

Carlos Roberto Benatti

**Propriedades Termotrópicas de Vesículas
de Anfifílicos Sintéticos Preparadas por
Diferentes Métodos**



1910000955



**Propriedades Termotrópicas de Vesículas de Anfífilicos
Sintéticos Preparadas por Diferentes Métodos**

Carlos Roberto Benatti



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

São José do Rio Preto

14 de julho de 2000

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Departamento de Física

**Propriedades Termotrópicas de Vesículas de Anfífilicos
Sintéticos Preparadas por Diferentes Métodos**

CARLOS ROBERTO BENATTI



ELOI DA SILVA FEITOSA

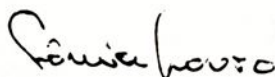
Orientador



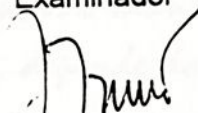
Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia
Examinador



Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Examinador



Profa. Dra. Sônia Renaux Wanderley Louro
Examinador



Prof. Dr. João Ruggiero Neto
Examinador

São José do Rio Preto

2000



*O homem sensato se adapta ao mundo,
o insensato insiste em adaptar o mundo a ele,
todo o progresso, portanto, depende do homem
insensato.*

George Bernard Shaw 1856-1950
(dramaturgo Irlandês)



Aos meus pais Geraldo e Irene e

Para as mulheres da minha vida:
Lucimara P. S. Benatti, pelo
apoio, paciência e compreensão
e Isa Benatti, pelas alegrias e
terapias.



Aos Professores Doutores:

Márcio José Tiera, pelo seu apoio,

idéias

execu

Maria

colaboração

discussões.

A estes professores, meus sinceros

agradecimentos.

Aos meus pais Geraldo e Ireni e
meus irmãos José Heder, Edson
e Fátima.

Agradecimentos

Este é um dos momentos em que prefiro falar das insubstituíveis memórias e relacionar o nome de todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta tese.

Procurarei mencionar o nome daqueles que acreditaram e muito contribuíram à viabilidade desta tese, aos que sentiram esquecidos, antecipadamente peço minhas desculpas e os agradeço. Sou grato ao professor Dr. Elói da Silva Fentosa, pela sua orientação e tempo dedicado a este trabalho. Aos professores Dr. Laerte Miola, João Ruggiero Neto, Marcelo Fossey, José Ruggiero, Marimônio Cornélio, Raghuvir Krishnaswamy Arni, Jorge Chahine, enfim, a todos os professores do Departamento de Física do IBILCE, pelas valiosas sugestões e gratas contribuições. Ao professor Dr. Márcio José Tiera e à professora Dr^a. Ieda Ap. P. Fentonane do Departamento de Química e Geociências - IBILCE - UNESP, às professoras Dr^{as}. Iolanda Cuccovia, Departamento de Bioquímica - IQ - USP - São Paulo, Maria Teresa Lamy-Freund e doutorando Roberto M. Fernandes, Departamento de Física Geral - IF - USP - São Paulo. Contribuições não mencionadas também a dos funcionários do Departamento de Física: Salinas e Barbosa e João, técnico do Departamento de Física.

Agradeço a todos os colegas do Departamento de Física: quais aqui os represento por Alexandre McGiver, Roberto Uderlei, Luis Paulo e Leandra.

Muito grato sou também por toda a ajuda que sempre estiveram na torcida de todos os fatos e acontecimentos. A estes professores, meus sinceros agradecimentos.

As bibliotecárias do IBILCE que sempre de forma agradável forneceram os objetos do saber e ao Márcio do audiovisual.

Meus agradecimentos à FAPESP, pelo apoio financeiro e boa assessoria. Finalizo agradecendo ao IBILCE - UNESP, onde há doze anos passei boa parte de minha vida.

Agradecimentos

Este é um dos momento em que prefiro falar das instáveis membranas a relacionar o nome de todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta tese.

Procurarei mencionar o nome daqueles que acreditaram e muito contribuíram à viabilidade desta tese, aos que sentirem esquecidos, antecipadamente peço minhas desculpas e os agradeço. Sou grato ao professor Dr. Eloi da Silva Feitosa, pela sua orientação e tempo dedicado a este trabalho. Aos professores Dr^s. Laerte Miola, João Ruggiero Neto, Marcelo Fossey, José Ruggiero, Marinônio Cornélio, Raghuvir Krishnaswamy Arni, Jorge Chahine, enfim, a todos os professores do Departamento de Física do IBILCE, pelas valiosas sugestões e gratas contribuições. Ao professor Dr. Márcio José Tiera e a professora Dr^a. Ieda Ap. P. Fertone do Departamento de Química e Geociências - IBILCE - UNESP, às professoras Dr^{as}. Iolanda Cuccovia, Departamento de Bioquímica - IQ - USP - São Paulo, Maria Teresa Lamy-Freund e doutorando Roberto M. Fernandes, Departamento de Física Geral - IF - USP - São Paulo. Contribuições não menos importantes foram também a dos funcionários do Departamento de Física: a secretária Ilva, e os técnicos Paulo Salinas e Barbosa e João, técnico do Departamento de Química e Geociências.

Agradeço a todos os colegas do Departamento de Física, os quais aqui os represento por Alexandre McGiver, Renato Caetano, Milton e Raquel Bugs, Uderlei, Luis Paulo e Leandra.

Muito grato sou também por toda a minha família que sempre estiveram na torcida de todos os fatos e acontecimentos, a minha esposa Lucimara e filha Isa e aos amigos Fábio Miguel, Máx Morel e Návia.

As bibliotecárias do IBILCE que sempre de forma agradável forneceram os objetos do saber e ao Márcio do audiovisual.

Meus agradecimentos à FAPESP, pelo apoio financeiro e boa assessoria.

Finalizo agradecendo ao IBILCE - UNESP, onde há doze anos passei boa parte de minha vida.



Índice

Símbolos e Abreviaturas	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
Capítulo I - Introdução	1
I.1. Sistemas Anfifílicos	1
I.2. Anfifílicos Catiônicos	5
I.3. Vesículas de Anfifílicos Sintéticos	7
I.4. Propriedades Termotrópicas de Vesículas	8
I.5. Efeito de Solutos em Vesículas Sintéticas	13
I.6. Técnicas Aplicadas ao Estudo do Comportamento Termotrópico de Vesículas	13
I.6.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica	14
I.6.2. Fluorescência de Estado Estacionário	20
I.6.3. Rendimento Quântico de Fluorescência	24
I.6.4. Anisotropia de Fluorescência	24
I.6.5. Intensidade das Bandas Vibrônicas I_1 e I_3 do Espectro de Emissão do Pireno	25
I.6.6. Turbidez	27
I.6.7. Condutividade	27
I.7. Objetivos	29
Capítulo II. - Materiais e Métodos	30
II.1. Preparação de Amostras	30
II.1.1. Métodos de Preparação das Vesículas	31
II.1.2. Sondas Fluorescentes	33

II.1.3. Marcadores de Spin	33
II.2. Parte Experimental	33
II.2.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica	33
II.2.2. Fluorescência	35
II.2.3. Turbidez	37
II.2.4. Condutividade	37
Capítulo III - Resultados e Discussão	38
III.1. Efeito da Temperatura	38
III.1.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica	38
III.1.2. Intensidade de Fluorescência	54
III.1.3. Rendimento Quântico de Fluorescência	61
III.1.4. Anisotropia de Fluorescência	71
III.1.5. Supressão de Fluorescência	81
III.1.6. Solubilização de Pireno em Vesículas de DODAB	83
III.1.7. Condutividade de Dispersões de DODAB	88
III.2. Efeito da Temperatura e de Solutos	90
III.2.1. Rendimento Quântico de Fluorescência	90
III.2.2. Anisotropia de Fluorescência	92
III.2.3. Efeito de Solutos na Solubilização de Pireno	102
III.2.4. Turbidez	104
Capítulo IV - Conclusões	105
IV.1. Considerações Finais	105
IV.2. Trabalhos Futuros	108
Capítulo V - Referência Bibliográficas	109

CNC	concentração crítica
DHP	dihexadecil fosfato de sódio
DMPG	dimiristil fosfatidilglicerol
DODAB	dicotadecil dimetilamônio
DODAC	dicotadecil dimetilamônio
DODAX	dicotadecil dimetilamônio (X = Br ou Cl)
DPB	diálil hexabutadieno
DPH	diálil hexatrieno

Símbolos e Abreviaturas

α	grau de ionização
σ	condutividade
ϵ_{abs}	turbidez
$\lambda_{abs}^{máx}$	comprimento de onda de absorção máxima
τ_c	tempo de correlação
Φ_f	rendimento quântico de fluorescência
τ_f	tempo de excitação
$\lambda_{fluor}^{máx}$	comprimento de onda de fluorescência máxima
ΔH_0	largura entre a 1ª e a 3ª linha hiperfina
4B4A	derivadas <i>trans</i> , <i>trans</i> -1-[4-(3-carboxi-propil)difenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno
4H4A	<i>trans</i> , <i>trans</i> , <i>trans</i> -1-[4-(3-carboxi-propil)-fenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno
A	desdobramento hiperfino
$A_{máx}$	comprimento máximo do desdobramento hiperfino
$A_{mín}$	comprimento mínimo do desdobramento hiperfino
a_o	constante hiperfina isotrópica
C ₁₈ TAB	brometo de octadeciltrimetilamônio
CH	ciclohexano
CHCl ₃	clorofórmio
cmc	concentração micelar crítica
DHP	dihexadecil fosfato de sódio
DMPG	dimiristoil fosfatidilglicerol
DODAB	brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAC	cloreto de dioctadecildimetilamônio
DODAX	brometo ou cloreto de dioctadecildimetilamônio (X = Br ⁻ ou Cl ⁻)
DPB	difenil hexabutadieno
DPH	difenil hexatrieno



DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DSC	calorimetria diferencial de varredura
h_{+1}	altura da primeira linha do desdobramento hiperfino do elétron
h_0	altura da segunda linha do desdobramento hiperfino do elétron
h_{-1}	altura da terceira linha do desdobramento hiperfino do elétron
I	número quântico de spin nuclear
I_e	intensidade da luz espalhada
I_i	intensidade da luz incidente
I_t	intensidade da luz transmitida
L_β	estado gel
L_α	estado líquido-cristalino
$L_{\beta'}$	estado ondulado
MeCH	metanol
MESL	metil éster do ácido esteárico
m_I	número quântico magnético
m_s	momento angular de spin
Py	pireno
r	anisotropia de fluorescência
RNM	ressonância nuclear magnética
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
R_s	resistência variável
R_x	resistência desconhecida
S	número quântico de spin
S_0	estado de menor energia ou estado fundamental
S_1 e S_1'	estado excitado <i>singlet</i>
SASL	ácido esteárico
T	temperatura (°C)
<i>t</i> -Dpo	<i>Trans</i> - Difenilpolienos
T_m	temperatura principal de transição do estado gel para o líquido-cristalino
T_p	temperatura de pré-transição ou transição secundária



Índice de Figuras

Fig.	Título	Pág.
01	Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana.	02
02	Hidratação dos anfifílicos durante a formação da estrutura micelar.	04
03	Agregados formados por anfifílicos de diferentes estruturas.	05
04	Estrutura química do brometo de octadeciltrimetilamônio e do brometo de diometildioctadecilamônio.	06
05	Ilustração da bicamada de fosfolipídios acima e abaixo da temperatura de transição.	10
06	Apresentação esquemática de um espectrômetro de RPE.	15
07	Estrutura química dos marcadores de spin 5-MESL e 16-SASL.	17
08	Espectro RPE de 5-SASL em vesículas de DODAB a 15 °C mostrando os parâmetros empíricos de fluidez $A_{\text{máx}}$ e $A_{\text{mín}}$.	18
09	Espectro RPE de 16-MESL em vesículas de DODAB acima da T_m , representação dos parâmetros empíricos de mobilidade e organização, h_{+1} , h_0 e h_{-1} .	19
10	Diagrama de Jablonski.	21
11	Estruturas <i>s-cis</i> de difenilpolienos com duas e três duplas ligações conjugadas.	22
12	Estruturas derivadas dos <i>t</i> -Dpo.	23
13	Bandas vibrônicas do espectro de emissão do Py em água.	26
14	Ilustração das camadas formadas pelos íons na superfície de uma macromolécula.	28
15	Espectros RPE de 5- e 16-MESL e 5- e 16-SASL 0,7 μM em vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM em diferentes temperaturas.	39
16	Espectros RPE (50 °C) de 5-SASL em (a) água, (b) micelas de C_{18}TAB 5,0 mM e (c) vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM. As linhas pontilhadas representam a simulação espectral para as vesículas de DODAB.	41

Fig.	Título	Pág.
17	Efeito da temperatura na razão de amplitude das linhas hiperfinas correspondentes ao número de spin do nitrogênio (a) $m_I = +1$ e $m_I = 0$ (h_{+1}/h_0), (b) $m_I = -1$ e $m_I = 0$ (h_{-1}/h_0) e (c) na constante hiperfina isotrópica (a_0) de 16-SASL em água (✕), em vesículas sonicadas (●) e não-sonicadas (■) de DODAB e em micelas de C_{18} TAB (▲), e de 16-MESL em vesículas sonicadas (O) e não-sonicadas (□) de DODAB e em micelas de C_{18} TAB (Δ).	43
18	Espectros RPE de 16-MESL em vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM a 40 °C, obtidos por aquecimento seguido de resfriamento da dispersão no intervalo de temperatura de 15 a 55 °C.	45
19	(a) Efeito da temperatura na razão b/a das amplitudes dos picos do espectro de RPE de 16-MESL em vesículas de DODAB 5,0 mM não-sonicadas, obtido por aquecimento (■) e resfriamento (■) e sonicadas, por aquecimento (●). (b) Efeito da temperatura na largura da segunda linha hiperfina (ΔH_0) do espectro de RPE de 16-SASL em vesículas de DODAB 5,0 mM não-sonicadas (□) e sonicadas (O), obtido por aquecimento, e de 16-MESL em vesículas não-sonicadas obtido por aquecimento (■) e resfriamento (■) em sonicadas por aquecimento (●).	46
20	Espectros RPE de 5- e 16-MESL, e 5- e 16-SASL 0,7 μ M em vesículas sonicadas de DODAB 5,0 mM para quatro diferentes temperaturas.	48
21	Espectros RPE de 16-MESL a 35 °C em dispersões sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB; (c) diferença dos espectros (a) menos (b) e em micelas de C_{18} TAB (d). Espectros de 5-SASL em dispersões sonicadas (e) e micelas de C_{18} TAB (f).	50
22	Espectros RPE de 5- e 16-MESL, e 5- e 16-SASL em vesículas sonicadas de DODAC 5,0 mM em quatro diferentes temperaturas.	53
23	Espectro de absorção de DPH 2,2 μ M em ciclohexano (a) e em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM (b) a 25 °C.	55

- 24 Espectros de excitação (—) e emissão (—) de fluorescência de DPB e 4B4A em ciclohexano (CH) e clorofórmio. 56
- 25 Espectros de excitação (—) e emissão (—) de fluorescência de DPH e 4H4A em ciclohexano (CH) e clorofórmio. 57
- 26 Espectros de emissão de fluorescência de 4H4A em dispersão sonicada de DODAB obtidos *ca.* 10 min. (—) e 4 horas após a adição (—) da sonda. 58
- 27 Cinética de incorporação de 4H4A 2,5 μM excitada em 365 nm na bicamada de vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM. A sonda foi diluída em metanol e injetada a dispersão vesicular imediatamente antes do início da medida. A reta pontilhada indica o patamar atingido pela curva. 59
- 28 Espectros de emissão de fluorescência de 4H4A 2,22 μM em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM em diferentes temperaturas. 60
- 29 Efeito da temperatura no rendimento quântico de DPH e 4H4A em ciclohexano e clorofórmio, respectivamente. 61
- 30 Efeito da temperatura no rendimento quântico de 4H4A 0,4, 2,22 e 40,0 μM incorporada 18 horas antes do experimento em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM. 63
- 31 Efeito da temperatura no rendimento quântico de fluorescência normalizado de 4H4A 2,22 μM em dispersão sonicada de DODAB: (●) 25 min., (●) 150 min. e (●) 18 horas, após a adição da sonda. 64
- 32 Rendimento quântico de fluorescência de 4H4A 2,22 μM em vesículas sonicadas de DODAB em função da temperatura, para diferentes concentrações do anfifílico. 66
- 33 Efeito da temperatura no rendimento quântico de 4B4A 2,22 μM em vesículas sonicadas (a), injetadas (b) e não-sonicadas (c) de DODAB 1,0, 0,5 e 0,5 mM, respectivamente. A seta cinza no gráfico (c) indica a T_p . 68



Fig.	Título	Pág.
34	Efeito da temperatura no rendimento quântico de 4H4A 2,22 μ M em vesículas sonicadas (a), injetadas (b) e não-sonicadas (c) de DODAB 1,0, 0,5 e 0,5 mM, respectivamente. A seta cinza no gráfico (c) indica a T_p .	69
35	Efeito da temperatura na anisotropia de DPH (O, Δ e $\square$) e 4H4A ($\bullet$, $\blacktriangle$ e $\blacksquare$) em vesículas (a) sonicadas, (b) injetadas e (c) não-sonicadas de DODAB.	73
36	Efeito da temperatura na anisotropia de DPB (O, Δ e $\square$) e 4B4A ($\bullet$, $\blacktriangle$ e $\blacksquare$) em vesículas (a) sonicadas, (b) injetadas e (c) não-sonicadas de DODAB.	74
37	Efeito da temperatura na anisotropia de (a) DPH e (b) 4H4A em vesículas sonicadas de DODAB, obtido por aquecimento ($\bullet$ e $\bullet$) e resfriamento (O e O) da amostra vesicular.	76
38	Efeito da temperatura na anisotropia de (a) DPH e (b) 4H4A em vesículas não-sonicadas de DODAB, obtido por aquecimento ($\blacksquare$ e $\blacksquare$) e resfriamento resfriamento ($\square$ e $\square$) da amostra vesicular.	77
39	Efeito da temperatura na anisotropia de DPH em vesículas sonicadas com ponta de Ti por diferentes tempos.	78
40	Efeito da temperatura na anisotropia de DPH ($\bullet$ e $\circ$) e 4H4A ($\bullet$ e $\circ$) em vesículas sonicadas de (a) DODAB 1,0 mM e (b) DHP 1,0 mM.	80
41	Efeito do nitrometano na supressão de fluorescência de DPH e 4H4A em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM. I_o e I_f são, respectivamente, a intensidade de fluorescência sem e com o supressor. O nitrometano foi previamente diluído em metanol a concentração de 10^{-6} M e adicionado micro volumes a amostra vesicular.	82
42	Espectros de emissão do pireno 10^{-6} M em água, NaBr e vesículas sonicadas de DODAB 0,9 mM (25 °C).	84

Fig.	Título	Pág.
43	Razão (I_1/I_3) dos picos vibrônico de emissão de fluorescência do pireno em vesículas sonicadas (●) e não-sonicada (■) de DODAB a 25 °C.	85
44	Efeito da temperatura na razão I_1/I_3 dos picos vibrônicos de emissão de fluorescência de Py 10^{-6} M em dispersão de vesículas sonicadas (●) e não-sonicada (■) de DODAB 0,5 mM. Adaptado da referência 54.	87
45	Efeito da temperatura na subtração da condutividade normalizada da dispersão sonicada (●) e não-sonicada (■) de DODAB 5,0 mM pela condutividade normalizada de brometo de tetrametilamônio ((CH ₃) ₄ N ⁺ Br ⁻) 1,0 mM.	89
46	Efeito da temperatura no rendimento quântico de fluorescência normalizado de DPH 2,22 μM em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em água e diferentes solutos a 0,4 M.	91
47	Efeito da temperatura na anisotropia de (a) DPH e (b) 4H4A em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em (●) água, (●) D-glicose, (●) sacarose e (●) uréia 0,4 M.	94
48	Efeito da temperatura na anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM, (a) preparadas em água e diferentes solutos 0,4 M e (b) diferentes concentrações de D-glicose.	96
49	Efeito da temperatura na anisotropia de DPH, em vesículas não-sonicadas de DODAB 0,5 mM, preparadas em água e 0,4 M de diferentes solutos.	98
50	Efeito da temperatura na anisotropia de DPH em vesículas sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB 0,5 mM, preparadas em água (●), 0,5 (●), 1,0 (●) e 2,0 mM (●) de NaCl.	100
51	Efeito da temperatura na anisotropia de 4H4A em vesículas sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB 0,5 mM, preparadas em água (●) e NaCl 0,5 mM (●).	101
52	Efeito da concentração de DODAB na razão I_1/I_3 dos picos vibrônico de emissão do pireno 10^{-6} M em dispersão sonicada em água, a 25 °C.	102

