.⁵⁶

Quando o campo magnético é aplicado na direção z, o valor de A é máximo (A_{zz}). Os parâmetros $A_{máx}$ e $A_{mín}$, são mostrados na Fig.18 para o espectro de 5-SASL em vesículas de DODAB. A largura das linhas no desdobramento hiperfino é sensível à velocidade de rotação do marcador; quando o movimento de rotação diminui, em meio rígido, as linhas se alargam, pois o movimento do marcador é lento.^{56,57}

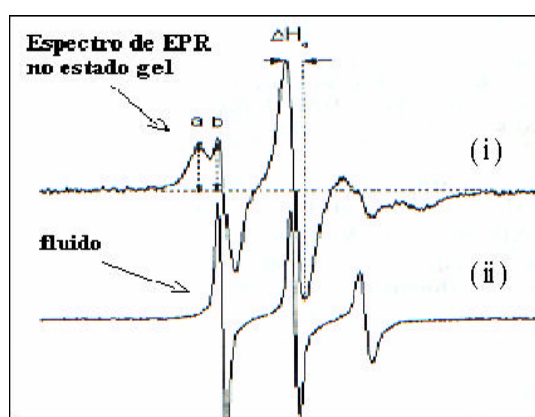


Figura 19 - Espectros EPR de 5-MESL, (i) abaixo 15 °C e (ii) acima 50 °C da $T_m \sim 42,7$ °C de vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM.⁵⁷

O espectro resultante provém da soma de todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético aplicado, e $A_{\text{máx}}$ é uma mistura de ordem e mobilidade.

Em bicamadas vesiculares, as moléculas anfifílicas apresentam certa mobilidade e ordem, e o grau de organização e mobilidade podem ser avaliados também pela largura da segunda linha (hiperfina), νH_0 , que corresponde ao número de spin $m_I = 0$ do nitrogênio, e pela razão b/a das amplitudes, em função da temperatura (Fig. 19).⁵⁷

2. Objetivos

Os objetivos gerais desta tese são:

- Investigar a transição vesícula-micela em dispersões mistas de surfactantes dialquilados catiônicos DODAC, DODAB e DDAB, aniônico DHP e zwitteriônico DPPC, com surfactantes monoalquilados não-iônicos $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e zwitteriônico, HPS,
- Monitorar a transição vesícula-micela pela adição de $C_{12}E_n$ e HPS a vesículas catiônicas e aniônicas usando métodos espectroscópicos e calorimétricos, e verificar o efeito de eletrólitos nessa transição e na T_m das vesículas catiônicas,
- Determinar a T_m e as concentrações críticas de surfactantes nas quais ocorre mudança estrutural nas vesículas devido à adição de surfactante monoalquilado.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

As vesículas foram preparadas usando DDAB (Kodak), DODAC, DODAB, DHP (Sigma) e DPPC (Avanti). DODAC foi obtido de DODAB por troca iônica; ambos recristalizados. HPS (Sigma) recristalizado, foi gentilmente cedidos pela Dra. Iolanda M. Cuccovia (IQUSP). Amberlyst A-26 (Aldrich), DPB (Aldrich), C₁₂E₅, C₁₂E₇ e C₁₂E₈ (Nikko Chemicals, Japão), HEPES (Sigma), NaCl (Merck), D(+)-glicose anidra (Merck), sacarose (Merck) P.A., uréia (Merck), acetona (Merck), metanol (Merck), 16-MESL (Sigma) e P₂O₅ (Carlo Erba), foram usados conforme adquiridos. Água bidestilada e deionizada, com baixa condutividade (18,2 mΩ/cm) foram usada na preparação das amostras.

3.1.1. Obtenção de DODAC por troca iônica e recristalização

Pesou-se 10 g da resina de troca iônica Amberlyst A-26 (Aldrich) e hidratou a em água bidestilada. Em seguida retirou-se, a vácuo, o ar adsorvido pela resina, e depois levou-se para uma coluna cromatográfica, que foi submetida a 500 ml de solução de NaCl 1 M, e lavou-se exaustivamente a resina em coluna com água bidestilada até não observar mais (por condutividade) a presença de íons Cl⁻ dispersos no eluente. Logo após, lavou-se a resina em coluna cromatográfica novamente com eluente metanol até homogeneizar e compactar a resina na coluna. Diluiu-se 2 g de DODAB em metanol e submeteu-se esta amostra na coluna com adição sucessiva do eluente metanol. Evaporou-se o eluente colhido em um evaporador rotatório, e obteve a amostra de DODAC. Recristalizou-se DODAC em acetona em banho-maria a 50 °C até total dissolução dos cristais adicionando algumas gotas de metanol. Deixou-se a solução de DODAC em repouso por aproximadamente 15 h. para a formação dos cristais que foram filtrados a vácuo. Os cristais de DODAC foram secados sob pressão reduzida em um dessecador contendo P₂O₅.

3.2. Preparo das vesículas

As vesículas espontâneas (não-sonicadas): foram preparadas por diluição simples do surfactante no solvente adequado, acima da T_m do surfactante. Vesículas de DODAX e DDAB foram preparadas em água ou NaCl 1,0 mM, sacarose, glicose e uréia 100 mM. Vesículas de DHP foram preparadas em tampão HEPES 10 mM, pH 8,0. DPPC foi diluído em clorofórmio, que foi evaporado sob fluxo de N_2 , formando um filme transparente do surfactante no fundo do recipiente, que foi deixado sob vácuo em um dessecador por ~12 horas para total remoção do clorofórmio. Em seguida, adicionou-se um volume adequado de tampão fosfato, pH = 7,4 e agitou-se a amostra em banho-maria com a temperatura acima de 20 °C de sua $T_m \cong 41$ °C, e assim para todas as outras vesículas em seus solventes adequados (água e tampão). As dispersões estoques foram diluídas, para a concentração desejada, para medidas de turbidez e DSC. Para medidas de DSC, as amostras foram desgaseificadas (thermo Vac MicroCal) por 8 min. a 25 °C antes de serem injetadas na cela do calorímetro.

Vesículas extrudadas: As dispersões de vesículas espontâneas de DODAX e DHP 1,0 mM foram extrudadas (Avanti mini-extruder) por 15 vezes, a 55 °C (acima, portanto, da $T_m = 45$ °C) e DHP a 70 °C. A dispersão passou, sob pressão manual, com o auxílio de duas seringas, uma de cada lado da membrana de extrusão lentamente por uma membrana de polycarbonato com diâmetro de poro definido 0.1 μm (Avanti). Após a extrusão, diluiu-se a dispersão extrudada para 1,0 mM, e verificou-se, por medidas de turbidez a formação de vesículas menores do que as não-extrudadas (as extrudadas têm menor turbidez).

3.3. Preparo de vesícula com sonda fluorescente

Preparou-se uma solução clorofórmica da sonda fluorescente (DPB, B4A ou 4H4A). Evaporou-se o clorofórmio, sob fluxo contínuo de N_2 , e obteve-se um filme no fundo do frasco (tubo de ensaio). Em seguida, adicionou-se um volume adequado de solução vesicular de DODAX ($X = Cl^-$ e Br^-) 1,0 mM, de DHP 1,0

mM ou DPPC 1,0 mM. Essas misturas foram agitadas em banho-maria em 60 °C por aproximadamente 2 horas para facilitar a incorporação da sonda nas vesículas. Depois de preparadas, deixaram-se as dispersões em repouso protegidas da luz por 24 horas. Para a preparação da solução vesicular de referência (sem a sonda), o procedimento foi o mesmo do item 3.2.

Vesículas sonicadas a banho: A dispersão de DODAX, com e sem a sonda DPB, é levada a um sonificador tipo banho (thorton). A sonicação a banho foi realizada 20 °C acima da T_m do surfactante por 20 a 30 min. até obter uma dispersão de vesículas opticamente transparente.

3. 4. Medidas de Turbidez

As medidas de turbidez foram realizadas nos comprimentos de onda (λ) de 200 até 500 nm ($T \cong 25$ °C), para as vesículas de DODAX ($X = Cl^-$ e Br^-), DHP, DPPC e de DDAB a 1,0 mM, na ausência e presença de $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) ou HPS. Usou-se um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001. Qualitativamente, a turbidez é proporcional ao tamanho das vesículas, podendo ser usada para observar mudanças morfológicas das vesículas induzidas por surfactante.

3.5. Medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Usamos um microDSC de alta sensibilidade (MicroCal, modelo VP-DSC), equipado com duas celas gêmeas de 0,5 ml cada, para as vesículas e solvente (referência) e um programa (Origin) para aquisição e análise dos resultados. O calorímetro mede a potência necessária para manter as celas da amostra e da referência à mesma temperatura, enquanto elas são aquecidas (upscan) ou resfriadas (downscan) a uma taxa constante de 60 °C/h. A análise térmica de referência para ambas às celas preenchidas com o solvente, é obtido sob as mesmas condições. A baixas concentrações, DODAX com alto grau de pureza apresenta um pico simples correspondente à transição principal, ie., centrado em T_m .⁵⁸ As medidas de DSC foram realizadas no laboratório do Dr. Watson Loh, Instituto de Química, Unicamp.

3.6. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

O rendimento quântico de fluorescência da amostra (Φ_{fs}) foi calculado pela equação.^{42,43}

$$\Phi_{fs} = [(I_{fs}\Phi_{fo})/I_{fo}] [(1-10^{-A_o})/(1-10^{-A_s})] \quad (13)$$

onde A_o e A_s são as absorbâncias de DPB, respectivamente em ciclo-hexano e na amostra, obtidas no mesmo $\lambda_{m\acute{a}x}$, do espectro da sonda, Φ_{fo} ,^{42,43,51} e I_{fs} e (I_{fo}) , são as intensidades de fluorescência, respectivamente da amostra e da referência excitados medidas da no mesmo $\lambda_{m\acute{a}x}$. $\Phi_{fo} \cong 0,44$ é o rendimento quântico de DPB em ciclo-hexano usado como referência a 25°C,^{42,43,51} e as medidas de fluorescência foram realizadas a 30 °C, usando um espectrofluorímetro Hitachi-F4500.

3.7. Anisotropia de fluorescência, $\langle r \rangle$

As condições e procedimentos experimentais usados nas medias de $\langle r \rangle$ foram as mesmas usadas na determinação de Φ_f . $\langle r \rangle$ foi calculado através da Eq. 18.^{51,52} com os polarizadores dispostos em posições adequadas nas direções dos feixes de excitação e emissão de fluorescência.

3.8. Medidas de EPR

Em um frasco contendo o marcador de spin 16-MESL 1% da concentração de DODAB 5 mM em água ou em solução iso-osmolar de NaCl 1 mM, adicionou-se a clorofórmio que foi evaporado sob fluxo de N_2 formando um filme, que foi colocado em vácuo por 2 horas. Sobre o filme adicionou-se a dispersão de DODAB 5 mM, e a mistura foi agitada em banho-maria a 20 °C acima da T_m , por um tempo suficiente, para a incorporação da sonda na bicamada das vesículas. Transferiu-se então 60 μ l da amostra para uma cela de quartzo tipo um capilar e inseriu-se na cavidade do espectrômetro para as medidas de EPR.

Os espectros de EPR foram obtidos em diferentes temperaturas, controladas por um termômetro Fluke 51 K/J, e a amostra colocada logo acima da cavidade de ressonância, e as medidas realizadas a cada 10 minutos. O

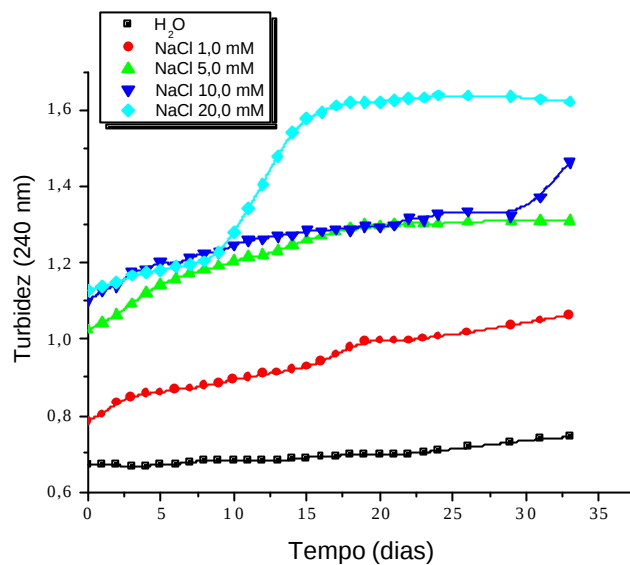
ajuste do aparelho foi o seguinte: campo magnético 3348,0 G, medido com um Bruker ER 035 NMR, resolução de 1024 pontos, potência de microondas de 10,107 mW, ganho de $7,1E+4$ e frequência de modulação de 100 KHz.⁵⁶ Os resultados foram tratados usando o software Winepr (Bruker). As medidas foram realizadas no laboratório de Biofísica e Física Médica – IFUSP sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund.

4. Resultados e discussão

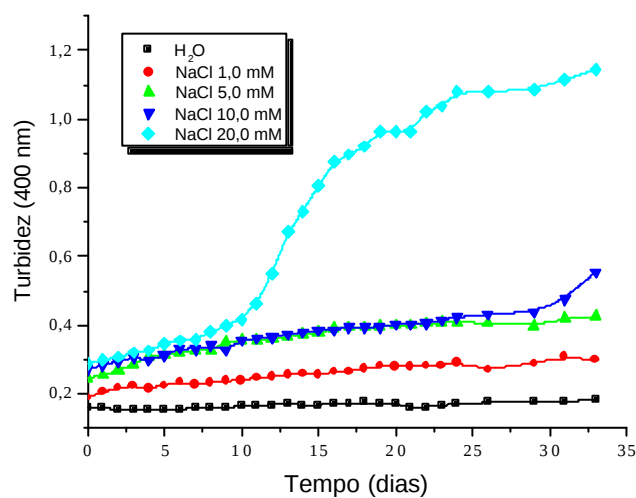
4.1. Turbidez: Efeito de co-soluto e co-surfactante nas propriedades de vesículas

Vesículas catiônicas DODAX espontâneas - A Fig. 20 mostra o efeito do tempo na turbidez das vesículas em água e solução de NaCl 1, 5, 10, 20 mM, para dois comprimentos de onda (240 e 400 nm). Verificamos que as vesículas mostram ser estáveis até dez dias, após esses dias observamos um aumento da turbidez na presença de 20 mM de NaCl, provavelmente devido à fusão das vesículas.

Resultados anteriores de cryo-TEM mostraram o fenômeno de reagregação dos monômeros em vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM, quando se aumenta a concentração de sal (NaCl) diminuindo o tamanho e variando a forma das vesículas.³⁴



(a)



(b)

Figura 20 - Turbidez em função do Tempo após a preparação das vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em diferentes concentrações de NaCl, $\lambda = 240$ nm (a) e 400 nm (b).

O aumento da concentração de surfactante em água também altera a estrutura das vesículas espontâneas de DODAB. Para 1,0 mM as vesículas de

DODAB são grandes, mas em concentrações maiores que 5,0 mM prevalece a estrutura lamelar estendida e gigantes.^{34,59}

A adição de micelas de $C_{12}E_8$ às vesículas de DODAB e DODAC induz transição vesícula-micela.^{59,60} Por medidas de turbidez verificou-se que $C_{12}E_n$ ($n = 5$ e 7) e HPS também induzem esta transição, porém, com efeitos distintos como mostram as Figs. 21 e 22. Na Tab. 2 são apresentados valores das razões críticas de concentração molar de saturação (R_{sat}) e solubilização (R_{sol}) obtidas para essas misturas, para os tempos de 5 e 15 min. de espera entre duas medidas consecutivas.

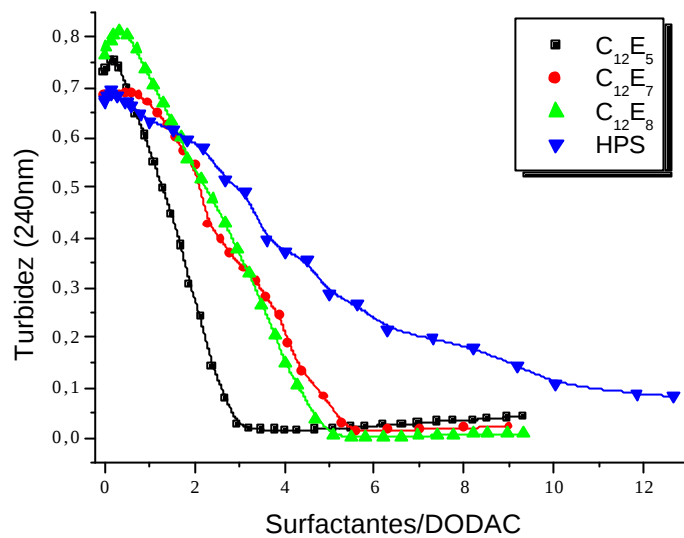
Verificamos que R_{sat} tende a diminuir com o tempo de espera, favorecendo o processo de solubilização do surfactante na bicamada das vesículas, formando vesículas mistas maiores. Este efeito é, em geral, mais pronunciado para as vesículas de DODAB, do que para as vesículas de DODAC. A mesma tendência foi também observada para R_{sol} .

Medidas realizadas após 5 e 15 min. de espera mostram que R_{sat} e R_{sol} variam de acordo com a natureza dos surfactantes, indicando que o tempo de equilíbrio do sistema depende da característica do surfactante. Entretanto, para as amostras aqui investigadas, o tempo de 15 min. é suficiente para os sistemas alcançar o equilíbrio. Os contra-íons Cl^- e Br^- , o tamanho da cabeça polar e das cadeias hidrocarbônicas também influenciam a solubilização dos surfactantes na vesícula, conforme reportado em outros trabalhos.^{59,60}

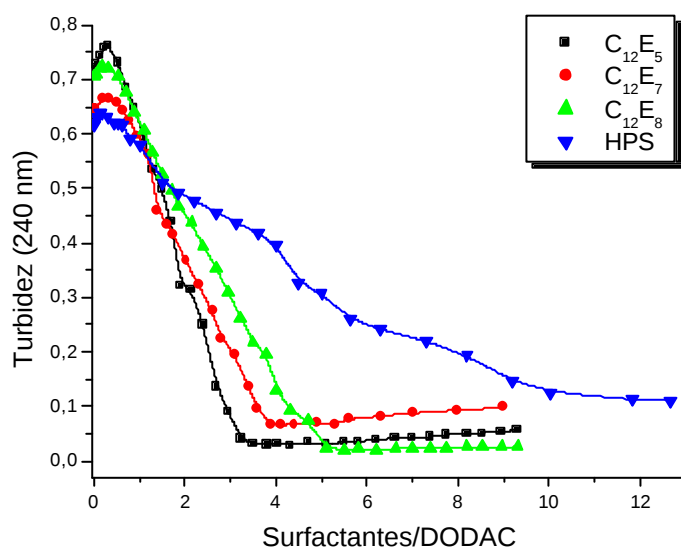
$C_{12}E_5$ por ter menor cabeça polar, e baixa CMC ($\sim 65 \mu M$),^{61,62} relativamente aos homólogos $C_{12}E_7$ e $C_{12}E_8$ (CMC = 70-100 μM),¹ o efeito da solubilização de DODAX por $C_{12}E_5$ tende a ser maior, independentemente do contra-íon (Tab. 2).

Em geral, há uma tendência da solubilização de DODAB pelos co-surfactantes obedecer à seqüência $C_{12}E_5 > C_{12}E_7 > C_{12}E_8 > HPS$, e, para um dado co-surfactante, DODAB < DODAC (Figs. 21 e 22). Ou seja, o processo de micelização do sistema é mais rápido para $C_{12}E_5$ refletidos nos valores menores de R_{sol} (Tab. 2), que varia de acordo com a seqüência acima. Para um dado co-

surfactante, a transição para micelas tende a ser mais rápido para DODAC do que para DODAB.^{6,7}

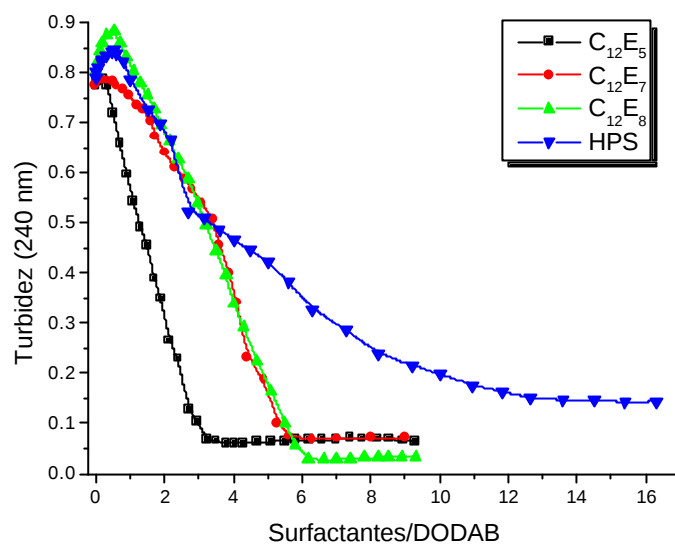


(a)

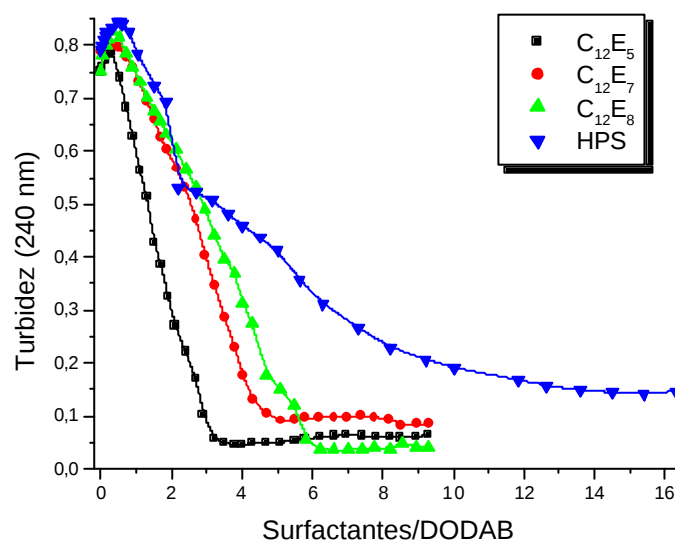


(b)

Figura 21 – Turbidez de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM, em função da razão molar surfactante/DODAC, para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 (a) e 15 min. (b).



(a)



(b)

Figura 22 - Turbidez de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em função da razão molar surfactante/DODAB, para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 (a) e 15 min. (b).

Tabela 2 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas espontâneas de DODAX ($X = \text{Cl}^-$ e Br^-) 1,0 mM, com C_{12}E_n ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, para dois diferentes intervalos de tempo de espera entre as medidas

Sistemas	Tempo de espera (min.)	R_{sat}	R_{sol}
$\text{C}_{12}\text{E}_5/\text{DODAC}$	5	0,3	3,2
$\text{C}_{12}\text{E}_7/\text{DODAC}$	5	0,5	5,6
$\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DODAC}$	5	0,3	5,1
HPS/DODAC	5	0,2	~11
$\text{C}_{12}\text{E}_5/\text{DODAC}$	15	0,3	3,5
$\text{C}_{12}\text{E}_7/\text{DODAC}$	15	0,3	3,8
$\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DODAC}$	15	0,3	5,1
HPS/DODAC	15	0,2	~11
$\text{C}_{12}\text{E}_5/\text{DODAB}$	5	0,2	3,2
$\text{C}_{12}\text{E}_7/\text{DODAB}$	5	0,2	5,6
$\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DODAB}$	5	0,5	6,2
HPS/DODAB	5	0,5	~12
$\text{C}_{12}\text{E}_5/\text{DODAB}$	15	0,2	3,4
$\text{C}_{12}\text{E}_7/\text{DODAB}$	15	0,2	5,1
$\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DODAB}$	15	0,3	6,2
HPS/DODAB	15	0,4	12,5

HPS têm um efeito menor na solubilização de DODAX, relativamente a C_{12}E_n , observado pelo maior valor de R_{sol} (Tab. 2). Já o processo de saturação das vesículas pelos surfactantes exibe pouca variação entre os sistemas, e R_{sat} varia muito pouco, apenas de 0,2 a 0,5.

Comparando os valores das Tabs. 2 e 3, observamos, em geral, um pequeno efeito do tamanho das vesículas de DODAX em R_{sat} e R_{sol} . Assim, regra geral, a curvatura da bicamada das vesículas tem pequeno efeito na solubilização de DODAX pelos co-surfactantes aqui investigados.

Vesículas de DODAX extrudadas – A Fig. 23 mostra os espectros de turbidez de vesículas de DODAB extrudadas e espontâneas em diferentes concentrações. A

mudança na curva de espalhamento de luz (índice de refração) em concentrações mais elevadas sugere mudança estrutural nos agregados de DODAB.

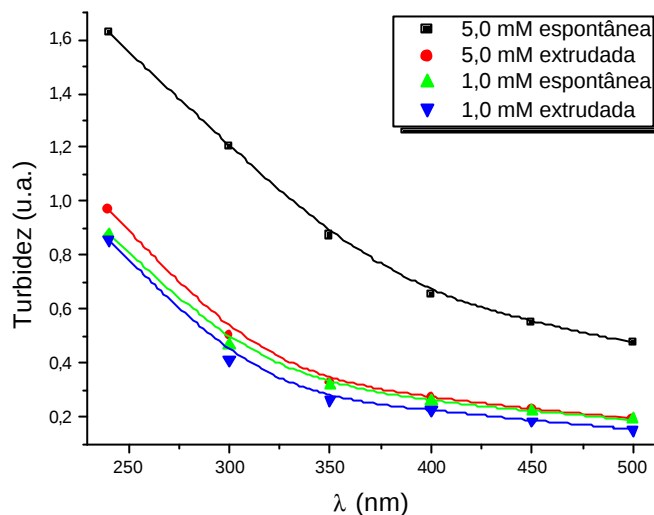
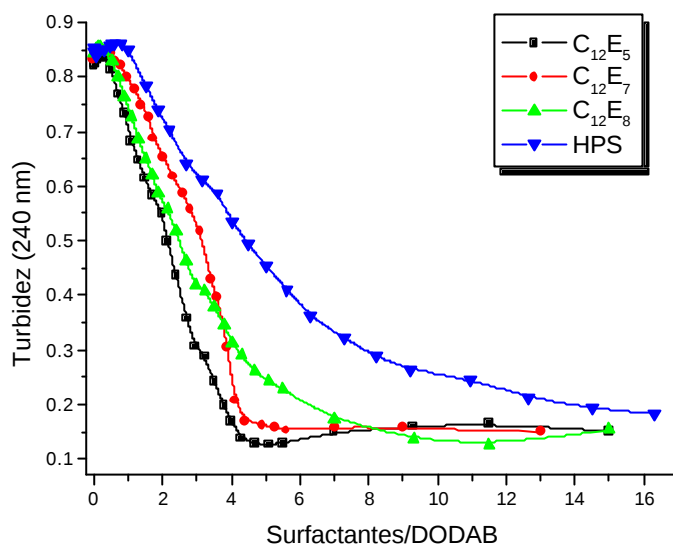


Figura 23 - Turbidez, em função do comprimento de onda da radiação incidente, de vesículas espontâneas e extrudadas ($F = 0.1 \mu\text{m}$) de DODAB 1,0 e 5,0 mM.

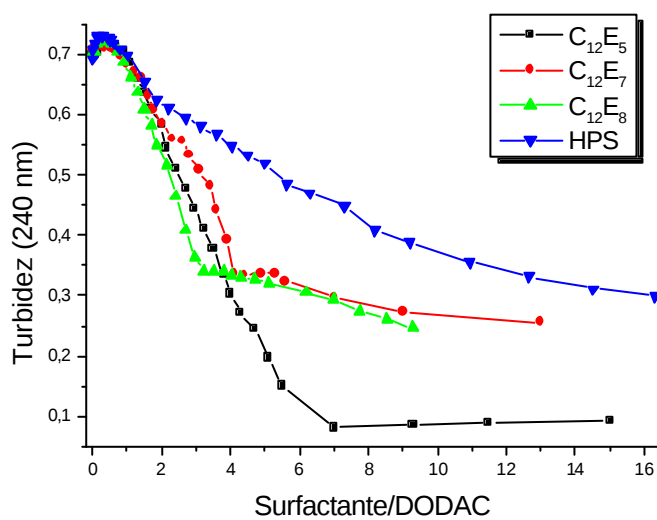
As vesículas extrudadas ($F = 0.1 \mu\text{m}$) de DODAX são unilamelares (LUV), menores do que as correspondentes espontâneas, porém, maiores do que as sonificadas (SUV), essas, além de pequenas, são menos uniformes e têm a forma de lentes, enquanto que as extrudadas tendem ao formato esférico.^{18,36,37,63,64}

Observamos (Fig. 24a) que R_{sol} das vesículas extrudadas de DODAB variam de 4 a 6, de acordo com a sequência $\text{HPS} > \text{C}_{12}\text{E}_8 > \text{C}_{12}\text{E}_5 \sim \text{C}_{12}\text{E}_7$, e, para as vesículas de DODAC (Fig.24b), os surfactantes HPS, C_{12}E_8 e C_{12}E_7 não evidenciam a total solubilização da vesícula como ocorre para C_{12}E_5 , verificada pelas medidas de turbidez. Esses valores estão próximos aos das vesículas sonificadas de DODAX, obtido por fluorescência, apesar de mostrar independentemente da técnica um valor da R_{sol} não muito definido para as

vesículas de DODAX quando estão interagindo com $C_{12}E_n$ ou devido a erros experimentais (vide Fig. 47 e tab. 22).



(a)



(b)

Figura 24 – Efeito da razão molar surfactante/DODAX na turbidez de vesículas extrudadas ($F = 0.1 \mu m$) de DODAB (a) e DODAC 1,0 mM (b) para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 min.

Tabela 3 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas extrudadas ($F = 0.1 \mu\text{m}$) de DODAB e DODAC 1,0 mM, com $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, obtidos por medidas de turbidez em intervalos de 5 min. de mistura.

Sistema	R_{sat}	R_{sol}
$C_{12}E_5/\text{DODAB}$	0,3	4,5
$C_{12}E_7/\text{DODAB}$	0,1	4,3
$C_{12}E_8/\text{DODAB}$	0,2	~8
HPS/DODAB	0,8	~12
$C_{12}E_5/\text{DODAC}$	0,5	7,0
$C_{12}E_7/\text{DODAC}$	0,2	4,1
$C_{12}E_8/\text{DODAC}$	0,2	3,2
HPS/DODAC	0,3	~11

Para as vesículas extrudadas de DODAB, R_{sat} é maior para HPS a ($R_{\text{sat}} \sim 0,8$, Tab. 3), provavelmente por ter cadeia hidrofóbica maior interagindo mais com a bicamada da vesícula do que com os não-iônicos, ou devido a interação da carga negativa do surfactante (grupo SO_3^-) com a carga positiva $\text{R}_2(\text{CH}_3)_2\text{N}^+\text{Br}^-$, aumentando R_{sat} e dificultando o processo de transição vesícula-micela, ou devido ao efeito do contra-íon das vesículas (Br^- ou Cl^-), pois, para as vesículas de DODAC extrudadas ou espontâneas, independentemente do surfactante (surfactante/DODAC) a R_{sat} não mostra mudanças significativamente, (ver Tab.2 e Tab. 3).

Observamos que $C_{12}E_5$ solubiliza mais rapidamente na bicamada das vesículas extrudadas de DODAB e DODAC ($< R_{\text{sat}}$), do que os surfactantes homólogos mais hidrofílicos ($n = 7$ e 8). A menor hidrofilicidade de $C_{12}E_5$ favorece a formação de micelas em fase aquosa ($\text{CMC} \sim 65 \mu\text{M}$), aumentando a interação com as vesículas de DODAB e, portanto, o poder de solubilização de DODAB (Fig. 24a e Tab. 3).

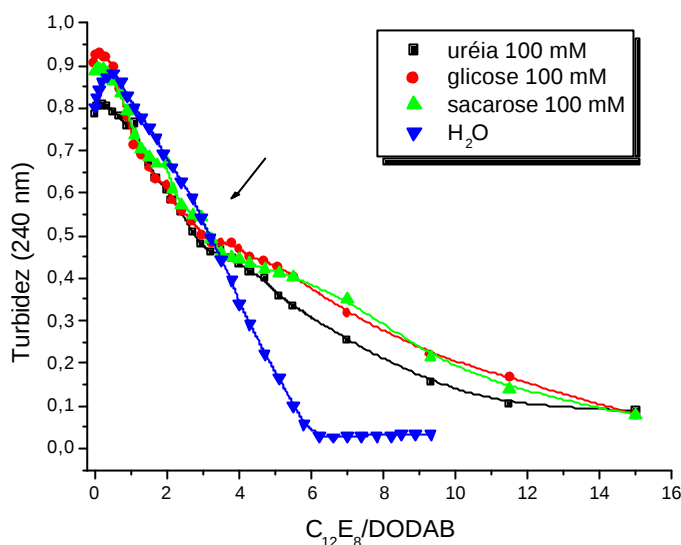


Figura 25 – Efeito de uréia, glicose e sacarose na turbidez de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em função da razão molar para $C_{12}E_8/DODAB$, medidas com intervalo de tempo de 5 min.