Fig.	Título	Pág.
53	Efeito da concentração de DODAB na razão dos picos vibrônico de emissão de fluorescência I_1 e I_3 do pireno 10^{-6} M em dispersão sonicada em diferentes solutos não-iônicos 0,4 M e NaCl 2,0 mM, a 25 °C.	103
54	Efeito da concentração de DODAB na turbidez de vesículas sonicadas de DODAB, preparadas em água, D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M e NaCl 2,0 mM (25 °C).	104
55	Porcentagem do carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H), na molécula de DODAB obtida por análise elementar e valores esperados.	31
56	T_m e T_m^0 obtidas por rendimento químico de fluorescência de 4B4A e 4B4A solubilizadas em vesículas de DODAB sonicadas, injetadas e não-sonicadas. Valores obtidos das Figuras 34 e 35.	73
57	Valores de T_m obtidos por anisotropia de DPB, 4B4A, DPH and 4B4A em vesículas sonicadas, injetadas e não-sonicadas de DODAB, obtidas das Figuras 36 e 37.	74
58	T_m de vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em diferentes solutos. Valores obtidos da Figura 43.	93
59	T_m obtida por anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM, preparadas em diferentes solutos e diferentes concentrações de D-glicose extraída da Figura 49.	97

Índice de Tabelas

Tab.	Título	Pág.
01	Valores da temperatura de transição (T_m) para dispersões de DODAB E DODAC preparadas por diferentes métodos	11
02	Comprimento de onda máxima absorção ($\lambda_{abs}^{máx}$), comprimento de onda de máxima fluorescência ($\lambda_{fluor}^{máx}$), rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e tempo de vida de excitação (τ_f) de algumas moléculas derivadas de <i>t</i> -Dpo em alguns solventes orgânicos.	23
03	Porcentagem do carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H), na molécula de DODAB obtida por análise elementar e valores esperados.	31
04	T_p e T_m obtidas por rendimento quântico de fluorescência de 4B4A e 4H4A solubilizadas em vesículas de DODAB sonicadas, injetadas e não-sonicadas. Valores obtidos das Figuras 34 e 35.	75
05	Valores de T_m obtidos por anisotropia de DPB, 4B4A, DPH and 4H4A em vesículas sonicadas, injetadas e não-sonicadas de DODAB, obtidas das Figuras 36 e 37.	74
06	T_m de vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em diferentes solutos. Valores obtidos da Figura 48.	93
07	T_m obtida por anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM, preparadas em diferentes solutos e diferentes concentrações de D-glicose, extraída da Figura 49.	97

PROPRIEDADES TERMOTRÓPICAS DE VESÍCULAS DE ANFIFÍLICOS SINTÉTICOS PREPARADAS POR DIFERENTES MÉTODOS. Tese de Doutorado apresentada por Carlos Roberto Benatti à UNESP, campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, 2000.

RESUMO

Ainda que dispersões do anfifílico catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) tenham sido muito estudadas, suas propriedades ainda não são completamente conhecidas. Sabe-se que a estrutura e propriedades das vesículas anfifílicas depende do método de preparação, da concentração de anfifílicos, força iônica, temperatura, etc., mas pouco se sabe sobre o efeito quantitativo desses parâmetros na estrutura das vesículas. Neste trabalho utilizamos ressonância paramagnética eletrônica (RPE), fluorescência de estado estacionário e turbidez para investigar o comportamento termotrópico de fase e a transição de fase gel para líquido-cristalino (T_m) de DODAB em água, na ausência e presença de D-glicose, sacarose, uréia e NaCl. As dispersões foram preparadas por sonicação a banho, injeção clorofórmica e diluição simples (não-sonicação), a fim de obter vesículas unilamelares pequenas, grandes e gigantes, respectivamente.

Os espectros RPE indicam que, abaixo da $T_m \approx 42,7^\circ\text{C}$, as vesículas não-sonicadas de DODAB consistem de uma única fase (fase gel), enquanto que as vesículas sonicadas consistem de duas fases ou populações distintas, uma similar à obtida para as não-sonicadas e a outra em um estado mais móvel, comparável ao estado líquido-cristalino, com $T_m \approx 39^\circ\text{C}$. Os resultados de RPE e fluorescência indicam que a T_m e a cooperatividade da transição diminuem com o tamanho das vesículas. Solutos iônicos e não-iônicos produzem maior efeito na T_m das vesículas sonicadas do que na das não-sonicadas. Os resultados sugerem que a densidade de empacotamento da bicamada das vesículas de DODAB varia de acordo com a sequência: sonicadas < injetadas < não-sonicadas, ou seja, aumenta com o aumento do tamanho vesicular.

THERMOTROPIC PROPERTIES OF VESICLES OF SYNTHETIC AMPHIPHILIC PREPARED BY DIFFERENT METHODS. Doctor's thesis presented by Carlos Roberto Benatti to Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus of São José do Rio Preto, State of São Paulo, Brazil, to obtain the Doctor's Degree in Molecular Biophysics, 2000.

ABSTRACT

In spite of being widely investigated, the properties the cationic surfactant dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) dispersions are still not completely understood. It is known that the structure and properties of the amphiphilic vesicles depend on the preparation protocol, on the amphiphile concentration, ionic strength, temperature etc. In this work we have used electron paramagnetic resonance (EPR), steady-state fluorescence and turbidity methods to investigate the thermotropic phase behavior and the gel to liquid-crystalline phase transition temperature (T_m) of the cationic amphiphile dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) prepared in water, in the absence and presence of D-glucose, sucrose, urea, and NaCl. Small, large and giant unilamellar vesicles were prepared by bath-sonication, chloroform-injection and simple dilution (non-sonication), respectively.

The EPR spectra indicate that below $T_m \approx 42.7$ °C the non-sonicated DODAB vesicles consist of a single (gel) phase, whereas DODAB sonicated dispersions indicate the presence of two phases: the gel phase similar to that obtained for the non-sonicated samples ($T_m \approx 39$ °C), and the other one (liquid-crystalline-like) in which the spin labels are more mobile within the investigated temperatures (15 to 50 °C). The results indicate that T_m and the cooperativity of the phase behavior tend to decrease when the vesicle size is augmented. Ionic and non-ionic solutes have stronger effects on the sonicated than non-sonicated vesicles. The results also indicate that the bilayer packing in DODAB vesicles varies in the protocol sequence: sonicated < injected < non-sonicated, that is, it increases with the vesicle size.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1. Sistemas Anfifílicos

Os lipídios são os componentes que estruturam as membranas celulares organizando-se em duas monocamadas justapostas, uma interna e a outra externa, tornando as membranas celulares capazes de reter componentes biológicos no seu interior. Como as células não são sistemas isolados, o seu interior comunica-se com o exterior por difusão ou através de canais de proteínas. Existe uma variedade de lipídios; porém, uma característica comum entre eles é a estrutura dual com diferentes polaridades, uma parte hidrofílica ou polar, provida ou não de carga, e a outra parte hidrofóbica ou apolar, geralmente formada por cadeias de hidrocarbonetos. Devido a esta característica bipolar, os lipídios são denominados de moléculas anfipáticas (ou anfifílicas).

Langmuir foi o primeiro pesquisador a considerar a importância de interações entre lipídios na formação de monocamadas. Seus contemporâneos, Gorter e Grendel, na década de 20, demonstraram que a estrutura básica das membranas biológicas é provavelmente uma bicamada lipídica.¹ Dez anos depois, em 1935, Danielli e Davison² propuseram o modelo da estrutura de bicamada, o que levou Singer e Nicolson a estabelecer em 1972 o modelo do mosaico fluido,³ aceito até hoje, no qual a bicamada lipídica contém proteínas em seu interior, Figura 1. Devido à importância dos lipídios nos sistemas biológicos e à

complexidade das membranas celulares, foram desenvolvidos modelos para facilitar o entendimento da estrutura e função das membranas celulares. Foi a partir do trabalho de Bangham e cols.,⁴ em 1965, que houve uma maior expansão no estudo das propriedades desses sistemas-modelo para se estudar as membranas biológicas. Em 1976, Kunitake e cols.⁵ obtiveram pela primeira vez vesículas sintéticas de sais de amônio quaternário. A partir de então, muitos estudos foram feitos com sistemas de anfífilicos sintéticos procurando correlacionar suas propriedades com as dos sistemas lipídicos.

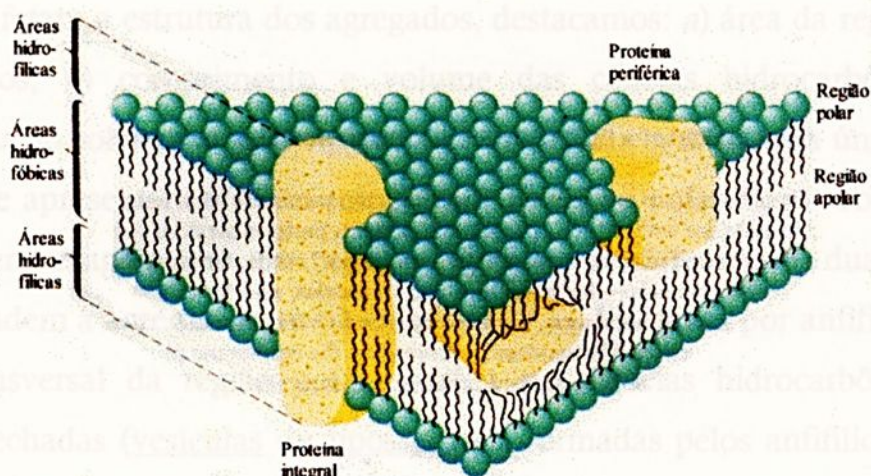


Figura 1: Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana. (J. R. Holun, Fundamentals of General, Organic, and Biological Chemistry, John. Wiley, Nova Iorque, 1995, p.180)

Assim como os lipídios, os anfífilicos sintéticos têm diferentes estruturas, geralmente com uma ou duas cadeias alquílicas ligadas covalentemente ao grupo polar. Quando hidratados, os anfífilicos podem se agregar em diferentes

estruturas. Na presença de água, a região polar (hidrofílica) tende a aumentar a desordem local das moléculas de água e a região apolar (hidrofóbica) tem um efeito de ordenar as moléculas de água próximas. O efeito hidrofóbico direciona a formação e a manutenção dos agregados.⁶ Os anfifílicos agregam-se de modo a minimizar a área de contato das caudas com a água, resultando em um aumento na entropia, Figura 2. A hidratação dos anfifílicos, como de outras moléculas, ocorre com a formação de várias camadas de moléculas de água sobre a molécula hidratada, conhecidas como camadas de solvatação. O grau de liberdade das moléculas de água é diminuído quanto mais próximas estão da molécula solvatada.