Efeito de co-solutos em vesículas espontâneas de DODAB - Os co-solutos NaCl, uréia, sacarose e glicose modificam as propriedades do solvente e, portanto, influenciam a estrutura e estabilidade das vesículas, via interação com a região da superfície vesicular. O efeito desses co-solutos na turbidez das vesículas de DODAB, na ausência e presença de surfactante, é mostrado nas Figs. 25 e 26 e nas Tabs. 4 e 5.

Todos os co-solutos (iônicos e não-iônicos) diminuem R_{sat} (solubilizam menos nas vesículas) e aumentam R_{sol} (solubilizam mais lentamente as vesículas), mas tornam os valores de R_{sol} menos definidos não evidenciando o modelo de três estágios verificado na Fig. 25 e 26 indicado pelas setas, ou seja, a transição vesícula-micela ocorre em uma região de maior de concentração dos co-surfactantes. Esses resultados sugerem que os co-solutos favorecem a fusão de vesículas mistas em uma concentração intermediária de co-surfactantes, retardando a transição para micela.

Tabela 4 – Efeito de co-solutos em R_{sat} e R_{sol} de $C_{12}E_8$ /DODAB/água em vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM obtidos por medidas de turbidez.

Soluto	R_{sat}	R_{sol}
(água)	0,5	6,2
NaCl (1 mM)	0,3	>40
Uréia (100 mM)	0,1	11,5
Glicose (100 mM)	0,2	11-15
Sacarose (100 mM)	0,3	11-15

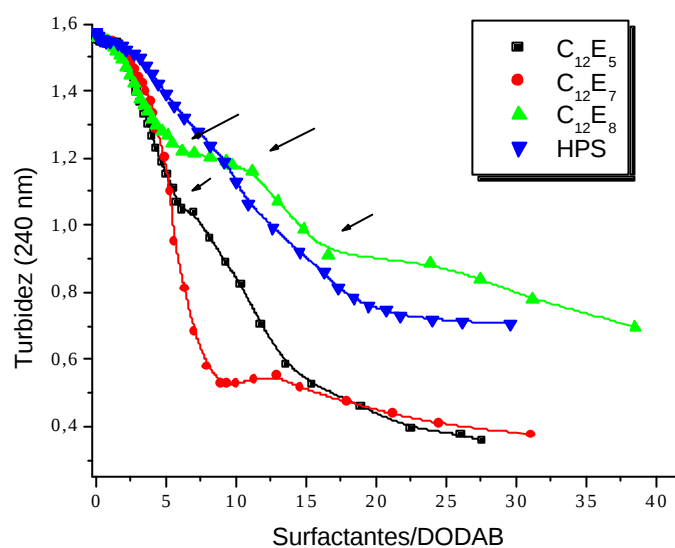


FIGURA 26 - TURBIDEZ DE VESÍCULAS ESPONTÂNEAS DE DODAB 1,0 mM, EM SOLUÇÃO DE NaCl 1,0 mM, EM FUNÇÃO DA RAZÃO MOLAR SURFACTANTE/DODAB PARA $C_{12}E_N$ ($N = 5, 7$ E 8) E HPS, MEDIDAS COM INTERVALO DE TEMPO 5 MIN.

Tabela 5 – Valores de R_{sat} e R_{sol} de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM, em solução de NaCl 1,0 mM, com $C_{12}E_n$ e HPS, obtidos por medidas de turbidez. Os valores entre parênteses são em água.

Sistema	R_{sat}	R_{sol}
$C_{12}E_5/\text{DODAB}$	0,1 (0,2)	>15 (3,2)
$C_{12}E_7/\text{DODAB}$	0,1 (0,2)	9,0 (5,6)
$C_{12}E_8/\text{DODAB}$	0,3 (0,5)	>40 (6,2)
HPS/DODAB	0,2 (0,5)	~30 (12)

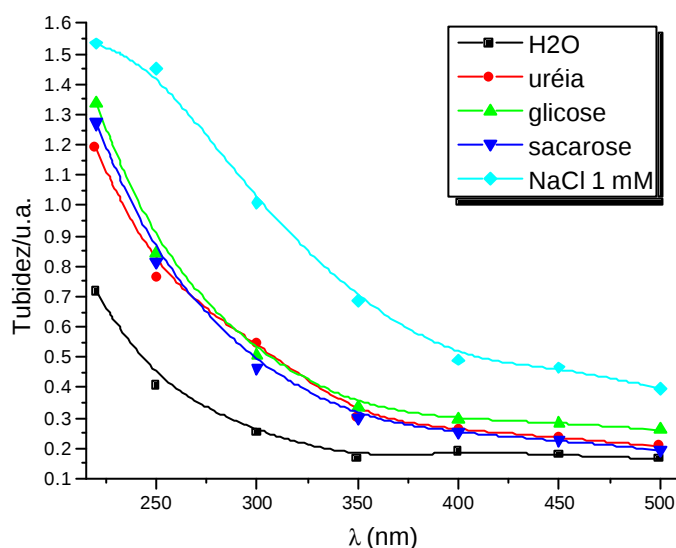


Figura 27 – Turbidez, em função do comprimento de onda da radiação incidente, de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM em água e em solução de NaCl 1,0 mM e uréia, sacarose e glicose 100 mM

A turbidez das vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM em água é menor do que em solução de NaCl 1,0 mM, uréia, glicose ou sacarose 100 mM (Fig. 27). Esses co-solutos favorecem a auto-agregação dos surfactantes

(favorece a fusão de vesículas), e por isso a solubilização das vesículas ocorre em concentrações maiores de surfactante.⁶⁵

Vesícula aniônica de DHP espontânea e extrudada - A Fig. 28 mostra as curvas de turbidez de vesículas espontâneas de DHP em diferentes concentrações. A turbidez aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de DHP, sugerindo uma mudança estrutural em concentrações maiores, provavelmente formando vesículas multilamelares grandes (MLV). Essa mudança estrutural foi observada recentemente por Feitosa e Amaral, através de SAXS³³ para as vesículas de DODAB e DHP.

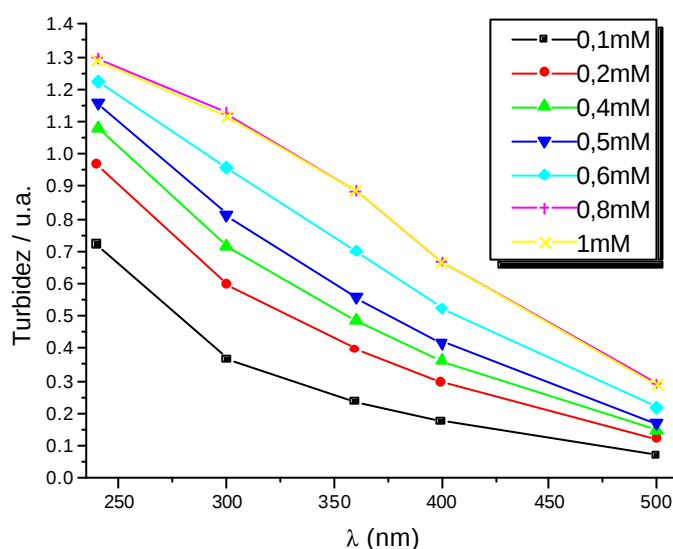
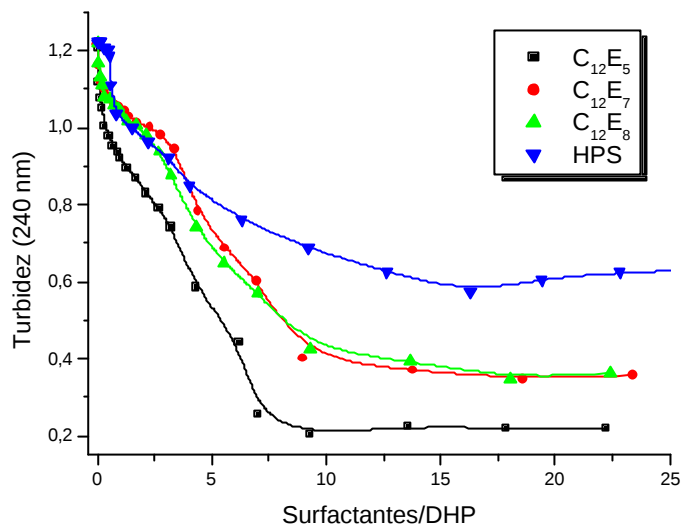


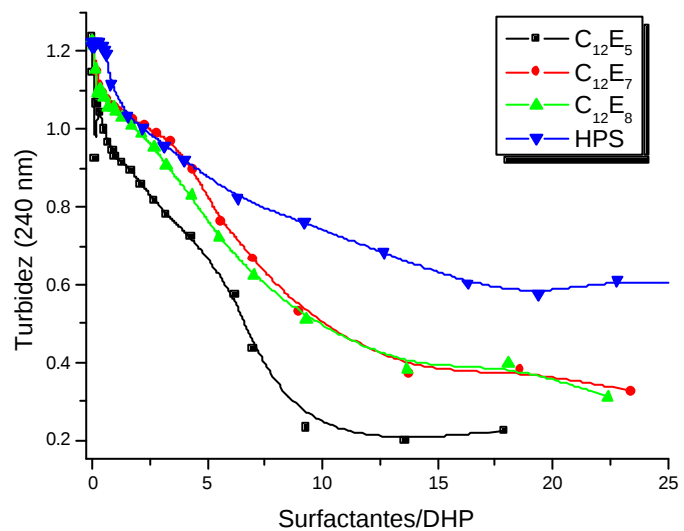
Figura 28 – Turbidez, em função do comprimento de onda, da radiação incidente, de vesículas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, para diferentes concentrações de DHP.

Na Fig. 29a vemos o efeito de $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7, 8$) na turbidez das vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM. Em geral, R_{sat} diminui e R_{sol} aumenta para todos os sistemas surfactante/DHP com o aumento do tempo. R_{sat} varia de acordo com a sequência $C_{12}E_5 > C_{12}E_7 > C_{12}E_8 > HPS$ (Fig. 29 e Tab. 6), ou seja, o efeito

da concentração de surfactante na solubilização de DHP segue a mesma sequência do efeito em DODAX.



(a)



(b)

Figura 29 - Turbidez de vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, em função da razão molar surfactante/DHP, para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$, e 8) e HPS, medidas nos intervalos de tempo de 5 (a) e 15 min. (b).

Tabela 6 – Valores de R_{sat} e R_{sol} , obtidos por medidas de turbidez, das vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em solução tampão HEPES 10,0 mM pH = 8,0, com $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, para diferentes intervalos de tempo entre as medidas.

Sistema	tempo de espera (min.)	R_{sat}	R_{sol}
$C_{12}E_5$ /DHP	5	0,2	7,9
$C_{12}E_7$ /DHP	5	-	9,0
$C_{12}E_8$ /DHP	5	-	9,3
HPS/DHP	5	0,3	16,3
$C_{12}E_5$ /DHP	15	0,1	9,3
$C_{12}E_7$ /DHP	15	-	13,6
$C_{12}E_8$ /DHP	15	-	13,6
HPS/DHP	15	0,2	16,3

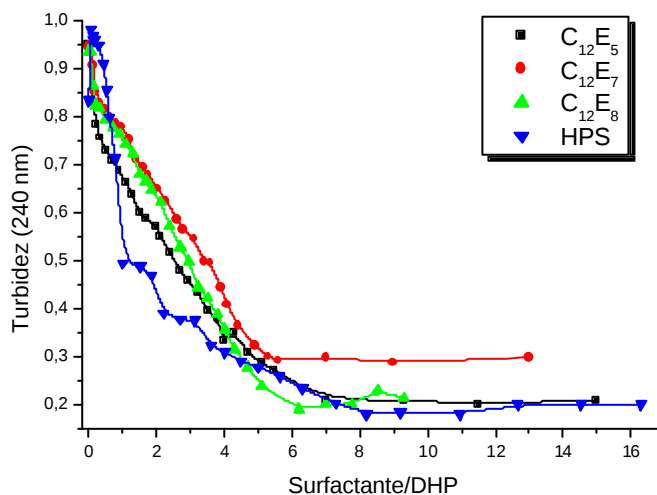


Figura 30 – Efeito da razão molar surfactante/DHP na turbidez de vesículas extrudadas ($\phi = 0.1 \mu\text{m}$) de DHP 1,0 mM para $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, medidas com intervalo de tempo de 5 min.

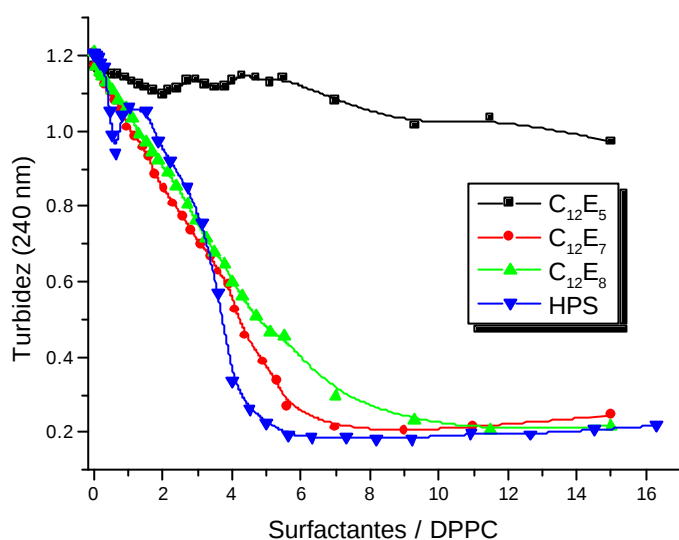
Independentemente dos surfactantes, as vesículas extrudadas de DHP 1,0 mM mostram ser mais solubilizadas (Fig. 30 e Tab. 7). É o esperado quando comparamos com as vesículas espontâneas (MLV)³³ em relação as extrudadas (LUV) de DHP 1,0 mM, a R_{sol} segue a seqüência de $C_{12}E_7 > C_{12}E_8 > C_{12}E_5 > \text{HPS}$. Não observamos grandes variações nos valores da $R_{\text{sol}} \sim 6,0 - 7,0$ para as vesículas extrudadas com o $C_{12}E_n$ (Tab. 7), como também verificamos para as espontâneas de DHP (Tab. 6), medidas no mesmo intervalo de tempo (5 min.) ($C_{12}E_n/\text{DHP} \sim 8,0 - 9,0$).

Tabela 7 – Valores de R_{sat} e R_{sol} de vesículas extrudadas ($\phi = 0.1 \mu\text{m}$) de DHP 1,0 mM, em solução tampão HEPES 10,0 mM pH = 8,0, com $C_{12}E_n$ e HPS, obtidos por medidas de turbidez com intervalo de tempo de 5 min.

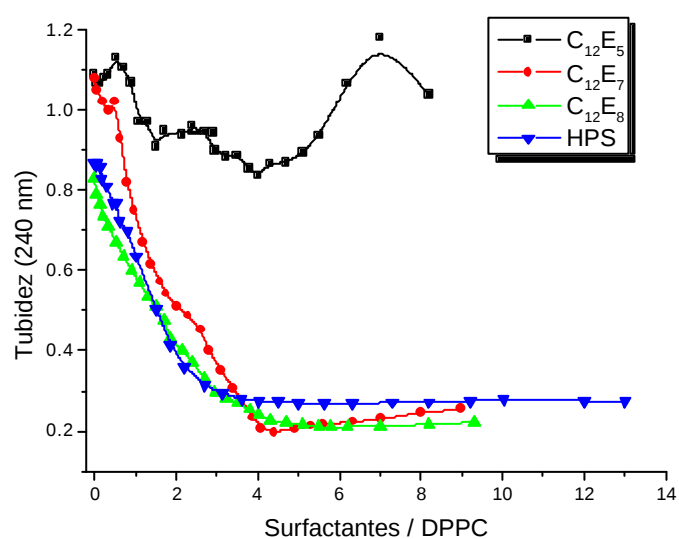
Sistema	R_{sat}	R_{sol}
$C_{12}E_5/\text{DHP}$	-	7,0
$C_{12}E_7/\text{DHP}$	0,04	5,6
$C_{12}E_8/\text{DHP}$	0,04	6,2
HPS/DHP	0,1	8,2

Vesículas espontâneas zwiteriônica de DPPC - O efeito de co-surfactantes nas vesículas zwitteriônicas espontâneas de DPPC, investigado neste trabalho, serve para comparar com o das vesículas de DODAX e DHP. Para os sistemas $C_{12}E_n/\text{DPPC}$ ($n = 5, 7$ e 8), Fig. 31, não observamos R_{sat} , e, curiosamente, $C_{12}E_5$ não solubiliza as vesículas de DPPC. Após sete dias de estocagem das vesículas de DPPC, verificamos que o perfil da curva de turbidez se altera muito pouco, indicando estabilidade das vesículas espontâneas de DPPC no período. Após esse período, R_{sat} continua não existindo e R_{sol} se torna menor e mais definida (Fig. 31 e Tab. 8). A solubilidade das vesículas de DPPC

aumenta após sete dias de estocagem. A ausência de R_{sat} nos sistemas surfactantes surfactante/DPPC (Fig. 31) pode estar relacionado à estrutura multilamelar das vesículas de DPPC. A fim de confirmar esta afirmativa, estudaremos o efeito de surfactante nas vesículas extrudadas (unilamelares) de DPPC.



(a)



(b)

FIGURA 31 - TURBIDEZ DE VESÍCULAS ESPONTÂNEAS DE DPPC 1,0 MM EM TAMPÃO FOSFATO, PH = 7,4, EM FUNÇÃO DA RAZÃO MOLAR SURFACTANTE/DPPC PARA $C_{12}E_N$ (N = 5, 7 E 8) E HPS, MEDIDAS COM INTERVALOS DE TEMPO 5 MIN., E APÓS 1 (A) E 7 (B) DIAS DO PREPARO DAS VESÍCULAS.

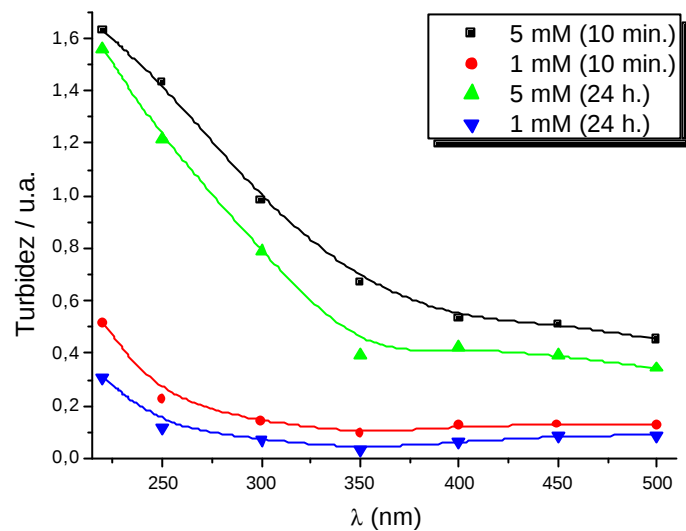
Tabela 8 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4, para $C_{12}E_n$ (n = 5, 7 e 8) e HPS.

Sistema	tempo (dias)	R_{sol}
$C_{12}E_5$ /DPPC	1	-
$C_{12}E_7$ /DPPC	1	7,0
$C_{12}E_8$ /DPPC	1	9,3
HPS/DPPC	1	6,3
$C_{12}E_5$ /DPPC	7	-
$C_{12}E_7$ /DPPC	7	4,2
$C_{12}E_8$ /DPPC	7	4,3
HPS/DPPC	7	3,6

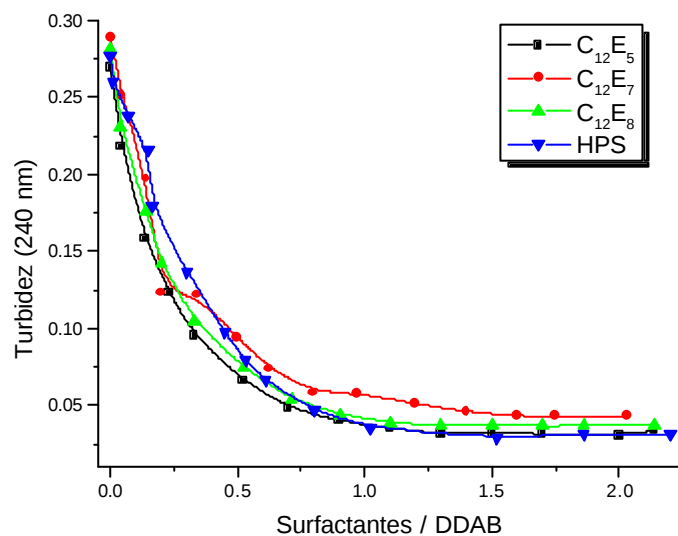
Vesículas de DDAB - Para as vesículas espontâneas de DDAB 1,0 e 5,0 mM, em água, a turbidez da amostra em 24 horas é menor do que a turbidez medida em 10 min. após a preparação das vesículas (Fig. 32a), mostrando que elas são meta-estáveis. Em outro trabalho, foi observada por Cryo-TEM uma mudança no tamanho dos agregados de DDAB puro, de 1 para 2 dias após o preparo das vesículas.⁶⁶

Obtivemos, por DSC, $T_m = 15,7$ °C para as vesículas espontâneas de DDAB 5,4 mM em água, confirmando a existência de vesículas nessa concentração. DDAB possui uma CMC em torno de 50 μ M.^{67,68}

Para os sistemas co-surfactante/DDAB/água, a transição vesícula-micela ocorre em dois estágios (Fig. 32b), com $R_{sol} \sim 0,8$ e $R_{sol} = 0$ para todos os surfactantes investigados, $C_{12}E_n$ (n = 5, 7 e 8) e HPS.



(a)



(b)

Figura 32 – (a) Turbidez em função do comprimento de onda da radiação incidente, para diferentes tempos e concentração de DDAB. (b) Turbidez em função da razão molar co-surfactante/DDAB, realizadas em intervalos de 5 min. após cada mistura.

Estes resultados estão de acordo com os reportados anteriormente pelo grupo ($R \sim 0,4$ a $0,6$), usando um tempo de mistura da amostra de 15 min.⁶⁹

Comparando os resultados para DDAB e DODAB, observamos que, para todos os surfactantes adicionados, R_{sol} aumenta com o aumento da dupla cadeia hidrocarbônica, ou seja, a solubilização das vesículas aumenta inversamente proporcional ao comprimento da dupla cadeia hidrocarbônica. Por outro lado, R_{sat} tem um comportamento inverso, aumenta com o aumento da cadeia. Observamos ainda que, ao contrário de DODAB, R_{sol} para DDAB independe do surfactante adicionado.

4.2. DSC. Efeito de co-solutos e co-surfactantes nas propriedades de vesículas

Sistema DODAB/água – Os parâmetros obtidos nas curvas de DSC, ΔH , $\Delta T_{1/2}$ e T_m (Fig. 33 e Tab. 9) mostram que as propriedades termotrópicas, relacionadas à transição da fase gel-líquido cristalina (T_m), das vesículas espontâneas de DODAB, em geral variam muito pouco com a concentração do anfifílico, até 5 mM, e em 15 mM em relação a T_m , mostrando que, apesar de existir mudanças estruturais nesta faixa de concentração, já relatado em outro trabalho como estruturas uni para multilamelar, o valor da T_m não varia muito.³³

Somente o valores de ΔH e $\Delta T_{1/2}$ para DODAB 15,0 mM é menor em relação a 1,0 e 5,0 mM, e assim como a capacidade calorífica também é muito pequena.³⁷ Esta variação deve estar relacionada à fusão de vesículas com formação de estruturas macroscópica.

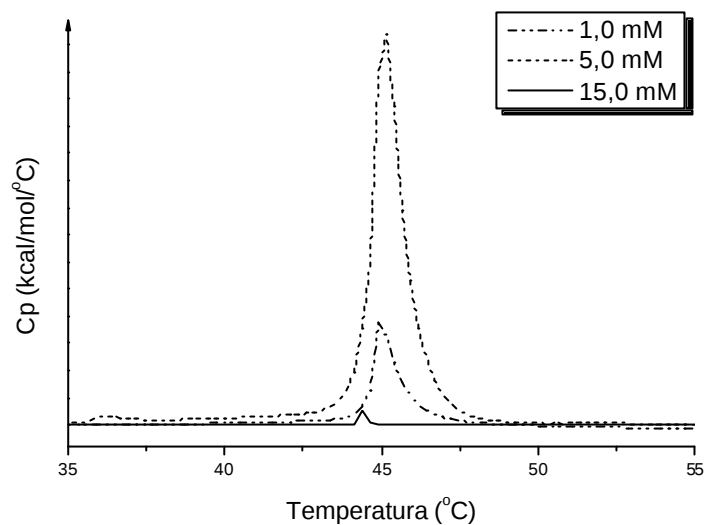


Figura 33 – Curvas DSC de aquecimento (up-scan), de vesículas espontâneas de DODAB em dispersão aquosa, em diferentes concentrações.

Tabela 9 – Valores de T_m , ΔH e $\Delta T_{1/2}$ de vesículas espontâneas de DODAB em diferentes concentrações.

Amostra / [DODAB] (mM)	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$	T_m (°C)
1,0	10,7	1,0	45,0
5,0	11,1	1,0	45,1
15,0	0,4	0,5	44,4

O efeito histerese na transição de fase gel líquido-cristalina de DODAX em dispersões vesiculares tem sido reportado na literatura,³⁶ mas ainda é pouco entendido. Verificamos que quando se aumenta o tempo de equilíbrio, a 60 °C, após uma medida “up-scan” (aquecimento), antes do down-scan (resfriamento) ser realizado, o valor da T_m obtido não varia com o processo endo e exotérmico, ou seja, a histerese não varia, para um tempo de espera de até 4 horas (Fig. 34 e Tab. 10).

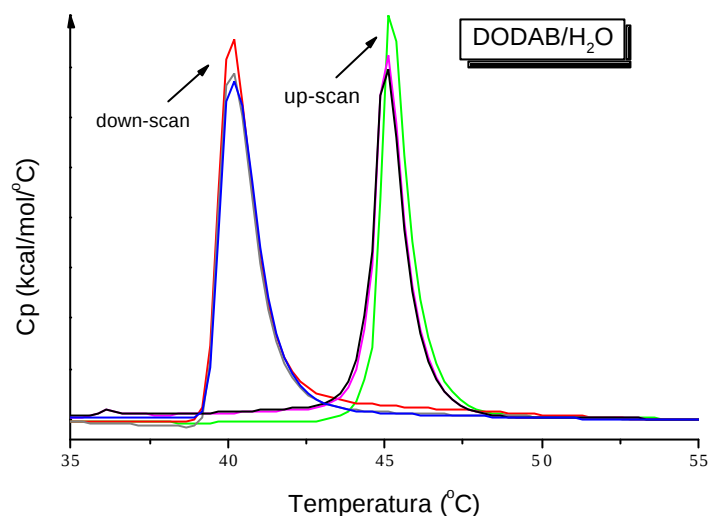


Figura 34 – Curvas de aquecimento e resfriamento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM, em diferentes tempos de equilíbrio antes da obtenção da curva de resfriamento, para os tempos de equilíbrio de 0,1 a 4 h.

As medidas DSC de vesículas fornecem a energia de interação entre as caudas hidrofóbicas na mudança de fase gel a líquida-cristalino, que está associada à propriedade do surfactante que forma determinada sistema vesicular em estudo. O efeito de NaCl nas vesículas de DODAB já foi investigado anteriormente por medidas de Cryo-TEM e DSC, e também verificado por medidas de turbidez (item 4.1), que a turbidez aumenta com o aumento da concentração de NaCl, por ocorrer formação de vesículas uni, bi e trilamelares.³⁴

Tabela 10 – Valores de T_m , ΔH e $\Delta T_{1/2}$ das vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em diferentes tempo de equilíbrio a 60 °C, obtidos por aquecimento (up-scan) e resfriamento (dow-scan) da amostra à taxa de 60 °C/h. O sinal negativo na entalpia indica que o processo é exotérmico no resfriamento.

Modo (tempo, hora)	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$	T_m (°C)
aquecimento (0)	47,4	1,0	45,1
resfriamento (0)	-61,0	1,3	39,0
aquecimento (1)	55,7	1,0	45,1
resfriamento (1)	-52,5	1,3	38,9
aquecimento (4)	56,6	1,0	45,1
resfriamento (4)	-56,4	1,5	38,9

Sistema DODAB/NaCl/água – Verificamos por medidas de DSC que a T_m das vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM aumenta com a concentração de NaCl (Fig. 35, Tab. 11). Esse aumento foi confirmado por medidas de EPR (Fig. 49a e b, Tab. 23) e por outras técnicas para as vesículas de DODAX.^{34,63,70,71} Este aumento da T_m é esperado, pois, em excesso de NaCl, DODAB comporta-se como DODAC, pois ocorre um aumento na concentração de Cl^- que compete com Br^- na região da interface das vesículas.

Os parâmetros associados à transição de fase gel líquido-cristalino obtidos dos termogramas DSC são mostrados na Tab.11. Além da T_m , $\Delta T_{1/2}$ e ΔH também aumentam com a concentração de NaCl. Esse aumento ocorre, provavelmente porque as moléculas de água na região das interfaces das vesículas difundem para o meio aquoso devido à competição com o contra-íon, deixando as interfaces mais desidratadas e, portanto, mais hidrofóbica, favorecendo a interação de van der Waals.³⁴

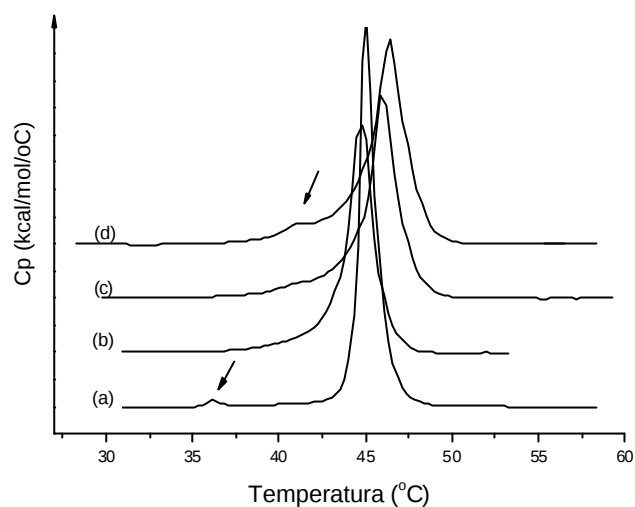


Figura 35 – Curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água (a) e em solução de NaCl 1,0 (b), 10,0 (c) e 20,0 mM (d).

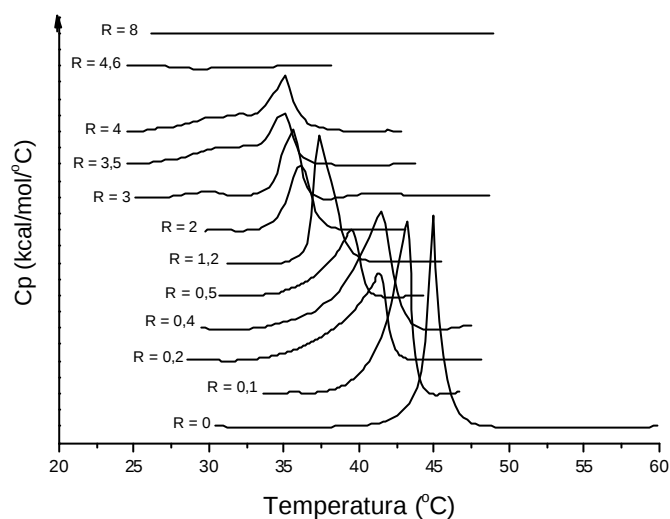
Nas curvas de DSC de DODAB 5,0 mM puro e em solução de NaCl (Fig. 35) apresentam pequenos picos antes da temperatura de transição de fase principal (T_m), indicados pelas setas (pré-transições). Elas mostram um deslocamento desses picos de 36 a 41 °C com o aumento da concentração de NaCl, indicando a mudança estrutural nessas vesículas, conforme reportado em trabalhos anteriores.³⁴

Tabela 11 – Parâmetros associados à transição de fase das vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água e em solução de NaCl.

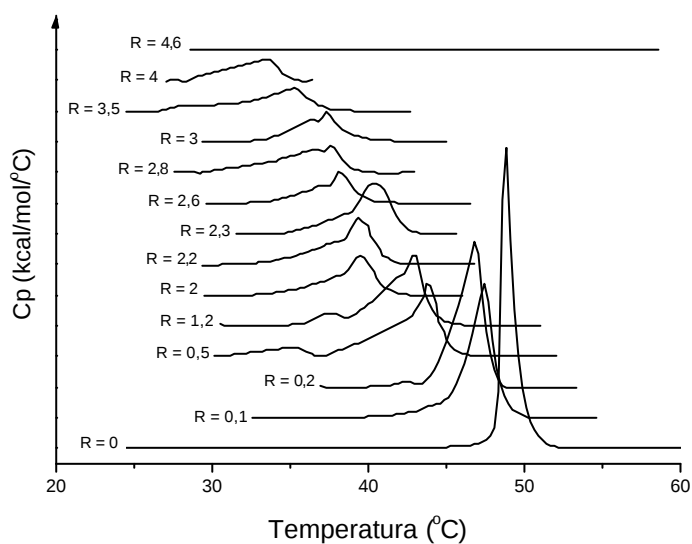
[NaCl] mM	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)
0	9,6	1,0	45,1
1,0	9,2	1,5	44,8
10,0	10	1,6	46,0
20,0	10,9	2,1	46,4

Sistemas surfactante/DODAX/água – As curvas DSC das vesículas espontâneas de DODAX, na ausência e presença de $C_{12}E_5$ (Fig. 36 e Tabs. 12 e

13), mostram que a total solubilização das vesículas, ocorre para R_{sol} entre 4 e 4,6, quando o pico da temperatura de transição de fase (T_m) desaparece, indicando que o pico se alarga assimetricamente, sugerindo a co-existência de estruturas com transições de fase menores.