A estrutura formada pela agregação de anfifílicos em um dado solvente depende da natureza dos anfifílicos e das características do meio. Dentre os fatores que afetam a estrutura dos agregados, destacamos: *a)* área da região polar dos anfifílicos; *b)* comprimento e volume das cadeias hidrocarbônicas; *c)* características do solvente e *d)* temperatura.⁷ Os anfifílicos com uma única cadeia alquílica, que apresentam a seção transversal da região polar maior do que a da cauda, tendem a agregar-se em micelas esféricas; anfifílicos com duas cadeias alquílicas tendem a agregar-se em bicamadas planas, formadas por anfifílicos com a seção transversal da região polar igual a das cadeias hidrocarbônicas, ou bicamadas fechadas (vesículas ou lipossomos), formadas pelos anfifílicos com a seção transversal da região polar maior do que a das cadeias hidrocarbônicas, como um cone truncado,⁸ Figura 3.

Neste trabalho a estrutura mais investigada foi a vesicular, que apresenta um grande potencial de aplicação biológica, farmacêutica e industrial. Por exemplo, no encapsulamento de drogas,⁹ em catálises,¹⁰ como bactericidas,¹¹ cosméticos,¹² terapia gênica,¹³ etc.

Figura 2: Hidratação dos anfifílicos durante a formação da estrutura micelar. (a) L.

L. J. de Aguiar e M. R. P. de Aguiar, *Princípios de Bioquímica*, Santos, São Paulo, 1995, p. 84.

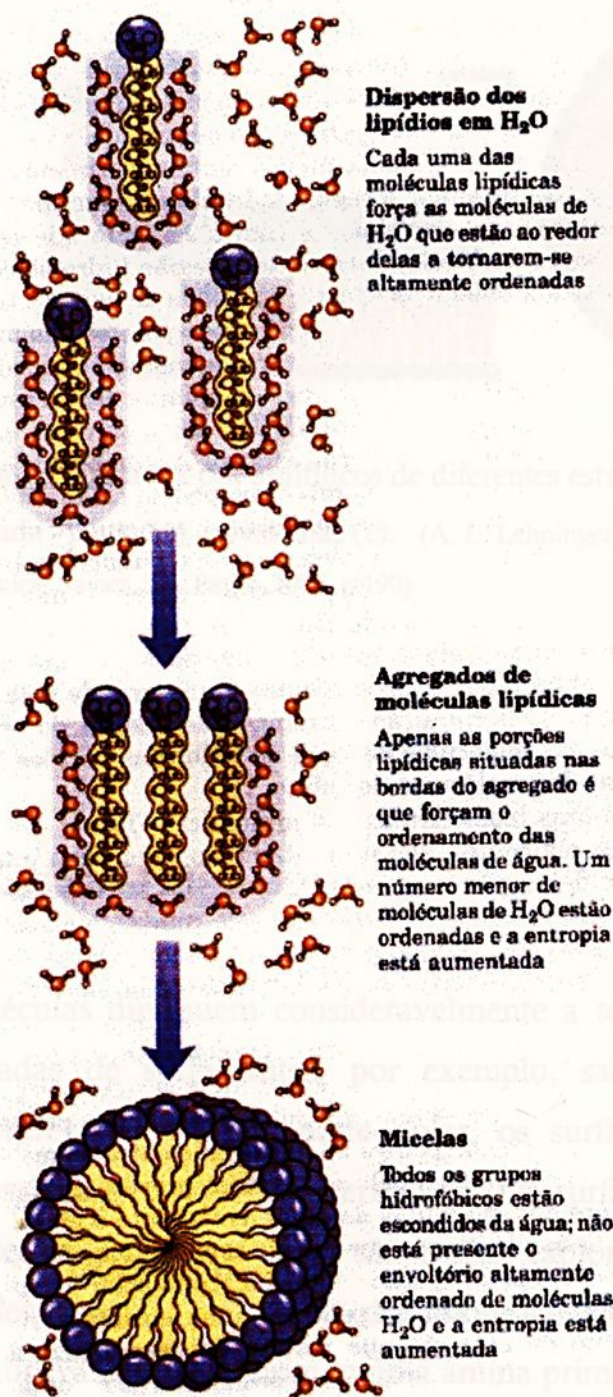


Figura 2: Hidratação dos anfifílicos durante a formação da estrutura micelar. (A. L.

Lehninger e cols. Princípios de Bioquímica, Savier, São Paulo, 1995, p.66)

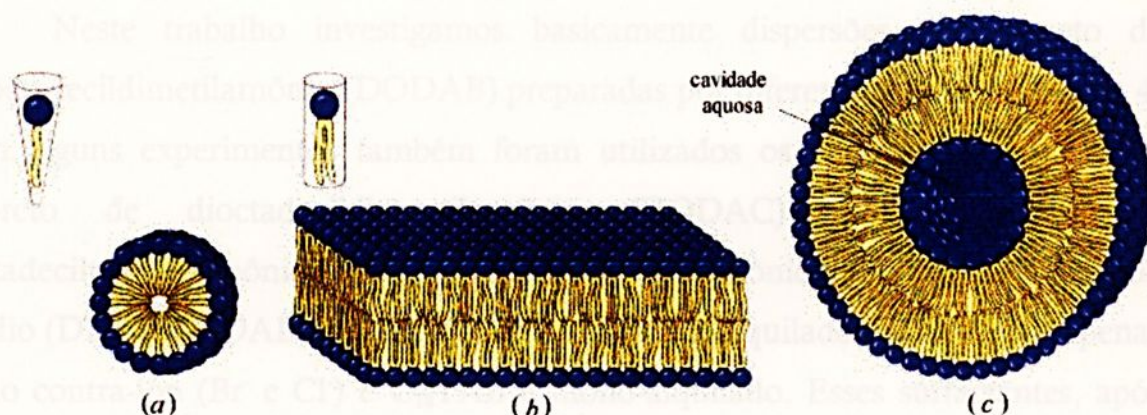


Figura 3: Agregados formados por anfífilos de diferentes estruturas: micela (a), Bicamada plana (b) e vesículas (c). (A. L. Lehninger e cols. Princípios de Bioquímica, Savier, São Paulo, 1995, p.190)

I.2. Anfífilos Catiônicos

Algumas moléculas diminuem consideravelmente a tensão superficial da água, e são chamadas de surfactantes; por exemplo, sabão e detergente.¹⁴ Dependendo da natureza elétrica da parte polar, os surfactantes podem ser catiônicos, aniônicos, não-iônicos ou zwitteriônicos. Os surfactantes catiônicos derivados de sais de amônio quaternário são muito explorados no estudo de agregados supramoleculares.^{5,8,10,11,13,14} Sais de amônio quaternário são obtidos pelo processo de exaustiva metilação usando uma amina primária ou secundária e um cloreto de alquila. A formação de anfífilos derivados de sais de amônio quaternário ocorre com a ligação de uma ou mais cadeias alquílicas ao nitrogênio.¹⁴ A polaridade do meio, o tamanho da(s) cadeia(s) hidrocarbônica(s), a temperatura e a sua estrutura molecular são propriedades determinantes da solubilidade dos anfífilos em geral.¹⁵ Os anfífilos derivados de sais de amônio quaternário são solúveis em solventes orgânicos como o etanol, clorofórmio,

acetato de etila, diclorometano, entre outros. A solubilidade em água diminui com o tamanho e número da cadeia alquílica.

Neste trabalho investigamos basicamente dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) preparadas por diferentes métodos, Figura 4. Em alguns experimentos também foram utilizados os surfactantes homólogos cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC) e o brometo de octadeciltrimetilamônio ($C_{18}TAB$) e o surfactante aniônico dihexadecil fosfato de sódio (DHP). DODAB e DODAC são anfifílicos dialquilados que diferem apenas pelo contra-íon (Br^- e Cl^-) e $C_{18}TAB$ é mono-alquilado. Esses surfactantes, após hidratados a uma dada temperatura e concentração, tendem a agregar-se formando vesículas ou micelas.

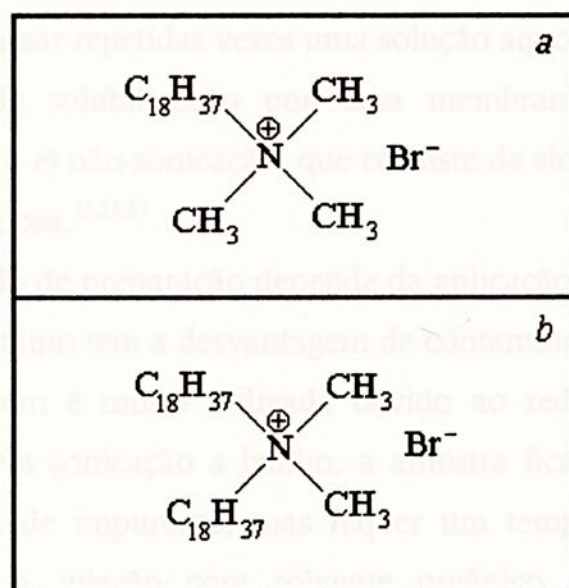


Figura 4: Estrutura química do (a) brometo de octadeciltrimetilamônio ($C_{18}TAB$) e (b) brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).

I.3. Vesículas de Anfífilicos Sintéticos

A hidrofobicidade dos anfífilicos aumenta com o número e tamanho das caudas.¹⁶ Anfífilicos dialquilados são em geral pouco solúveis em água e a formação de vesículas requer métodos especiais de preparação. As vesículas podem ser esféricas ou não-esféricas,¹⁷ com uma ou mais bicamadas (lamelas), denominadas uni ou multilamelares.⁸ Quando compostas de fosfolipídios naturais, as vesículas são freqüentemente chamadas de lipossomos.

O tamanho e as propriedades das vesículas em geral dependem do método de preparação. Os métodos mais utilizados são: a) sonicação com ponta de titânio, no qual as ondas de ultra-som são emanadas de uma ponta de titânio diretamente na amostra;¹⁸⁻²¹ b) sonicação a banho, que propaga ondas de ultra-som através da amostra em banho-maria;^{22,23} c) injeção clorofórmica, etanólica ou diclorometano, no qual o surfactante diluído no solvente orgânico é injetado em uma solução aquosa acima da temperatura de evaporação do solvente;^{21,24,25} d) extrusão, no qual se faz passar repetidas vezes uma solução aquosa do surfactante acima da temperatura de solubilização por uma membrana de náilon de porosidade conhecida;^{25,26} e) não-sonicação, que consiste de simples diluição do surfactante em solução aquosa.^{22,23,27}

A escolha do método de preparação depende da aplicação das vesículas. A sonicação com ponta de titânio tem a desvantagem de contaminar a amostra com partículas de titânio, porém é muito utilizada devido ao reduzido tempo de exposição ao ultra-som. Na sonicação a banho, a amostra fica vedada em um frasco de vidro e isolada de impurezas, mas requer um tempo maior para a obtenção das vesículas. A injeção com solvente orgânico, em geral deixa resquícios do solvente na dispersão. Vesículas de tamanhos variados podem ser preparadas por extrusão, que apresenta pouco risco de contaminação durante o preparo e cujo tamanho dos poros da membrana de náilon pode limitar a passagem de algumas moléculas no processo de encapsulamento. As vesículas formadas por simples diluição (não-sonicadas) são grandes, o que pode facilitar o encapsulamento de moléculas.

Medidas de tamanho das vesículas têm mostrado que o raio das vesículas sonicadas varia de 150 – 800 Å,^{21,23} o das vesículas injetadas (clorofórmica ou diclorometano) varia de 800 a 2000 Å,^{21,24} o das vesículas extrudadas está no intervalo de variação entre as vesículas sonicadas e as injetadas, porém, depende da porosidade da membrana de náilon e das não-sonicadas é maior que 2000 Å.²³

I.4. Propriedades Termotrópicas de Vesículas

As vesículas podem durar dias, semanas ou meses, dependendo das condições do solvente e estocagem. Utilizando vesículas pequenas de fosfolipídios derivados de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), preparadas por extrusão, Lichtenberg e *cols.*²⁸ observaram que as vesículas com diâmetro de até 400 Å são instáveis abaixo de sua temperatura de transição e fundem-se espontaneamente formando vesículas maiores. Yoger e *cols.*²⁹ estabeleceram condições específicas nas quais comprovaram que na presença de Na₂SO₄ vesículas sonicadas de DODAB fundem-se, acarretando uma diminuição na curvatura das vesículas. Carmona-Ribeiro e *cols.*³⁰ observaram que vesículas pequenas de DODAC preparadas pelo método de sonicação com ponta de Ti são meta-estáveis. Estruturas estáveis foram observadas para as vesículas grandes obtidas por injeção clorofórmica.^{30a} Kodama e *cols.* demonstraram que no sistema binário DODAB/água, DODAB na fase gel está no estado termodinâmico meta-estável.³¹

A composição anfifílica e as condições do meio, tal como, o pH,³² força iônica,^{24,33-35} presença de solutos,³⁶⁻³⁹ a temperatura,^{15,17,40,41} etc., podem ser sistematicamente controladas no estudo das propriedades físico-químicas de vesículas. Um processo que tem recebido grande atenção nos sistemas de anfifílicos é o comportamento de fase da bicamada vesicular induzido pela temperatura.

Esforços têm sido feitos para elucidar a correlação entre a transição gel $\leftrightarrow$ líquido-cristalino com a estrutura e organização dos anfífilicos em bicamadas vesiculares.³⁹⁻⁵⁸ A transição de fase dos fosfolipídios tem atraído estudos teóricos e experimentais pois ela reflete as interações fosfolipídio-fosfolipídio e fosfolipídio-solvente. As principais fases lamelares dos anfífilicos são a tipo sólida com as cadeias alquílicas no estado cristalino (ou estado gel, L_β) e a líquido anisotrópico com as cadeias fluidas (estado líquido-cristalino, L_α).^{8,42,43} No estado gel, a baixas temperaturas, as cadeias anfífilicas estão posicionadas perpendicularmente à superfície da bicamada ou um pouco inclinadas (estado L_β), estando rígidas e estendidas, enquanto que a elevadas temperaturas, estado líquido-cristalino, as cadeias dos anfífilicos estão mais flexíveis. A transição entre esses dois estados se dá em uma estreita região de temperatura, na temperatura de transição de fase, “melting temperature” (T_m), Figura 5. Variações no número, tamanho e composição das cadeias alteram a T_m .⁴⁴ Na transição do estado gel para o líquido-cristalino várias alterações nos anfífilicos e conseqüentemente nas propriedades das vesículas têm sido reportadas para sistemas de fosfolipídios. Os fosfolipídios sofrem uma variação conformacional resultando em uma redução no volume interno das vesículas,^{45,46} e um aumento na área ocupada pela região polar anfífilica, acarretando um aumento no diâmetro das vesículas.^{47,48,49} A hidratação dos fosfolipídios aumenta com a temperatura.⁵⁰ Bagatolli e Gratton reportaram que moléculas de água devem penetrar na bicamada para acomodar o maior diâmetro vesicular correspondente à fase fluida.⁴⁹

Durante a transição de fase em membranas lipídicas, flutuações na entalpia são maximizadas nas cadeias hidrocarbônicas resultando em uma pronunciada maximização da capacidade calorífica. Uma transição de baixa entalpia, abaixo da T_m , tem sido observada em membranas lipídicas para a fase ondulada (“ripple phase”) na temperatura de pré-transição (T_p).⁵¹⁻⁵⁴ A T_p é consideravelmente menos cooperativa do que a T_m e o intervalo de temperatura entre T_p e T_m aparentemente depende do comprimento das cadeias. A T_p aparenta depender do estado de empacotamento dos anfífilicos.⁵⁵ As membranas multilamelares mostram uma T_p claramente distinguível da T_m , porém a T_p pode também ser

detectada em sistemas unilamelares,^{55,56} para os quais o intervalo de temperatura entre a T_p e a T_m é menor do que para as membranas multilamelares. A existência da T_p é dependente do tamanho da região polar dos anfífilicos, diminuindo conforme aumenta a área ocupada pela cabeça polar.⁵⁷ A T_p e a T_m têm sido relacionadas também com a curvatura das vesículas. Brumm e cols.⁵⁸ observaram que a curvatura de vesículas fosfolipídicas influencia fortemente o comportamento da transição de fase das membranas, concluindo que a T_m diminui com o aumento da curvatura da superfície vesicular. Cálculos teóricos sugerem que a variação da T_m pode ser entendida como uma redução da pressão lateral na bicamada com o aumento da curvatura.⁵⁸

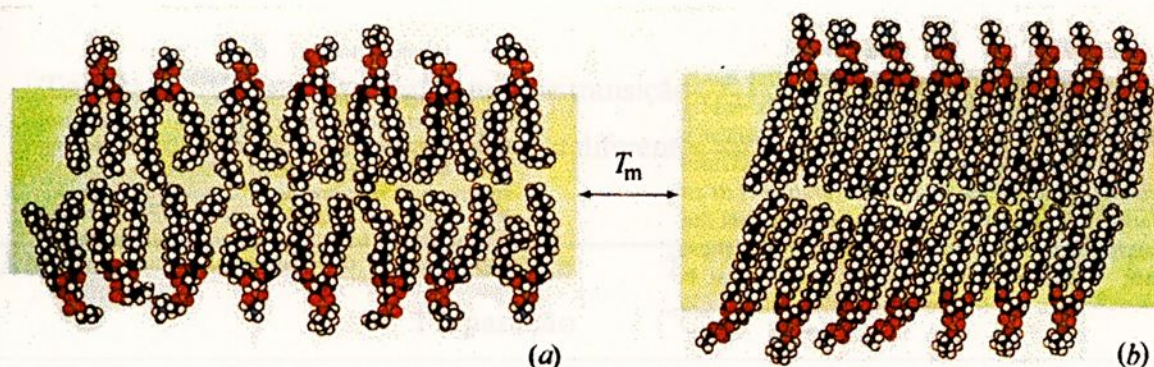


Figura 5: Ilustração da bicamada de fosfolípidios, (a) acima e (b) abaixo da temperatura de transição. (D. Voet e J. G. Voet, Biochemistry, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1990, p.283)

O movimento das cadeias hidrocarbônicas de DODAB e DODAC é restrito, mesmo acima da T_m .³¹ Este movimento se deve à flexibilidade das cadeias hidrocarbônicas pela rotação das ligações, movimento térmico aleatório e deslocamento lateral das moléculas.⁵⁹ No entanto, a bicamada vesicular é comumente descrita como um meio fluido.

Na Tabela 1 listamos alguns valores da T_m obtidos por diferentes métodos e grupos de pesquisa para vesículas de DODAB e DODAC preparadas por diferentes métodos. Observamos que os valores de T_m obtidos por um dado método diferem entre si, sugerindo que a T_m ocorre em uma pequena faixa de temperatura e depende do contra-íon.

Esta seleção de resultados mostra que a transição de fase em sistemas vesiculares precisa ser melhor explorada para que se entenda a relação estrutura-função das vesículas e a sua aplicação como sistemas miméticos de membranas naturais. Uma descrição compreensiva do comportamento de fase dos anfifílicos é difícil pois envolve várias interações que contribuem para o equilíbrio das fases (efeito hidrofóbico, estérico, eletrostático, interações de van der Waals, etc.).

Tabela 1*: Valores da temperatura de transição (T_m) para dispersões de DODAB e DODAC preparadas por diferentes métodos.