(a)



(b)

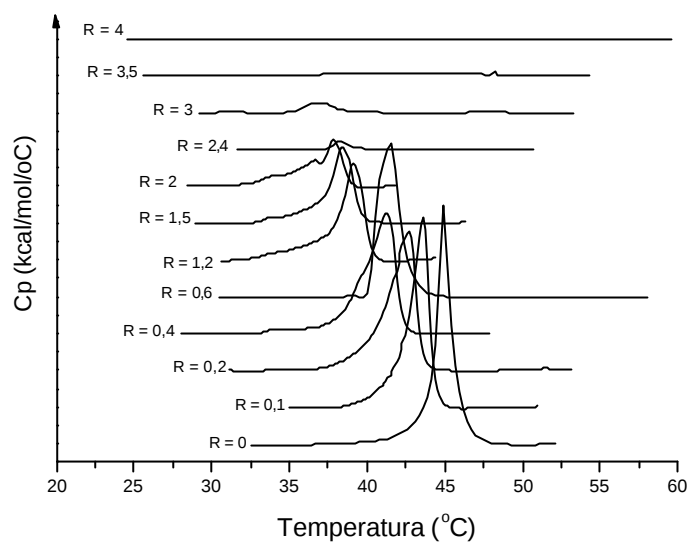
Figura 36 – Curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na presença e ausência de $C_{12}E_5$. $R = C_{12}E_5/DODAB$.

Tabela 12 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de C₁₂E₅.

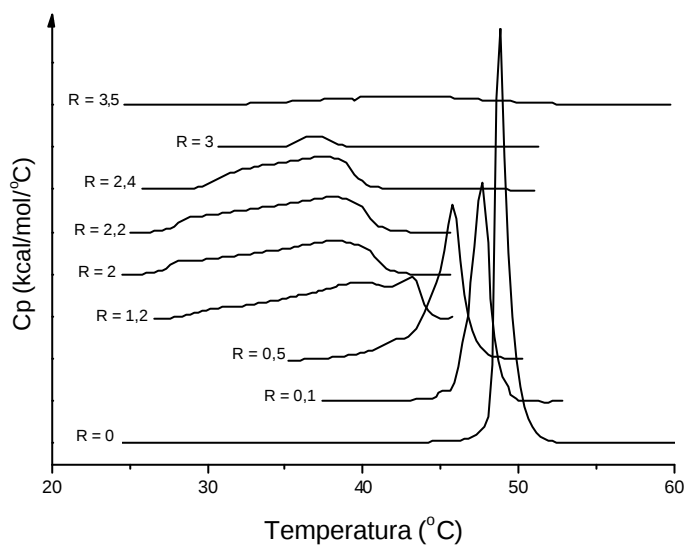
C ₁₂ E ₅ /DODAB	?H (kcal/mol)	?T _{1/2} (°C)	T _m (°C)
0	10,7	1,0	45,0
0,1	10,3	1,4	43,2
0,2	6,6	2,2	41,4
0,4	11,3	2,6	41,4
0,5	6,2	2,4	40,0
1,2	6,4	1,5	37,3
2,0	3,6	1,5	36,1
3,0	4,7	1,5	35,6
3,5	5,1	1,5	35,1
4,0	4,4	1,5	35,0

Tabela 13 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM na ausência e presença de C₁₂E₅.

C ₁₂ E ₅ /DODAC	?H (kcal/mol)	?T _{1/2} (°C)	T _m (°C)
0	11,3	0,8	48,8
0,1	9,5	1,5	47,4
0,2	10,0	1,8	46,8
0,5	8,3	2,1	44,1
1,2	7,6	2,5	42,8
2,0	4,0	2,3	39,6
2,2	4,8	2,3	39,4
2,3	5,4	2,6	40,5
2,6	2,9	2,3	38,1
2,8	3,8	4,1	37,6
3,0	3,0	2,8	37,4
3,5	3,6	3,4	35,3
4,0	2,5	3,6	33,5



(a)



(b)

Figura 37 – As curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na presença e ausência de $C_{12}E_7$. $R = C_{12}E_7/DODAB$.

Comparando os resultados de DSC das Figs. 34a e b e Tabs. 12 e 13 com os resultados de turbidez (Figs. 21 e 22, Tab. 2), verificamos que R_{sol} tende a ser maior quando as medidas são realizadas por DSC ($R_{sol} \sim 4 - 4,5$) do que por turbidez ($R_{sol} < 4,0$). Isso se deve à maior sensibilidade de DSC, que consegue detectar transição de fase diferentes em pequenas frações de estruturas lamelares existentes na mistura.

A Fig. 37 mostra o efeito de $C_{12}E_7$ na curva de DSC de DODAX, onde observamos que o pico da transição principal desaparece para R entre 3 e 3,5, indicando que R_{sol} encontra-se nesta faixa de R. Por medidas de turbidez encontramos $R \sim 4 - 5$ (vide Figs. 21 e 22, Tab. 2) para um tempo de mistura de 15 min. De novo, esses valores não concordam entre si, provavelmente por problemas de equilíbrio dos componentes na mistura. Apesar da maior sensibilidade de DSC, as medidas de turbidez permitem avaliar um maior número de amostras, tornando o valor da transição melhor definido. A entalpia da transição tende a diminuir e a largura do pico a aumentar com o aumento de R, que esta relacionada com a total solubilização das vesículas de DODAX pelos co-surfactantes (Tabs. 14 e 15).

Tabela 14 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de $C_{12}E_7$.

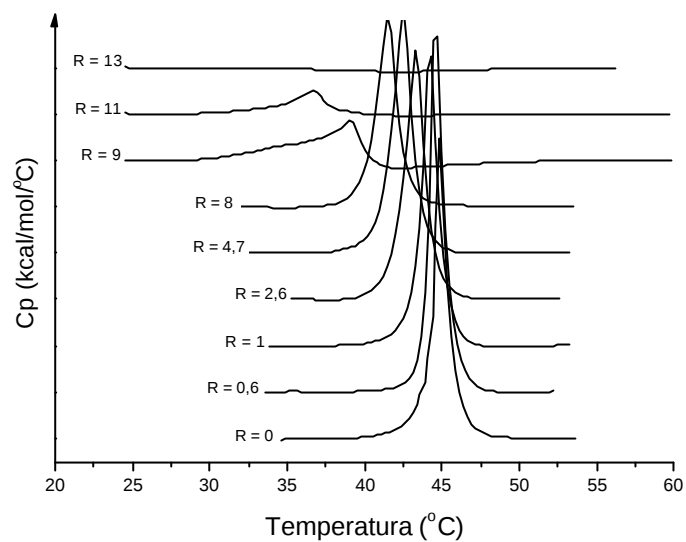
$C_{12}E_7/DODAB$	$\Delta H(kcal/mol)$	$\Delta T_{1/2} (^{\circ}C)$	$T_m (^{\circ}C)$
0	10,7	1,0	45,0
0,1	8,7	1,3	43,6
0,2	8,5	1,7	42,7
0,4	8,3	2,2	41,3
0,6	7,0	1,8	41,6
1,2	6,0	1,5	39,1
1,5	4,6	1,5	38,4
2,0	3,5	2,3	37,8
2,4	0,4	1,0	38,4
3,0	0,6	2,3	36,4

Para os sistemas HPS/DODAX/água, R_{sol} não é bem definido, pois a transição vesícula-micela ocorre de maneira mais suave (Fig. 38). A longa cadeia hidrocarbônica (C16) de HPS, que favorece a micelização, a cabeça polar volumosa e a carga negativa do grupo SO_3^- , pode ser a causa deste comportamento. Estes resultados de DSC confirmam os de turbidez de que a solubilização das vesículas de DODAX por HPS é menor do que pelos não-iônicos (Tab. 16 e 17). Assim como para os outros sistemas investigados, T_m diminui e ΔH e $\Delta T_{1/2}$ aumentam, indicando a presença de diferentes populações de vesículas mistas menores com o aumento da concentração de HPS.

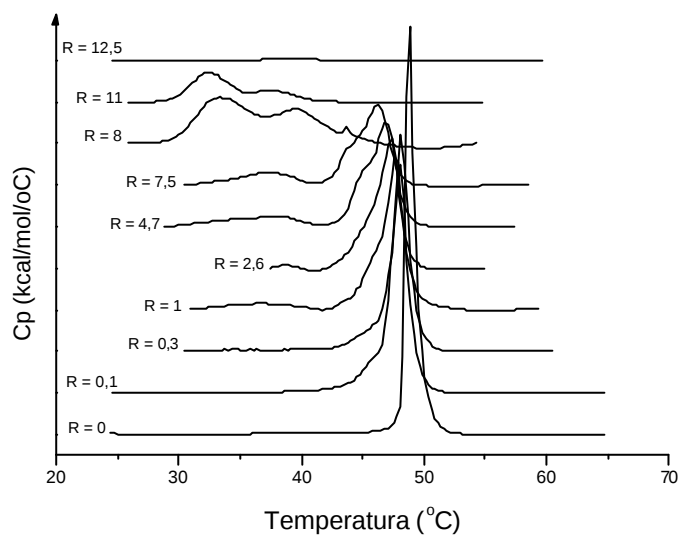
Tabela 15 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM na ausência e presença de $C_{12}E_7$.

$C_{12}E_7/DODAC$	$\Delta H(kcal/mol)$	$\Delta T_{1/2} (^{\circ}C)$	$T_m (^{\circ}C)$
0	11,3	0,8	48,8
0,1	8,0	1,3	47,7
0,5	8,8	1,5	45,6
1,2	7,6	7,9	43,1
2,0	7,4	9,7	38,4
2,2	7,4	10,0	38,1
2,4	5,6	7,7	37,4
3.0	6,7	9,6	36,2

Em geral, as vesículas espontâneas de DODAC tendem a ser mais solubilizadas pelos surfactantes não-iônicos e zwitteriônico, do que as vesículas de DODAB. O raio de hidratação (1,82 Å) e a polarizabilidade (3,01 Å) de Cl^- são menores do que de Br^- (2,06 e 4,27 Å, respectivamente),³⁷ o que sugere maior afinidade de Br^- às interfaces das vesículas catiônicas e, portanto, uma compactação maior da bicamada das vesículas de DODAB (menor T_m e potencial de superfície) do que de DODAC,^{60,70} interferindo, assim, na solubilidade dessas vesículas pelos surfactantes.



(a)



(b)

Figura 38 – Curvas de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na presença e ausência de HPS. $R = \text{HPS/DODAX}$.

Tabela 16 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAB 1,0 mM na ausência e presença de HPS.

HPS/DODAB	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)
0	10,7	1,0	45,0
0,6	10,4	1,0	44,8
1,0	9,5	1,0	44,3
2,6	9,6	1,3	43,3
4,7	9,2	1,3	42,5
8,0	7,6	1,3	41,5
9,0	2,4	3,1	39,0
11,0	6,7	9,6	36,2

Tabela 17 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DODAC 1,0 mM na ausência e presença de HPS.

HPS/DODAC	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)
0	11,3	0,8	48,8
0,1	11,4	1,5	48,1
0,3	11,3	1,5	48,1
1,0	10,0	1,3	48,0
2,6	8,1	2,0	47,4
4,7	9,5	2,8	46,8
7,5	7,9	3,1	46,3
8,0	11,5	10,8	33,4
11,0	4,1	3,9	32,4

DSC de vesículas espontâneas de DHP e DDAB - Os resultados de DSC (Fig. 39, Tab. 18) de vesículas aniônicas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10 mM pH = 8,0, mostram uma tendência de ΔH , T_m e $\Delta T_{1/2}$ aumentar com a concentração de DHP. Esses resultados são característicos de bicamada e, de acordo com as medidas de turbidez mostradas acima, possivelmente o aumento de concentração de DHP favorece a formação de vesículas

multilamelares, resultando, por razões ainda não claras para nós, no aumento da T_m . Essa tendência não foi observada para as vesículas espontâneas de DODAB em água, cuja T_m independe da concentração de DODAB < 10 mM.³⁷ É possível que, ao contrário de DODAB, DHP forma vesículas multilamelares em concentrações maiores (DODAB tende a formar bicamadas extendidas e agregados de bicamada).

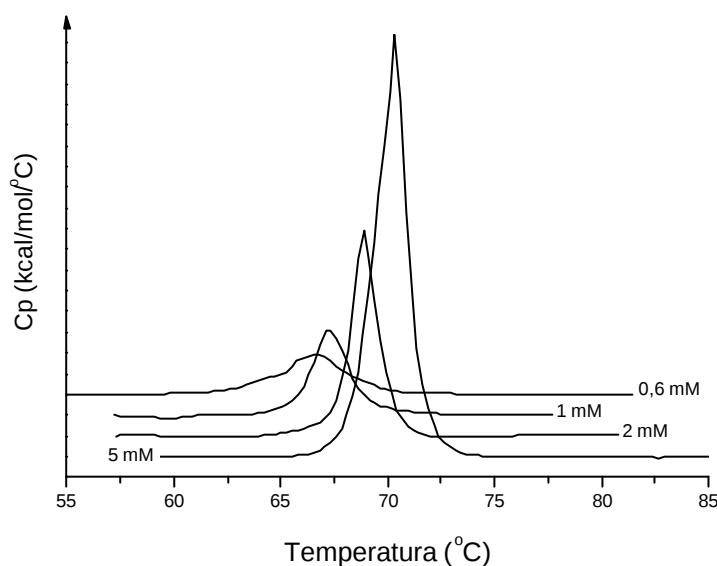


Figura 39 – Curvas de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10 mM, pH = 8,0, a diferentes concentrações DHP.

Uma observação muito interessante é que, assim como as vesículas de DODAX, as vesículas de DHP 5,0 mM são estáveis por muito tempo (meses) à temperatura ambiente e, ao contrário de DODAX, permanecem estáveis a 5 °C, quando armazenadas em geladeira.

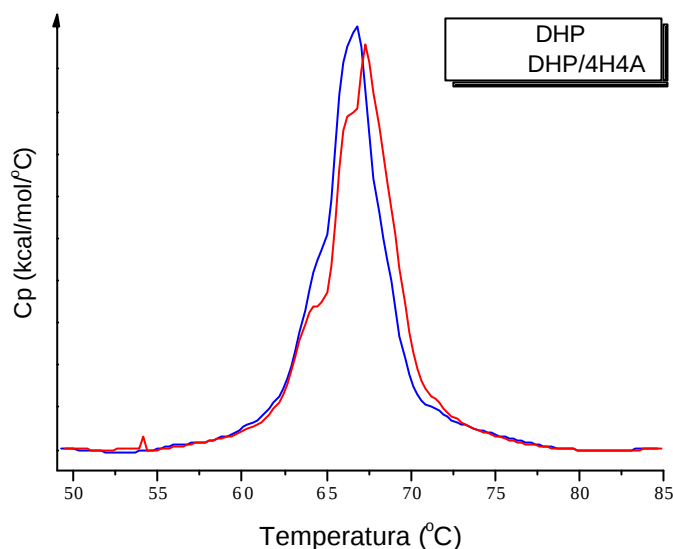


Figura 40 – Curvas de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DHP 0,6 mM em tampão HEPES 10 mM, pH = 8,0. O pico em azul representa DHP puro e em vermelho DHP com sonda 4H4A a 3,0 μ M.

Tabela 18 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DHP em tampão HEPES 10,0 mM pH = 8,0.

[DHP] mM	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ ($^{\circ}$ C)	T_m ($^{\circ}$ C)
0,6	8,2	3,4	66,8
1,0	7,9	1,8	67,3
2,0	17,1	1,3	68,9
5,0	38,9	1,8	70,4

Comparando os resultados de DSC das vesículas espontâneas de DHP 0,6 mM com e sem a sonda 4H4A, verificamos que as propriedades termotrópicas para essas vesículas não variam muito, conforme esperado, ou seja, a sonda não altera os valores de ΔH , $\Delta T_{1/2}$ e T_m (Fig. 40 e Tab. 20), pois no início deste trabalho foi verificamos por Φ_f e $\langle r \rangle$ de fluorescência da sonda 4H4A incorporado nesse sistema vesicular de DHP 0,6 mM o valor da $T_m \cong 70^{\circ}$ C, apesar de mostrar nas duas curvas com e sem a sonda, diferentes picos

sobrepostos, evidenciando que existem estruturas vesiculares diferentes e a sonda aumenta esse efeito.