Anfifílico	Solvente	Método de Preparação	T_m^a (°C)	T_m^b (°C)	Metodologia	Ref.
DODAC	água	sonicação/Ti	35,1	46,8 ^c	turbidez	18
DODAC	água	sonicação/Ti	35,5		polariz. fluoresc.	18
DODAC	água	sonicação/Ti	38,0		viscosidade	18
DODAC	colesterol 17%	sonicação/Ti	37,6		viscosidade	18
DODAC	água	sonicação/Ti	36,2	42,9 ^c	redução osmót.	18
DODAC	água	sonicação/Ti	37,0		anilação	18
DODAC	NaCl 5,0 mM	sonicação/Ti	37,5		pressão superfície	60
DODAC	NaCl 42 mM	sonicação/Ti	38,6		turbidez	61
DODAC	água	sonicação/Ti	38,0		ESR	62
DODAC	água	sonicação/Ti	40,0		pireno	62
DODAC	água	sonicação/Ti	37,5	34,8	turbidez	63
DODAC	água	injeção/CHCl ₃	38,6	34,4	turbidez	63
DODAC	água	injeção/CHCl ₃	47,5	42,0	turbidez	64

Anfifílico	Solvente	Método de Preparação	T_m^a (°C)	T_m^b (°C)	Metodologia	Ref.
DODAC	água	não-sonicação	46,0		DSC	65
DODAC	água	não-sonicação	47,9		DSC	66
DODAC	água	sonicação	47,8		DSC	66
DODAC	água	extrusão 200 nm	47,1		DSC	66
DODAB	Hepes	não-sonicação	47,8		DSC	67
DODAB	água	sonicação/banho	45,0		espalham. de luz	23
DODAB	água	sonicação/Ti	36,0		fluorescência	68
DODAB	água	sonicação/Ti	36,0		anisotropia	17
DODAB	água	sonicação	43,0		rendim. quântico	54
DODAB	água	sonicação/banho	36,0	40,3 ^c	DSC	54
DODAB	água	não-sonicação	35,0	42,0 ^c	rendim. quântico	54
DODAB	água	não-sonicação	36,0	45,2 ^c	DSC	54
DODAB	água	não-sonicação	44,8		DSC	34
DODAB	água	injeção/CHCl ₃	43,5	39,0	turbidez	64
DODAB	água	sonicação/Ti	35,0		anisotropia	69
DODAB	água	não-sonicação	45,3		DSC	66
DODAB	água	sonicação	46,7		DSC	66
DODAB	água	extrusão 200 nm	44,8		DSC	66

* Tabela adaptada da Ref. 66 e complementada;

- medidas feitas por o aquecimento (a) ou resfriamento (b) da amostra;
(c) segunda transição observada.

A tabela acima mostra a dificuldade na obtenção da T_m de DODAB e DODAC, cujos valores flutuam em função não apenas do método de obtenção como também do modo de preparar as vesículas. O baixo valor obtido na T_m de DODAC podem ser explicados pela pequena presença de cadeias C16 contida nos anfifílicos de DODAC. Os fatores que influenciam a transição de fase do estado gel para o líquido-cristalino variam desde o método de preparo até o tamanho e polidispersidade das vesículas. Nosso trabalho reporta o efeito do método de preparação das vesículas e de solutos nas suas propriedades termotrópicas.

I.5. Efeito de Solutos em Vesículas Sintéticas

Em meio líquido, moléculas do soluto difundem-se rapidamente e interagem constantemente com as moléculas da vizinhança. Geralmente as moléculas do soluto causam uma perturbação local na ordem das moléculas do solvente. A presença de solutos pode alterar as propriedades do solvente, tal como o momento de dipolo ou grau de ionização e,⁷ portanto, alterar o empacotamento das cadeias hidrofóbicas e as propriedades das vesículas.^{36,54}

O efeito de solutos nas vesículas depende diretamente das características dos mesmos. Solutos como sacarídeos interagem mais com a região da interface vesicular,³⁶ enquanto que a uréia pode interagir com a região hidrofóbica da bicamada.⁷⁰ Alguns autores têm reportado o efeito de solutos no comportamento termotrópico de vesículas formadas por fosfolipídios de cadeias saturadas, como DPPC.^{71,72} Variações da T_m de vesículas em solutos para baixo ou para cima da T_m de vesículas em água são os mais pronunciados e detectáveis efeitos de solutos no comportamento de fase dos anfifílicos. Analisando vesículas unilamelares extrudadas de DPPC em presença de sacarídeos como glicose, frutose, sacarose e trealose, observou-se que a T_m aumenta,⁷¹ porém com diferentes efeitos entre os açúcares.

Tem-se explorado muito pouco o efeito de solutos nas propriedades termotrópicas de vesículas de anfifílicos derivados de amônio quaternário.

I.6. Técnicas Aplicadas ao Estudo do Comportamento

Termotrópico de Vesículas

Diversas técnicas têm sido aplicadas no estudo das propriedades de vesículas de anfifílicos naturais ou sintéticos, por exemplo, turbidez, espalhamento de luz, fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo,

ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), calorimetria diferencial de varredura (DSC), entre outras. Informações sobre o grau de ordem ou fluidez da bicamada anfifílica podem ser obtidas por técnicas espectroscópicas, tais como fluorescência^{54,73} e ressonância paramagnética eletrônica (RPE).^{74,75} Neste trabalho, utilizamos basicamente as técnicas de RPE e fluorescência de estado estacionário para o estudo das propriedades termotrópicas de vesículas de DODAB.

As propriedades moleculares dependem das ligações formadas por seus elétrons. A luz emitida por um feixe pode ser absorvida ou espalhada por uma molécula que sofre transição entre níveis discretos de energia. Em geral, moléculas formadas por duplas ligações conjugadas possuem elétrons desemparelhados capazes de sofrer transição de um estado de baixa energia para outro de energia maior após absorverem luz na região do visível ou ultravioleta. DODAX (X= Br⁻ ou Cl⁻) são moléculas saturadas que não possuem elétrons capazes de sofrer transição de estado. Por isso, a aplicação das técnicas de fluorescência e RPE no estudo de vesículas de DODAX requer o uso de sondas ou marcadores.

A seguir apresentamos uma breve descrição das técnicas utilizadas neste trabalho. Detalhes do procedimento experimental é mostrado no Capítulo II.

I.6.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A técnica de RPE baseia-se no momento magnético de elétrons desemparelhados e das suas propriedades magnéticas.⁷⁶ Na maioria das moléculas biológicas os elétrons estão emparelhados e não produzem sinal de RPE. A técnica requer, portanto, o uso de sondas paramagnéticas ou marcadores de spin (*spin labels*) endógenos ou exógenos ao interior da macromolécula, possibilitando o estudo da relação estrutura-função do micro-ambiente do marcador.

Conseqüentemente, RPE tem tido grande aplicação em estudos biofísico-químicos e sistemas coloidais.^{62,74,77} A Figura 6 ilustra as partes funcionais de um espectrômetro de RPE, que consiste de uma fonte de microondas, uma cavidade ressonante na qual a amostra é inserida em um recipiente de vidro ou quartzo, um detector de microondas e um eletromagneto com um campo magnético variável. O espectro de RPE é obtido monitorando a absorção de microondas com a variação do campo. Um típico espectrômetro de RPE é mostrado na Figura 6.

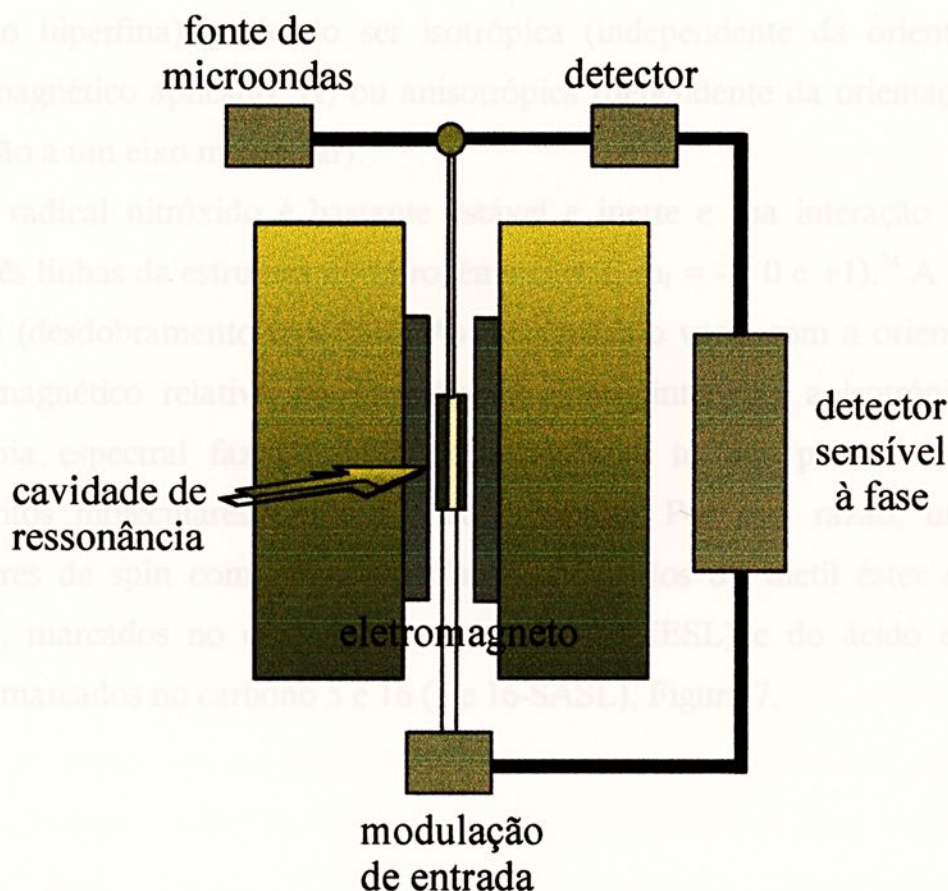


Figura 6: Apresentação esquemática de um espectrômetro de RPE.

Em presença de um campo magnético externo, estático, elétrons desemparelhados com número quântico de spin $S = \frac{1}{2}$ ($m_s = \pm \frac{1}{2}$) movimentam-se em torno do eixo do campo (eixo z) com uma componente do momento angular de spin paralelo ($m_s = + \frac{1}{2}$) ou antiparalelo ($m_s = - \frac{1}{2}$) ao eixo z . Um campo magnético oscilante perpendicular ao campo magnético estático, induz transições entre os dois estados de spin quando a frequência do campo é igual a frequência de precessão do dipolo magnético do elétron. Em um dado campo magnético, a frequência de ressonância de um elétron desemparelhado é 10^3 vezes maior do que a frequência do núcleo. Por isso, os experimentos de RPE requerem frequências em torno de GHz ($1 \text{ GHz} = 10^9 \text{ ciclos/seg} = 10^3 \text{ MHz}$).⁷⁷ O marcador de spin mais usado é o radical nitróxido, que possui uma interação entre um elétron desemparelhado e o núcleo do nitrogênio, com spin nuclear igual a 1 (interação hiperfina), podendo ser isotrópica (independente da orientação do campo magnético aplicado, H) ou anisotrópica (dependente da orientação de H em relação a um eixo molecular).

O radical nitróxido é bastante estável e inerte e sua interação hiperfina possui três linhas da estrutura do nitrogênio ($I = 1$, $m_I = -1, 0$ e $+1$).⁷⁴ A estrutura hiperfina (desdobramento hiperfino, A) do nitróxido varia com a orientação do campo magnético relativo ao eixo do nitróxido, interação anisotrópica. Esta anisotropia espectral faz de RPE uma excelente técnica para o estudo de movimentos moleculares em meios condensados. Por esta razão, utilizamos marcadores de spin com radical nitróxido, derivados do metil éster do ácido esteárico, marcados no carbono 5 e 16 (5 e 16-MESL) e do ácido esteárico, também marcados no carbono 5 e 16 (5 e 16-SASL), Figura 7.

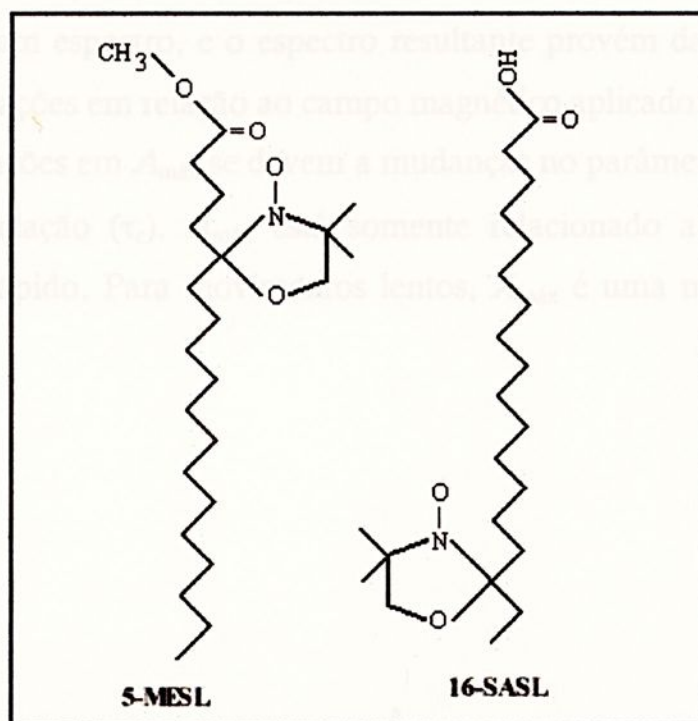


Figura 7: Estrutura química dos marcadores de spin 5-MESL e 16-SASL.

A anisotropia da interação hiperfina nuclear surge da interação dipolar do momento magnético do elétron com o momento magnético do núcleo. A anisotropia do desdobramento hiperfino A , é caracterizada por três valores principais: A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} . Atribui-se ao radical N-O o sistema de coordenadas cartesianas (x, y e z), tal que o eixo-x esteja na direção da ligação N-O e o eixo-z ao longo do orbital $2p\pi$ do nitrogênio. Quando o campo magnético é aplicado na direção do eixo-z, o valor de A é máximo (A_{zz}). A Figura 8 mostra os parâmetros empíricos $A_{\text{máx}}$ e $A_{\text{mín}}$, valores máximo e mínimo, respectivamente, do desdobramento hiperfino obtido para o sistema estudado. A largura das linhas no desdobramento hiperfino é sensível à velocidade de rotação do marcador. Quando o movimento de rotação diminui, as linhas se alargam.⁷⁷ Em meio altamente rígido o movimento do marcador fica bastante lento, com uma distribuição

aleatória de orientação dos seus eixos moleculares. Nesse caso, cada molécula contribui com um espectro, e o espectro resultante provém da soma de todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético aplicado. Com a polaridade constante, variações em $A_{\text{máx}}$ se devem a mudanças no parâmetro de ordem ou ao tempo de correlação (τ_c). $A_{\text{máx}}$ está somente relacionado a ordem quando o movimento é rápido. Para movimentos lentos, $A_{\text{máx}}$ é uma mistura de ordem e mobilidade.⁷⁶

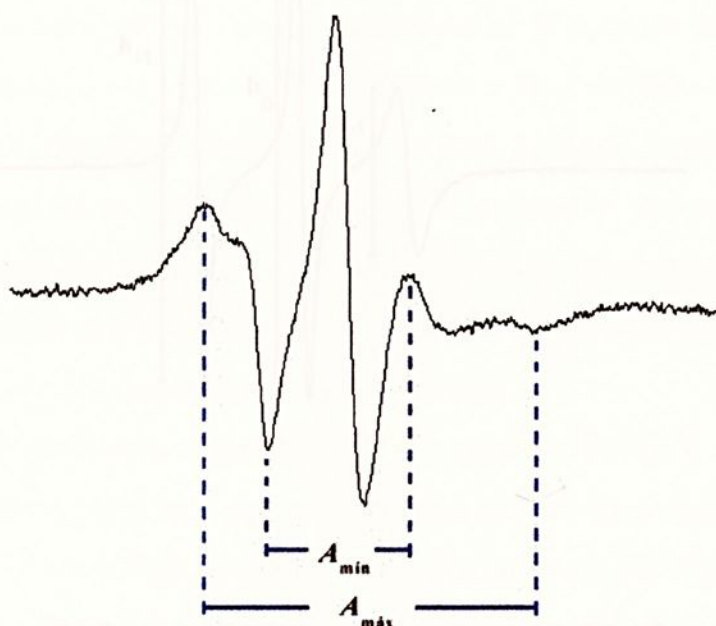


Figura 8: Espectro RPE de 5-SASL em vesículas de DODAB a 15 °C mostrando os parâmetros empíricos de fluidez $A_{\text{máx}}$ e A_{min} .

1.6.2 Nas bicamadas vesiculares os anfífilicos apresentam certa mobilidade e ordem, e o grau de organização e mobilidade podem ser avaliados aproximadamente a partir da medida de parâmetros empíricos. Pela relação das alturas das linhas de campo baixo (h_{+1}), campo médio (h_0) e campo alto (h_{-1}), Figura 9, que engloba contribuições de ordem e mobilidade, obtemos o grau de fluidez da bicamada.

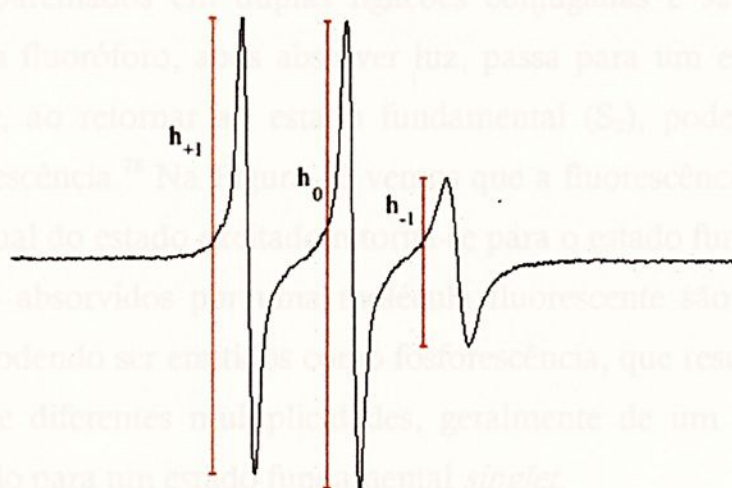


Figura 9: Espectro RPE de 16-MESL em vesículas de DODAB acima da T_m , representação dos parâmetros empíricos de mobilidade e organização, h_{+1} , h_0 e h_{-1} , obtidos pela altura das linhas das interações hiperfinas do radical nitróxido.

I.6.2. Fluorescência de Estado Estacionário

Quando um feixe de luz monocromática incide sobre uma molécula com duplas ligações conjugadas, elétrons dessa molécula passam para um estado eletrônico excitado (de maior energia). Fluorescência é a emissão de fótons que resulta do retorno de elétrons do estado excitado para o estado fundamental. Se o processo de absorção de luz resulta na excitação de um elétron para um orbital que retém um spin emparelhado, que é o mesmo spin de orientação do estado fundamental, então a transição é chamada *singlet-singlet*.⁷⁸

Moléculas que exibem significativa fluorescência geralmente possuem elétrons desemparelhados em duplas ligações conjugadas e são chamados de fluoróforos. Um fluoróforo, após absorver luz, passa para um estado eletrônico excitado (S_1') e, ao retornar ao estado fundamental (S_0), pode liberar energia luminosa, fluorescência.⁷⁸ Na Figura 10 vemos que a fluorescência não é o único caminho pelo qual do estado excitado retorna-se para o estado fundamental. Nem todos os fótons absorvidos por uma molécula fluorescente são emitidos como fluorescência, podendo ser emitidos como fosforescência, que resulta da transição entre estados de diferentes multiplicidades, geralmente de um estado excitado *triplet* retornando para um estado fundamental *singlet*.

A intensidade de fluorescência depende do grau de liberdade do fluoróforo. Quando incorporado na bicamada de vesículas, abaixo da T_m , no estado de maior rigidez das cadeias, o fluoróforo apresenta um baixo grau de liberdade e fluoresce mais intensamente (isomerização-*trans*), tendo o rendimento quântico de isomerização (Φ_I) diminuído em detrimento do aumento do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).⁷⁹ Acima da T_m a bicamada é mais fluida, o grau de liberdade dos fluoróforos é maior e a fluorescência é diminuída. A fluorescência e a isomerização são, portanto, regidas pela viscosidade do ambiente de solubilização do fluoróforo.