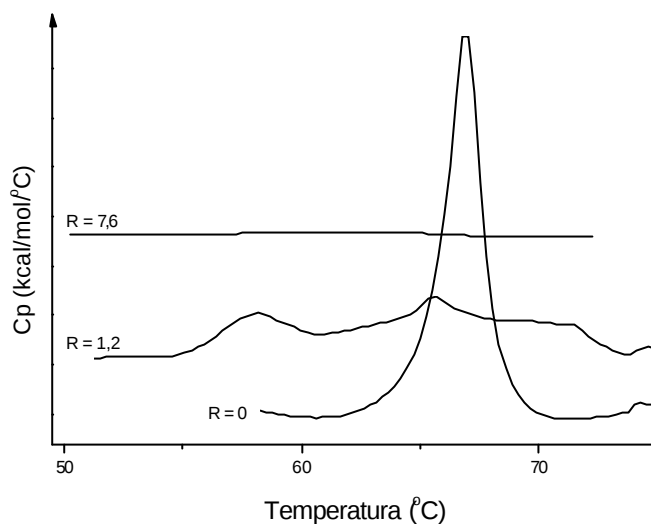


Figura 41 – Curvas de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, na ausência e presença de $C_{12}E_7$. $R = C_{12}E_7/\text{DHP}$.

Para as vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM (Fig. 41 e Tab. 19), com e sem $C_{12}E_7$, não foi possível verificar, até o momento, todos os valores da R_{sol} , já realizadas por medidas de turbidez, a fim de comparar com esta técnica (DSC), mas verificamos que para $R_{\text{sol}} = 1,2$ não mostra a presença de vesículas com estruturas grandes, mas sim, possivelmente a presença de de vesículas mistas menores. Até hoje o sistema surfactante/DHP não foi muito estudado, (mas apenas verificado DHP em água tende a se agregar em estruturas multilamelares).³³ Esse sistema (surfactante/DHP) será investigado com mais rigor em futuros trabalhos.

Tabela 19 – Parâmetros associados à transição de fase de vesículas espontâneas de DHP 1,0 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, na presença e ausência de C₁₂E₇.

C ₁₂ E ₇	?H(kcal/mol)	?T _{1/2} (°C)	T _m (°C)
0	8,4	1,8	67,1
1,2	5,7	14,6	65,6

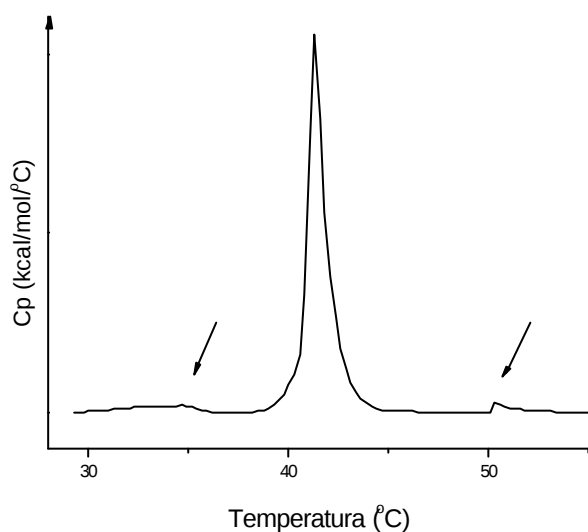


Figura 42 – Curva de aquecimento DSC, de vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4.

O termograma DSC de aquecimento para as vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM (Fig. 42) mostra um pico da temperatura de transição de fase ($T_m = 41,3$ °C), próximo da temperatura de transição das vesículas de DPPC formadas por métodos convencionais, confirmando, portanto, a formação de estruturas de bicamada.^{42,43,73,74} Os parâmetros obtidos do pico de transição, $?T_{1/2}$ e $?H$, Tab. 20 mostram que o pico é bem definido, indicando transição cooperativa.³⁸ Observamos também que existem outras formas transições de fases responsáveis pela presença de pequenos picos antes e após a transição principal (T_m) indicado pelas setas na Fig. 42.

Fizemos medida de calorimetria para as dispersões espontâneas de DDAB 5,4 mM (bem acima, portanto, da CMC $\sim 50 \mu\text{M}$), e o termograma DSC, Fig. 43 e Tab. 20, mostra um pico bem definido de transição de fase em torno de $T_m = 15,6^\circ\text{C}$, devido à formação de bicamadas ou vesículas. Em trabalhos anteriores foi verificada a presença de vesículas de DDAB em água 1,0 e 2,0 mM, por medidas de Cryo-TEM, mostrando a presença de vesículas, e foi observado que, quando se aumenta a concentração de DDAB elas tendem a aumentar de tamanho, formando estruturas mais complexas.⁶⁶ Quanto ao valor da T_m ser muito baixo relativo ao DODAB se deve ao menor tamanho da cadeia hidrocarbônica (C_{12}) de DDAB.

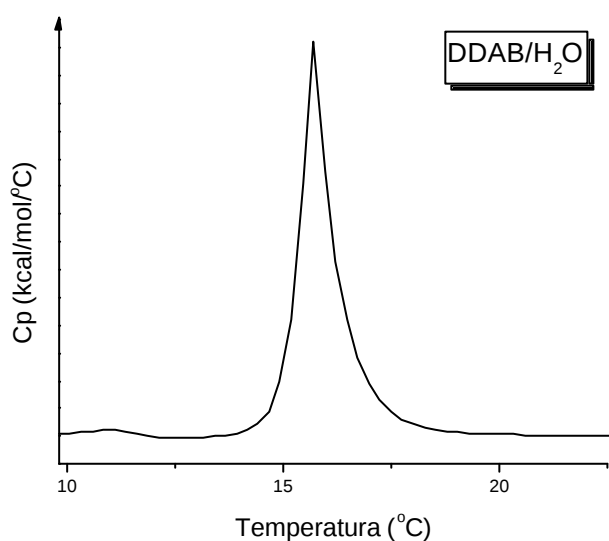


Figura 43 – Curva de aquecimento DSC de vesículas espontâneas de DDAB 5,4 mM em meio aquoso.

Tabela 20 – Valores de ΔH , $\Delta T_{1/2}$ e T_m das vesículas espontâneas de DHP 0,6 mM em tampão HEPES 10,0 mM, pH = 8,0, com e sem a sonda fluorescente 4H4A 3,0 μ M, DPPC em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4, e DDAB 5,4 mM.

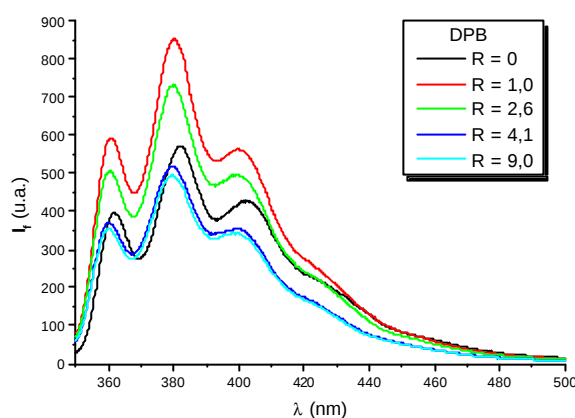
Anfifílico	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ ($^{\circ}$ C)	T_m ($^{\circ}$ C)
DHP	47,5	3,4	66,8
DHP/4H4A	47,6	3,8	67
DPPC	7,2	1,0	41,3
DDAB	1,6	0,8	15,7

4.3. Fluorescência. Efeito de $C_{12}E_n$ e HPS nas vesículas de DODAX e DPPC

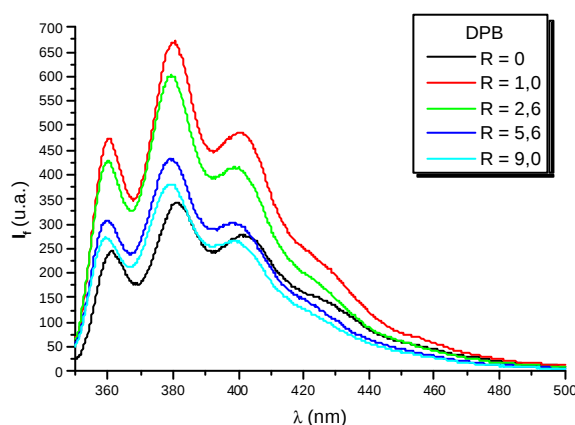
Sistemas surfactante/DODAX/sonda/água - A Fig. 44 mostra os espectros de emissão de fluorescência de DPB em vesículas espontâneas de DODAX 1,0 mM, na ausência e presença de $C_{12}E_7$, obtidas a 30 $^{\circ}$ C. A transição vesícula-micela nos sistemas $C_{12}E_7$ /DODAX/água é sugerida pela mudança espectral de DPB incorporado nesses sistemas.

O comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$) e a intensidade de fluorescência variam com a razão de concentração co-surfactante/DODAX, com uma grande diminuição da intensidade na região de R_{sol} . O deslocamento de $\lambda_{m\acute{a}x}$, apesar de muito pequeno (deslocamento para o azul, de 3 - 4 nm), com o aumento de R, evidencia uma mudança do meio micro-heterogêneo mais ordenado (vesícula) para menos ordenado (micela). Em geral, quando sondas t-Dpo são solubilizadas em um meio homogêneo (solvente apolar) e, depois, em meio micro-heterogêneo, menos ordenado (micela ou vesícula acima da T_m), verifica-se um deslocamento do $\lambda_{m\acute{a}x}$ para o azul, e, quando em meio micro-heterogêneo, mais ordenado (vesículas abaixo da T_m), ocorre o deslocamento de $\lambda_{m\acute{a}x}$ para o vermelho, indicando que a micro-viscosidade em meios micro-heterogêneos difere dos homogêneos, onde esta relacionada também com a mudança de polaridade do meio polar (meio aquoso) e apolar na bicamada da vesícula ou em micela.,^{42,43,72}

As Figs. 45 e 46 indicados pelas setas mostram o efeito da razão de concentração molar co-surfactante/DODAX na anisotropia e rendimento quântico de fluorescência, Φ_f , das sondas DPB e B4A em vesículas espontâneas de DODAX 1,0 mM, obtidos a 30 °C. Das medidas de Φ_f de DPB, incorporado nas vesículas de DODAX, na presença de $C_{12}E_5$, obtivemos $R_{sat} = 1$ e $R_{sol} \sim 4 - 7$, independentemente do contra-íon (Cl^- ou Br^-). Na presença de HPS obtivemos $R_{sat} \sim 1$ e de $R_{sol} \sim 8 - 10$. Estes valores estão próximos dos obtidos por turbidez e DSC.

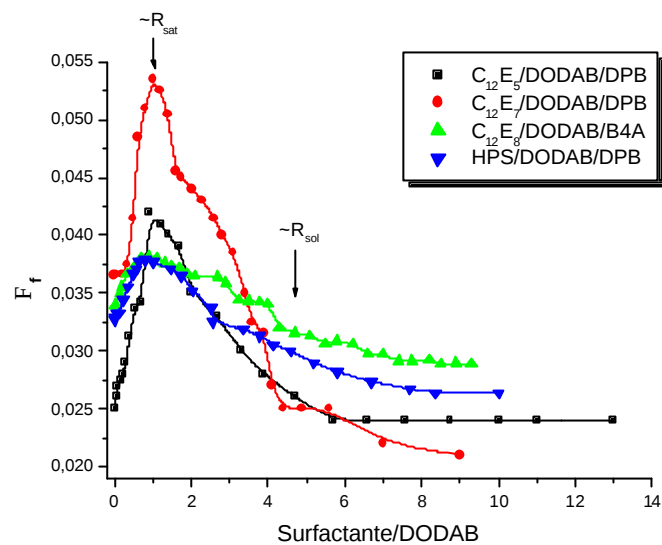


(a)

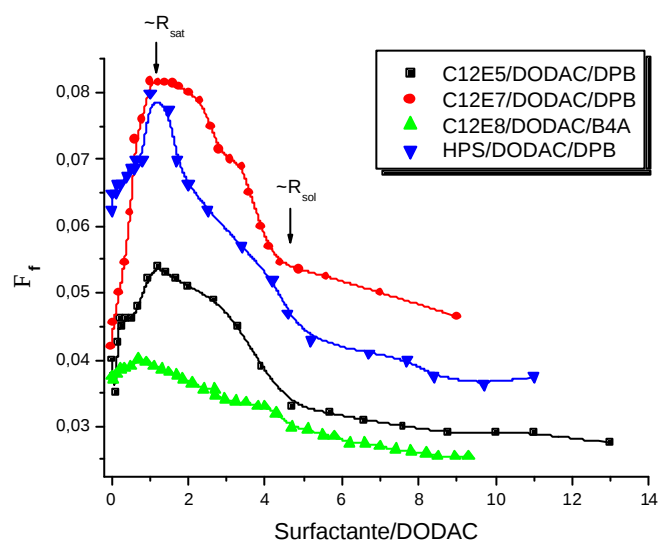


(b)

Figura 44 – Espectros de emissão de fluorescência de DPB em vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, na ausência e presença de $C_{12}E_7$ (30 °C).

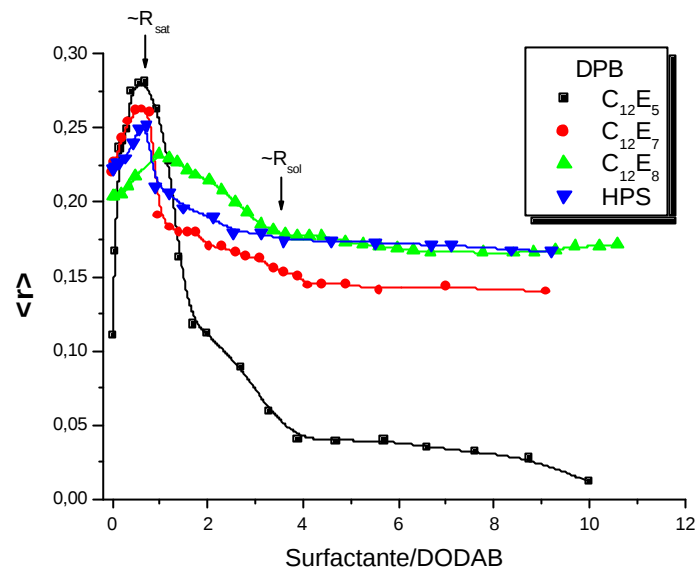


(a)

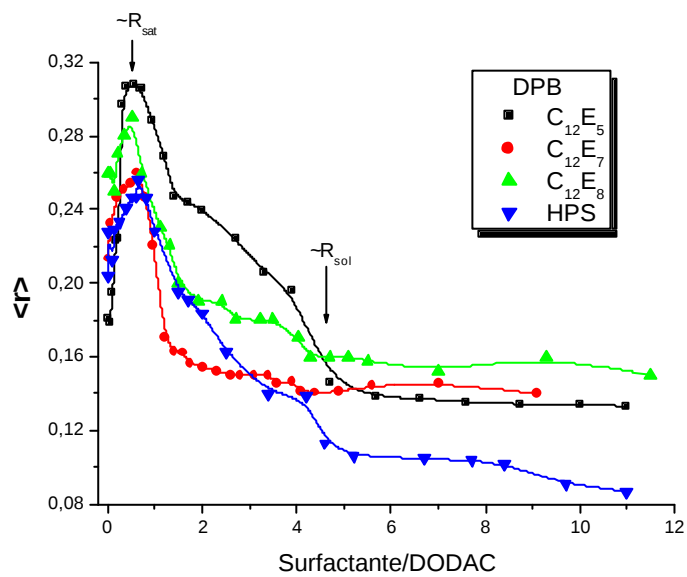


(b)

Figura 45 – Rendimento quântico de fluorescência de DPB e B4A em vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, em função da razão co-surfactante/DODAX (30 °C).



(a)



(b)

Figura 46 – Anisotropia de fluorescência de DPB em vesículas espontâneas de DODAB (a) e DODAC (b) 1,0 mM, em função da razão co-surfactante/DODAX (30 °C).

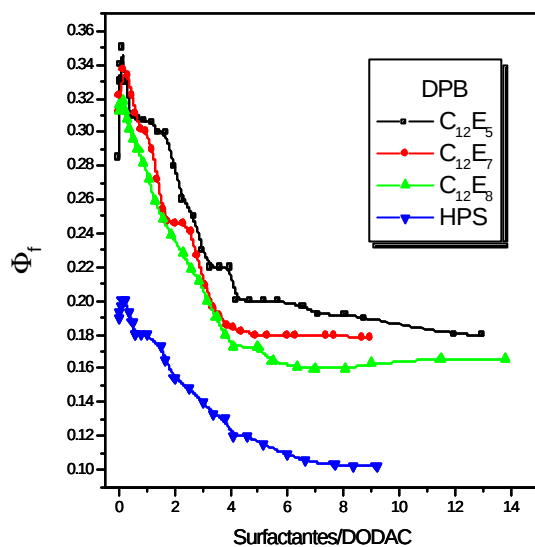
Para todos os sistemas co-surfactante/DODAX, $R_{\text{sat}} = 0,5 - 1$, enquanto que, para alguns desses sistemas R_{sol} não é bem definido, dificultando a comparação do efeito desses surfactantes ($C_{12}E_n$ e HPS) em R_{sol} das vesículas de DODAX. Em alguns casos, a sonda usada pode não ser apropriada. Repetimos, então, alguns experimentos e esse comportamento persistiram, provavelmente devido à posição de sua localização nas vesículas. Como B4A fica ancorado na interface o valor de R_{sol} para $C_{12}E_8$ /DODAX são maiores, em relação aos obtidos por DPB, que é mais hidrofóbica e mostra valores de R_{sol} menores, dificultando a análise dos resultados. Para $C_{12}E_7$, medidas de Φ_f e $\langle r \rangle$ resultaram em $R_{\text{sat}} = 0,5 - 1,0$ e $R_{\text{sol}} \sim 4 - 5,5$ para DODAC e DODAB (Figs. 44 e 46, Tab. 21).

De acordo com estes resultados, a solubilização das vesículas espontâneas de DODAX por surfactante tende a obedecer à sequência $C_{12}E_5 > C_{12}E_7 > C_{12}E_8 > \text{HPS}$, independentemente do contra-íon (Cl^- ou Br^-).

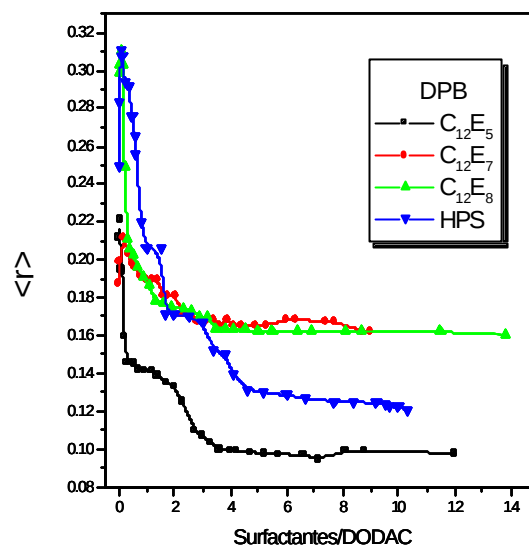
Tabela 21 – Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas espontâneas de DODAX 1,0 mM com $C_{12}E_n$ e HPS, obtidos por medidas de Φ_f (RQ) e $\langle r \rangle$ (AF) de DPB.

Sistema	R_{sat} (RQ)	R_{sat} (AF)	R_{sol} (RQ)	R_{sol} (AF)
$C_{12}E_5$ /DODAC/DPB	1,0	0,5	5-7	5,7
$C_{12}E_7$ /DODAC/DPB	1,0	0,6	4,4	4,1
$C_{12}E_8$ /DODAC/sonda*	0,7(B4A)	0,5 (DPB)	~7 (B4A)	5,5 (DPB)
HPS/DODAC/DPB	1,0	0,7	8-10	~11
$C_{12}E_5$ /DODAB/DPB	1,0	0,7	5 -7	3,9
$C_{12}E_7$ /DODAB/DPB	0,9	0,6	4,5	4,1–5,5
$C_{12}E_8$ /DODAB/sonda*	0,9(B4A)	1,0 (DPB)	~8 (B4A)	6,5 (DPB)
HPS/DODAB/DPB	0,8	0,7	8-10	~10

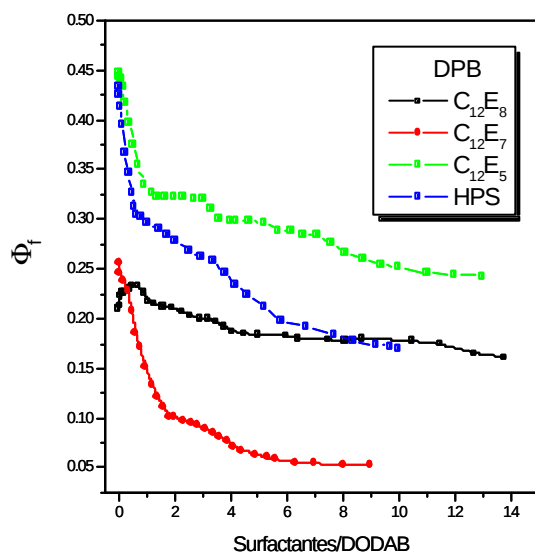
*Valores de Φ_f e $\langle r \rangle$ obtidos com sondas diferentes.



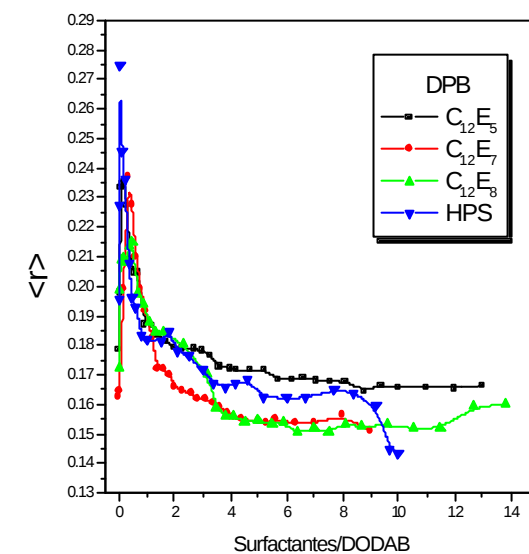
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 47 – (a e c) Rendimento quântico de DPB em função de surfactante/DODAX; (b e d) Anisotropia de DPB em função de surfactantes/DODAX (30 °C).

Com exceção de $C_{12}E_8/DODAB$ ($R_{sat} \sim 0,5$, Fig. 47c), verificamos, para as vesículas sonicadas de DODAX (Figs. 47a, b e d), um pequeno aumento de Φ_f e $\langle r \rangle$ no início da adição do surfactante. Isso se deve porque as vesículas são menores e fragmentadas e apresentam diferentes formas estruturais,^{18,36,37,57,60,63} e favorecendo a distribuição dos surfactantes na bicamada das vesículas de DODAX, e o processo vesícula-micela ocorre a uma concentração menor de surfactante. Para vesículas sonicadas obtivemos $R_{sat} \sim 0,1 - 0,5$ e $R_{sol} \sim 2 - 5,5$, quando investigada por DPB (Tab. 22 e Fig. 47).

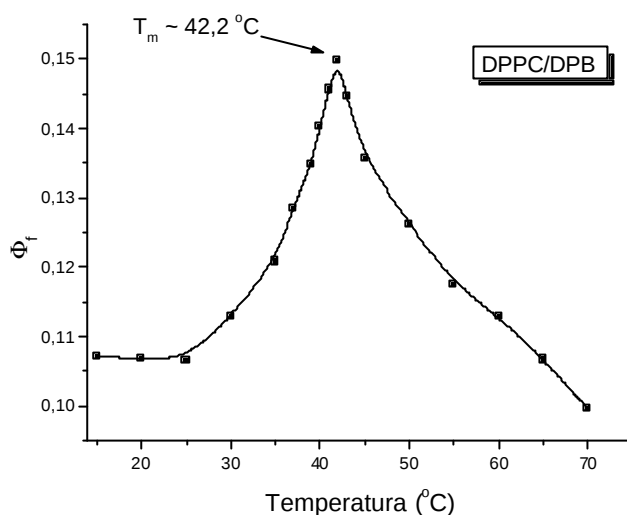
Os valores de R_{sat} e R_{sol} obtidos por medidas de Φ_f e $\langle r \rangle$ (Fig. 47), para os sistemas surfactante/DODAX, em vesículas sonicadas, são coerentes com os obtidos pelo grupo para os sistemas $C_{12}E_8/DODAX$,⁶⁰ por medidas de fluorescência.

Tabela 22 - Valores de R_{sat} e R_{sol} das vesículas sonicadas de DODAX 1,0 mM com $C_{12}E_n$ e HPS, obtidos por medidas de Φ_f (RQ) e $\langle r \rangle$ (AF) da sonda DPB.

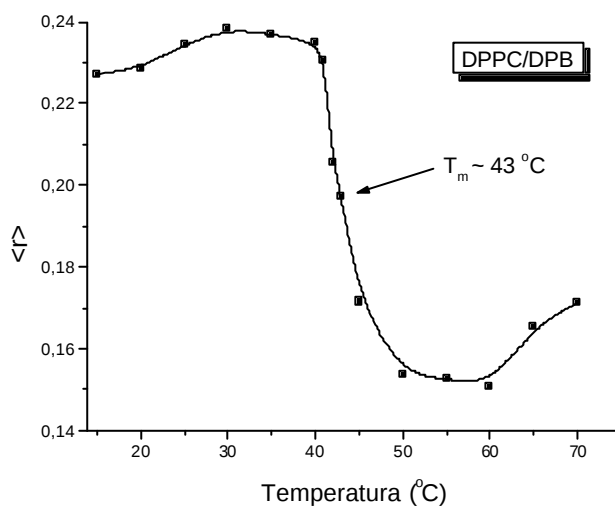
surfactante/DODAX	R_{sat} (RQ)	R_{sat} (AF)	R_{sol} (RQ)	R_{sol} (AF)
$C_{12}E_5/DODAC$	0,1	0,1	4	3,8
$C_{12}E_7/DODAC$	0,1	0,1	3,8	2,6
$C_{12}E_8/DODAC$	0,1	0,1	4	3,7
HPS/DODAC	0,1	0,1	4,6	4,6
$C_{12}E_5/DODAB$	-	0,2	4,8	4,0
$C_{12}E_7/DODAB$	-	0,3	4,2	4
$C_{12}E_8/DODAB$	0,5	0,4	4,2	4
HPS/DODAB	-	0,1	6	5,5

Vesículas espontâneas de DPPC – A fim de verificar o efeito de co-surfactante nas vesículas de DPPC, preparadas espontaneamente em tampão fosfato, investigamos o efeito da temperatura na anisotropia e rendimento quântico de fluorescência de DPB nessas vesículas (Fig. 48). Essas medidas confirmaram o valor da T_m de DPPC 1,0 mM, igual a 42,2 °C, em bom acordo com os reportados na literatura para as vesículas de DPPC preparadas por outros métodos, $T_m \sim 41$ °C.^{38,42,43,73,74} Essa pequena diferença no valor da T_m

de DPPC deve estar relacionada ao empacotamento dos lipídios na bicamada das vesículas devido às diferentes estruturas existentes nessas dispersões, principalmente estruturas pequenas e grandes, uni- e multi-lamelares.



(a)

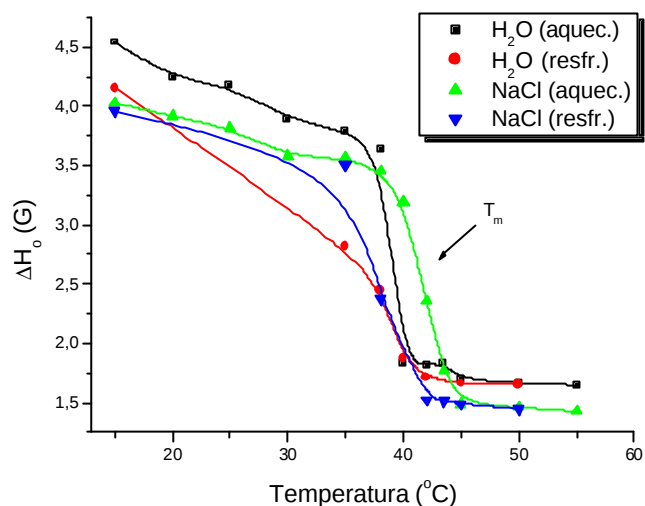


(b)

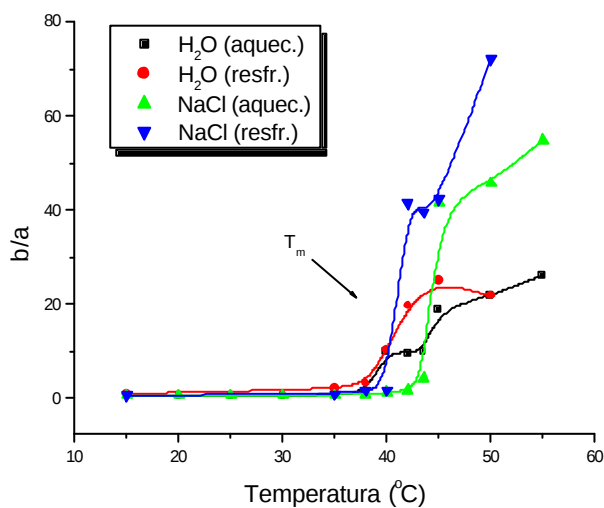
Figura 48 – Efeito da temperatura no rendimento quântico (a) e anisotropia de fluorescência (b) de DPB 6,5 μM em vesículas espontâneas de DPPC 1,0 mM em tampão fosfato pH = 7,4.

4. 4. EPR de vesículas espontâneas de DODAB. Efeito de NaCl

Obtivemos a T_m das vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água e em solução iso-osmolar de NaCl 1,0 mM, através de medidas de EPR, por aquecimento e resfriamento da amostra (Fig. 49).



(a)



(b)

Figura 49 - Variação (a) da largura do espectro (ΔH_0) e (b) da razão b/a dos espectro RPE de 16-MESL em DODAB/água 5,0 mM e em NaCl 1,0 mM, em função da temperatura por aquecimento e resfriamento.

Dos espectros RPE de 16-MESL em vesículas de DODAB/água e em NaCl 1,0 mM, obtivemos a largura da segunda linha (hiperfina) o ΔH_o , e a razão b/a das amplitudes, em função da temperatura (Fig. 19) e determinamos a T_m .⁵⁷ Monitoramos esses parâmetros variando a temperatura, por aquecimento e resfriamento, da amostra, e observamos um efeito de histerese (Fig. 49a e b, Tab. 23).

De acordo com a Fig. 49 e Tab. 23, NaCl aumenta a T_m das vesículas de DODAB, e a T_m é sempre menor quando obtida por resfriamento do que por aquecimento da mostra (efeito histerese). Os valores da T_m obtidos por este método (Tab. 23) estão em bom acordo entre si e com os obtidos por outros métodos. A rigor, os valores de T_m obtidos pelo monitoramento da razão b/a é cerca de 3 °C menor que dos obtidos através da medida de ΔH_o . Esse trabalho em soluções de NaCl será a continuidade de futuros trabalhos em concentrações maiores para dispersões de DODAB 5,0 mM, a fim de verificar o efeito histerese.

Tabela 23 – T_m (°C) obtida dos espectros RPE de 16-MESL em vesículas espontâneas de DODAB 5,0 mM em água e em NaCl. Valores obtidos por aquecimento e resfriamento.

[NaCl] (mM)	T_m (de ΔH_o) (aquecimento)	T_m (de ΔH_o) (resfriamento)	T_m (de b/a) (aquecimento)	T_m (de b/a) (resfriamento)
0	39,2	38,0	43,5	40,4
1,0	42,0	38,3	44,2	43,6

5. Conclusões

O conjunto das medidas apresentadas nesta tese indica que a transição vesícula-micela dos sistemas vesiculares catiônicos apresenta diferentes valores de R_{sat} e R_{sol} analisada por diferentes técnicas (Tab. 24), mais coerentes com os valores de outros trabalhos já relatados para sistemas semelhante a esse.⁶⁰

Tabela 24 – Resumo dos valores de R_{sat} e R_{sol} de DODAX, na presença de $C_{12}E_n$ ($n = 5, 7$ e 8) e HPS, obtidos por diferentes métodos.

Surfactante	DODAC								DODAB							
	R_{sat}			R_{sol}				R_{sat}			R_{sol}					
	t	Φ_f	$\langle r \rangle$	t	DSC	Φ_f	$\langle r \rangle$	t	Φ_f	$\langle r \rangle$	t	DSC	Φ_f	$\langle r \rangle$		
$C_{12}E_5$	0,3	1	0,5	3,2	4,6	~6	5,7	0,2	1	0,7	3,2	4,6	~6	3,9		
$C_{12}E_7$	0,3	1	0,6	5,6	3,5	4,4	4,1	0,2	0,9	0,6	5,6	4,0	4,4	~5		
$C_{12}E_8$	0,3	0,7	0,5	5,1	5,7*	~7	5,5	0,5	0,9	1	6,2	6,7*	~8	6,5		
HPS	0,2	1	0,7	~11	12,5	~9	~11	0,5	0,8	0,7	~12	13	~9	~10		

*Valor extraído da Ref. 60.

A partir desses resultados, enumeramos as seguintes conclusões:

- A transição vesícula-micela ocorre em dois (para DDAB e DPPC) ou três estágios (para DODAX). Para DHP não é muito definido.
- Os surfactantes $C_{12}E_n$ solubiliza mais as vesículas catiônicas (DODAX) e aniônicas (DHP) do que HPS, e a zwitteriônica (DPPC) não é solubilizada somente pelo $C_{12}E_5$, mesmo em diferentes tempos de mistura do surfactante.
- A solubilização das vesículas de DODAX e DHP por $C_{12}E_n$ tende a diminuir com o aumento de n .
- Observamos que, após a mistura dos surfactantes, o tempo necessário para o sistema alcançar o equilíbrio é menor do que 10 min., e depende da natureza dos surfactantes, e as medidas devem ser realizadas na condição de equilíbrio.
- O efeito da extrusão aumenta a solubilidade de DHP pelos surfactantes não-iônicos e zwitteriônicos. Para DODAX esse efeito é menor.
- O efeito do co-soluto estabiliza as misturas de vesículas e micelas em solução, retardando a transição para micela.

- O tamanho das cadeias hidrocarbônicas dos surfactantes catiônicos (DDAB e DODAB) tem grande efeito na solubilização das vesículas, independentemente da espécie do surfactante (não-iônico e zwitteriônico) adicionada. Quanto maior a cadeia, menor é a solubilização (maior R_{sol}).
- As vesículas espontâneas de DODAC são solubilizadas mais facilmente do que as de DODAB, independentemente do surfactante não-iônico ou zwitteriônico adicionado, indicando diferente afinidade dos contra-íons Br^- e Cl^- às vesículas (Br^- tem maior afinidade).
- Para todas as vesículas de DODAX, independentemente do co-surfactante ($C_{12}E_n$ ou HPS), verificamos por medidas de DSC uma mudança estrutural de vesícula-micela na mistura, quando mostra um alargamento nos picos das curvas de DSC, assim como para $C_{12}E_7$ /DHP. Por medida de turbidez essa transição é evidente pela diminuição do valor medido.

6. Referências bibliográficas

1. LASCH, J. **Interaction of detergents with lipid vesicles.** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1241, p. 269-292, 1995.
2. GODDARD, E. D. **In Interaction of surfactants with polymers and proteins.** Goddard, E., Ananthapadmanabhan, K. P., Eds., CRC Press: Boca Raton, Flórida, 1993.
3. SZOKA, F. JR., PAPAHAJDOPOULOS, D. **Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes).** *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 9, p. 467-508, 1980.
4. (a) LICHTENBERG, D. **In Biomembranes.** Physical Aspects, Shinitzky, M. (Ed.), VCH, Nova Iorque, 1993. (b) LICHTENBERG, D., OPATOWSKI, E., KOZLOV, M. M. **Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles.** *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1508, p. 1-19, 2000.

5. HIEMENZ, P. C., RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**, *Marcel Dekker, Inc.*, Nova Iorque, 1997.
6. TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**, 2^a ed., *John Wiley*, Nova Iorque, 1973.
7. ROSEN, M. J., **Surfactants and interfacial phenomena**, 2^a ed., *John Wiley*, Nova Iorque, 1989.
8. TANFORD, C. **The hydrophobic effect formation of micelles and biological membranes**, 2^a ed., *John Wiley & Sons*, Nova Iorque, 1980.
9. HARTLEY, G. S. **Aqueous solutions of paraffin chain salts**, *Hernan et Cie.*, Paris, 1936.
10. BIRDI, R. S. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, v.70, p.23, 1985.
11. CEVEC, G. (Ed.) **Phospholipids handbook**, *Marcel Dekker Inc.*, Nova Iorque, 1993.
12. SINGER, S. J., NICHOLSON, G. L. **The fluid mosaic model of the structure of cell membranes**. *Science*, v. 175, p. 720-731, 1972.
13. LEHNINGER, A. L., NELSON, D. I., COX, M. **Princípios de Bioquímica**, 2^a ed., *Editora Sarvier*, Rio de Janeiro, 1995.
14. STRYER, L. **Bioquímica**, 3^a ed., *Guanabara Koogan S. A.*, Rio de Janeiro, 1992.
15. EVANS, F., D., WENNERSTRÖM, H. **The colloidal domain**, *John Wiley & Sons, Inc.*, Nova Iorque, 1994.
16. BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WALKINS, J. C. **Diffusion of univalent ion cross the lamellae of swollen phospholipides**. *J. Mol. Biol.* v. 13, p. 238-252, 1965.
17. INOUE, T. **In Vesicle. Surfactant science series**, *Rosoff, M., Ed.*, v. 62, Nova Iorque, 1996. 64p.
18. CARMONA-RIBEIRO, A. M., CHAIMOVICH, H. **Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated**. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 733, p.172-179, 1983.

19. KALYANASUNDARAM, K. **Photochemistry in microheterogeneous systems.** *Academic Press*, Orlando, FL., 1987.
20. HÖHNE, G., HEMMINGER, W., FLAMMERSHEIM, H.-J. **Differential Scanning Calorimetry.** *Springer*, Berlin, 1996.
21. GREGORIADIS, G., **Liposome technology,** *CRC Press, Boca Raton, Flórida*, 1986.
22. HOROWITZ, A. D., ELLEDGE, B., WHISTSETT, J. A., *et al.* **Effects of lung surfactant proteolipid SP-C on the organization the organization of model membrane lipids: a fluorecence study,** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1107, p. 44-54, 1992.
23. NEW, R. R. C. **Liposomes: a pratical approach.** *Oxford University Press*, Nova Iorque, 1990.
24. (a) OLLIVON, M., LESIEUR, S., GRABIELLE-MADELMONT, C., *et al.* **Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles,** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1508, p. 34-50, 2000.
25. EDWARDS, K., ALMGREN, M., BELLARE, J. *et al.* **Effects of Triton X-100 on sonicated lecithin vesicles.** *Langmuir*. v. 5, p. 473-478, 1989.
26. KASCHNY, P., GOÑI, F. M. **Spectroscopic proprerties of hydrophobic dyes incorporated into phospholipid bilayers. Ana application to the study of membrane surfactant interactions.** *J. Colloid Interface Sci.*, v. 160, p. 24-30, 1993.
27. EDWARDS, K., GUSTAFSSON, J., ALMGREN, M., *et al.* **Slubilization of lecithin vesicles by a cationic surfactant: intermediate structures in the vesicle-micelle transition observed by cryo-Transmission electron microscopy.** *J. Colloid Interface Sci.*, v. 161, p. 299-309, 1993.
28. HEERKLOZ, H., LANTZSCH, G., BINDER, H., *et al.* **Application of isothermal titration calorimetry for deterting lipid membrane solubilization.** *Chem. Phys. Lett.*, v. 235, p. 517-520, 1995.
29. HEERKLOZ, H., BINDER, H., LANTZSCH, G. *et al.* **Lipid/detergent interaction thermodynamics as a function of molecular shape.** *J. Phys. Chem. B.*, v. 101, p. 639-645, 1997.

30. LOPEZ, O., MAZA, A., CODERCH, L., *et al.* **Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100.** *FEBS Lett.*, v. 426, p. 314-318, 1998.
31. WENK, M. R., SEELIG, J. **Vesicle-micelle transformation of phosphatidylcholine/octyl- β -D-glucopyranoside mixtures as detected with titration calorimetry.** *J. Phys. Chem. B.*, v. 101, p. 5224-5231, 1997.
32. LAUGHLIN, R. G. **Equilibrium vesicles: fact or fiction?** *Colloids Surf. A*, v. 128, p. 27-38, 1997.
33. FEITOSA, E., AMARAL, L. Q. (em preparação).
34. BARRELEIRO, P., FEITOSA, E. (artigo submetido).
35. PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS Spectroscopy and its applications**, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
36. BENATTI, C. R., TIERA, M. J., FEITOSA, E., *et al.* **Phase behavior of synthetic amphiphile vesicles investigated by calorimetry and fluorescence methods.** *Thermochim. Acta*, v. 328, p. 137-142, 1999.
37. FEITOSA, E., BARRELEIRO, P. C. A., OLOFSSON, G. **Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods.** *Chem. Phys. Lipids*, v. 105, p. 201-213, 2000.
38. LADBURY, J. E., CHOWDHRY, B. Z. **Biocalorimetry applications of calorimetry in the biological sciences.** *John Wiley & Sons Ltd*, Londres, 1998. (b) BANERJEE, S., BENNOUNA, M. *et al.* **Lipid-drug interaction and colligative properties in phospholipid vesicles.** *J. Colloid Interface Sci.* v. 219, p. 168-177, 1999.
39. ATKINS, P. W. **Físico-Química**, 6ª ed., Vol. 1, LTC Editora S. A., Rio de Janeiro, 1997.
40. ALLINGER, N. L., CAVA, M. P., DE JONGH, D. C., *et al.* **Química orgânica**, 2ª ed., Ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1978.
41. COYLE, J. D. **Introduction to organic photochemistry.** *John Wiley & Sons Ltd.*, Nova Iorque, 1986.
42. BONASSI, N. M. **Estudos de sondas fluorescentes derivadas dos trans-difenilpolienos tS, DPB e DPH na caracterização de sistemas**

vesiculares de fosfolípidos. *Dissertação de Mestrado IBILCE/UNESP, S. J. do Rio Preto*, 1998.

43. (a) ALLEN, M. T., MIOLA, L., WHITTEN, D. G., **Host-guest interactions: a fluorescence investigation of the solubilization of diphenylpolyene solute molecules in lipid bilayers.** *J. Am. Chem. Soc.*, v. 110, p. 3198-3206, 1988. (b) ALLEN, M. T., MIOLA, L., SHIN, D. M., *et al.* **Solubilization sites in phospholipid bilayers: studies with photochemically reactive probes.** *J. Membr. Sci.*, v. 33, p. 201-219, 1987.
44. LIU, R. S. H., BROWNE, D. T. **A bioorganic view of the chemistry of vision: H.T.-n and B.P.-m, n mechanisms for reactions of confined, anchored polyenes.** *Acc. Chem. Res.*, v. 19, p. 42-48, 1986.
45. BERNSDORFF, C., WOLF, A., WINTER, R. **The effect of temperature and pressure on structural and dynamic properties of phospholipid/sterol, mixtures-a steady-state and time-resolved fluorescence anisotropy study.** *Zeitschrift für Phys. Chem. Bd. 193*, v. 193, p. 151-173, 1996.
46. BEN-YASHAR, V., BARENHOLZ, Y. **Characterization of the core and surface of human plasma lipoproteins. A study based on the use of five fluorophores.** *Chem. Phys. Lipids.*, v. 60, p. 1-4, 1991.
47. HILTON, D. P. JOHNSON Jr., C. S. **Diffusion ordered 2D NMR spectroscopy of phospholipid vesicles: determination of vesicle size distributions.** *J. Phys. Chem.*, v. 97, p. 9064-9072, 1993.
48. JOHNSON, D. A., VALENZUELA, C. F., ZIDOVETZKI, R. **A deuterium NMR and steady-state fluorescence anisotropy study of the effects of cholesterol on the lipid membrane-disordering actions of ethanol.** *Biochem. Pharmacol.*, v. 44, p. 769-774, 1992.
49. SHIMISHICK, E. D., MCCONNEL, H. M. **Lateral phase separation in phospholipid membranes.** *Biochemistry*, v. 12, p. 2351-2360, 1973.
50. SOLOMONS, T. W. G. *Organic Chemistry*. 4^a ed., John Wiley & Sons Inc., Nova Iorque, 1988.
51. LAKOWICZ, J. **Principles of fluorescence spectroscopy**, Plenum Press, Nova Iorque, 1983.

52. RAMAMURTHY, V. **Photochemistry in organized and constrained media, Photochemistry.** VCH Publishers, Inc., Nova Iorque, 1991.
53. ATKINS, P. W. **Físico-Química**, 6ª ed., Vol. 2, LTC Editora S. A., Rio de Janeiro, 1997.
54. MARSH, D. **Membrane assembly studied by spin-label electron spin resonance.** *Brazilian J. Med. Biol. Research*, v. 29, p. 863-871, 1996.
55. GEELL, E. *Membrane Spectroscopy*, Springer-Verlag, Nova Iorque, 1981, p. 209.
56. BENATTI, C. R. **Propriedades termotrópicas de vesículas de anfifílicos sintéticos preparadas por diferentes métodos.** *Tese de Doutorado IBILCE/UNESP*, S. J. do Rio Preto, 2000.
57. BENATTI, C. R., FEITOSA, E., FERNANDEZ, R. M. **Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spin labels.** *Chem. Phys. Lipids*, v. 111, p. 93-104, 2001.
58. BAI, J., PAGANO, R. E. **Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of bodipy-labeled lipids in lipid vesicles.** *Biochemistry*, v. 36, p. 8840-8848, 1997.
59. BARRELEIRO, P. C. A., OLOFSSON, G., BROWN, W. **Interaction of octaethylene glycol n-dodecyl monoether with dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicle.** *Langmuir*, v.18, p. 1024-1029, 2002.
60. BARRELEIRO, P. C. A., OLOFSSON, G., FEITOSA, E. **Vesicle-to-micelle transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and dioctadecyldimethylammonium chloride dispersions induced by octaethylene glycol n-dodecylmonoether an isothermal titration calorimetry study.** *Progr. Colloid Interface Polym. Sci.*, v. 116, p. 33-36, 2000.
61. (a) VAN OS, N. M., HAAK, J.R., RUPERT, L. A. M. **Physico-chemical properties of selected anionic, cationic and nonionic surfactants.** *Elsevier Science B. V.*, Amsterdam, 1999, p.203. (b) FOLHA de dados da Nikko Chemicals, Tóquio.

62. SHOJI, N., UENO, M., MEGURO, K. *J. Am. Oil Chemists Soc.*, v. 55, p. 297, 1978.
63. FEITOSA, E., BROWN, W. **Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide.** *Langmuir*, v. 13, p. 4810-4816, 1997.
64. CUCCOVIA, I. M., SESSO, A., ABUIN, E. B., *et al.* **Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection.** *Journal of Molecular Líquids.*, v. 72, p. 323-336, 1997.
65. WALTER, A., KUEL, G., BARNES, K., *et al.* **The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicle induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea.** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1508, p. 20-33, 2000.
66. VISEU, M. I., EDWARDS, K., CAMPOS, C. S. **Spontaneous vesicles formed in aqueous mixtures of two cationic amphiphiles.** *Langmuir.*, v. 16, p. 2105-2114, 2000.
67. LUSVARDI, K. M., FULL, A. P., KALER, E. W. **Mixed micelles of dodecyltrimethylammonium bromide and didodecyldimethylammonium bromide.** *Langmuir.*, v. 11, p. 487-492, 1995.
68. MARQUES, E., REGEV, O., KHAN, A. **Vesicle formation and general phase behavior in the catanionic mixture SDS-DDAB-water. The cationic-rich side.** *J. Phys. Chem.*, v. 103, p. 8353-8363, 1999.
69. TENGNO, D. L. **Colóides de associação em misturas aquosas de surfactantes mono e dialquilados.** *Dissertação de Mestrado IBILCE/UNESP, S. J. do Rio Preto*, 2001.
70. CUCCOVIA, I. M., FEITOSA, E., CHAIMOVICH, H., *et al.* **Size, electrophoretic mobility, and ion dissociation of vesicles prepared with synthetic amphiphiles.** *J. Phys. Chem.*, v. 94, p. 3722-3725, 1990.
71. GUGLIOTTI, M., CHAIMOVICH, H., POLITTI, M. J. **Fusion of vesicles with the air-water interface: the influence of polar head group, salt**

- concentration, and vesicle size.** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1463, p. 301-306, 2000.
72. WHITHEN, D. G. **Photochemistry photophysics of trans-stilbene and related alkanes in surfactant assemblies.** *Acc., Chem. Res.*, v. 26, p. 502-509, 1993.
73. PEDERSEN, T. B., FROKJAER, S., MOURITSEN, O. G., *et al.* **Phase behavior and lipid-membrane structure of phospholipid-glycosphingolipid liposomes and the thermal unfolding of insulin.** *J. Liposome Research.*, v. 9, p. 261-274, 1999.
74. ANDERSSON, M., HAMMARSTRÖM, L., EDWARDS, K. **Effect of bilayer phase transitions on vesicle structure and its influence on the kinetics of viologen reduction.** *J. Phys. Chem.*, v. 99, p. 14531-14538, 1995.