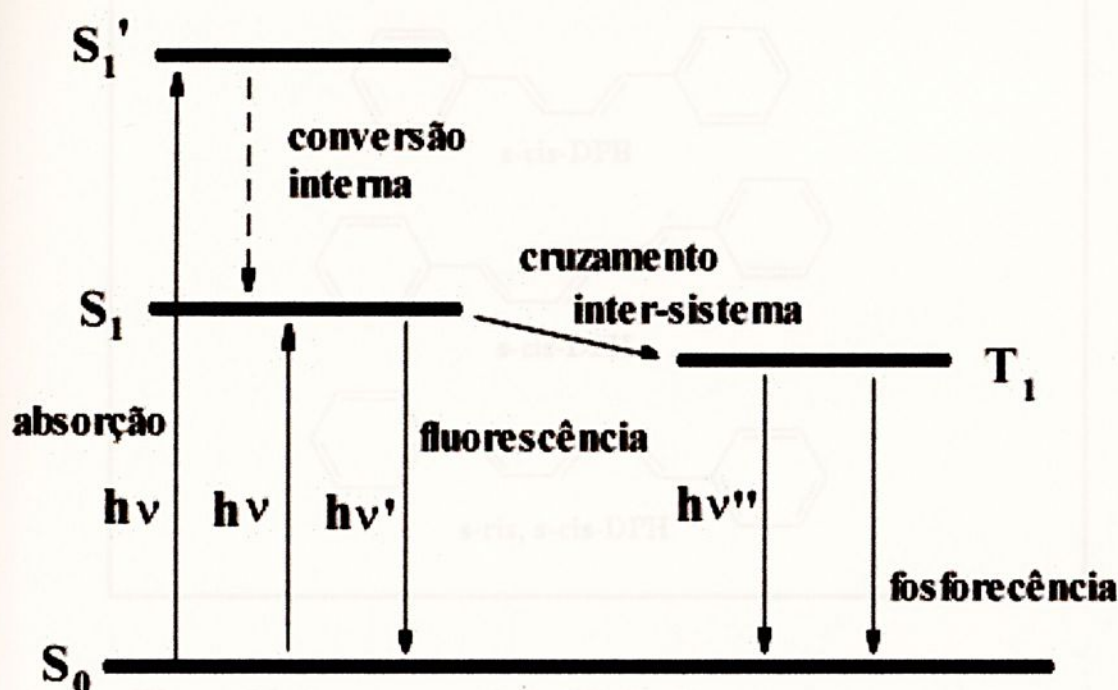


Figura 10: Diagrama de Jablonski ilustrando o processo envolvido na criação de um estado eletronicamente excitado *singlet* (S_1 e S_1') por absorção óptica ($h\nu$), passando por um estado excitado *singlet* de menor energia (S_1) ou *triplet* (T_1) e a subsequente emissão de fluorescência ($h\nu'$) ou fosforescência ($h\nu''$).

Fluoróforos derivados de *trans*-difenilpolienos (*t*-Dpo) têm sido muito usados no estudo da microviscosidade de bicamadas de vesículas.^{17,78,79} Um fator de importância desses compostos é a capacidade de isomerizar nas duas configurações estáveis *cis* e *trans*. Os *t*-Dpo apresentam absorção intensa e fotoisomerização *cis-trans* quando irradiados no seu específico comprimento de onda de absorção. As suas propriedades fluorescentes são sensíveis ao comportamento do meio no qual estão solubilizados. A Figura 11 ilustra as configurações *cis* de difenil hexabutadieno (DPB) e difenil hexatrieno (DPH).

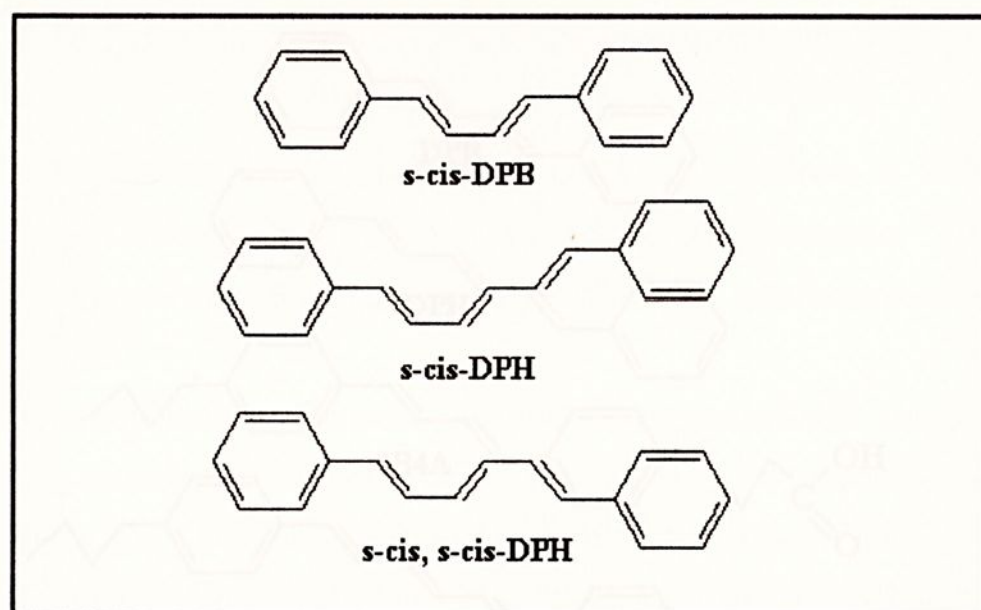


Figura 11: Estruturas *s-cis* de difenilpolienos com duas e três duplas ligações conjugadas.

Figura 12: Estruturas *trans* de *t-Dpo* ($n = 2, 3$).

A tabela abaixo, extraída do artigo de Allen e cols.²⁷ mostra algumas

Neste trabalho utilizamos alguns fluoróforos derivados de *t-Dpo*; os *trans*, *trans*-1,4-difenil-1,3-butadieno (DPB) e *trans*, *trans*, *trans*-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e suas derivadas *trans*, *trans*-1-[4-(3-carboxi-propil)difenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno (4B4A) e *trans*, *trans*, *trans*-1-[4-(3-carboxi-propil)-fenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno (4H4A), com duas e três duplas ligações conjugadas. A Figura 12 mostra as configurações *trans* dos derivados de *t-Dpo*.

substância	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeCH}}$	ϵ_{CH}	ϵ_{MeCH}	solvente
DPB	330	375	0,44	0,6	CH
4B4A	318	365	0,3	0,6	CH
DPH	358	455	0,78	13,1	CH
4H4A	360	455	0,89	8,7	MeCH

CH = cloroformo e MeCH = metanol

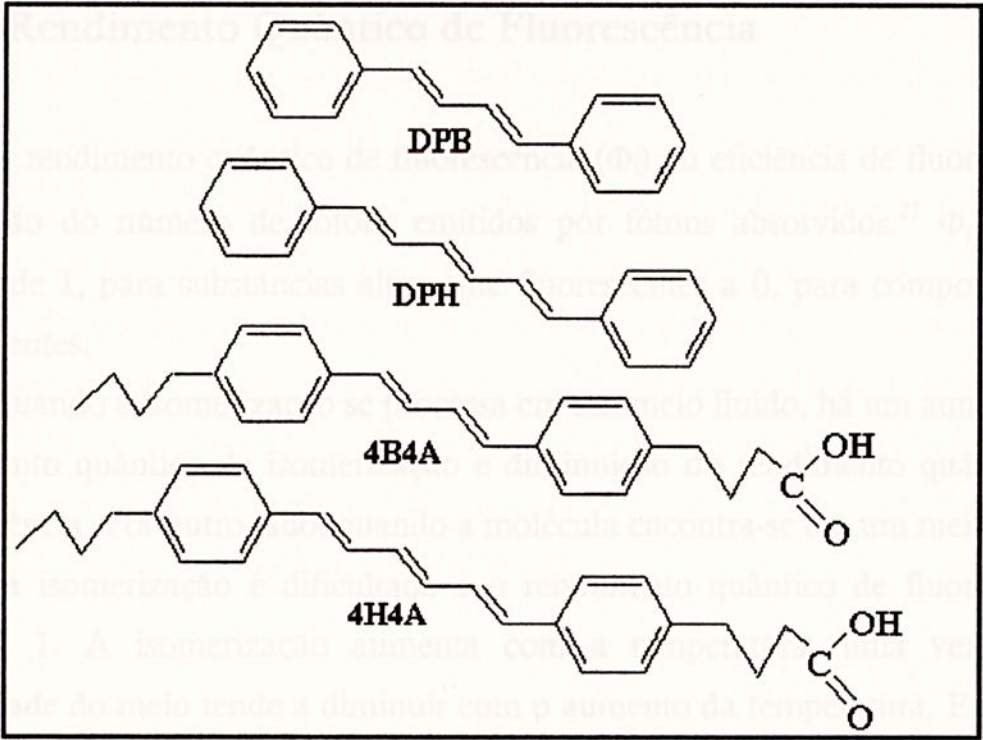


Figura 12: Estruturas derivadas dos *t*-Dpo (n = 2 e 3).

A tabela abaixo, extraída do artigo de Allen e *cols.*,⁷⁹ mostra algumas propriedades espectroscópicas de DPB, DPH, 4B4A e 4H4A.

Tabela 2: Comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$), comprimento de onda de máxima fluorescência ($\lambda_{\text{fluor}}^{\text{máx}}$), rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e tempo de vida de excitação (τ_f) de algumas moléculas derivadas de *t*-Dpo em alguns solventes orgânicos.

sondas	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{máx}}$	$\lambda_{\text{fluor}}^{\text{máx}}$	Φ_f	τ_f , ns	solvente
DPB	330	375	0,44	0,6	CH
4B4A	318	365	0,3	0,6	CH
DPH	358	455	0,78	13,1	CH
4H4A	366	455	0,89	8,7	MeCH

CH = ciclohexano e MeCH = metanol

I.6.3. Rendimento Quântico de Fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) ou eficiência de fluorescência é a razão do número de fótons emitidos por fótons absorvidos.⁷⁷ Φ_f assume valores de 1, para substâncias altamente fluorescentes a 0, para compostos não fluorescentes.

Quando a isomerização se processa em um meio fluido, há um aumento do rendimento quântico de isomerização e diminuição do rendimento quântico de fluorescência. Por outro lado, quando a molécula encontra-se em um meio menos fluido, a isomerização é dificultada e o rendimento quântico de fluorescência tende a 1. A isomerização aumenta com a temperatura, uma vez que a viscosidade do meio tende a diminuir com o aumento da temperatura. Em meios micro-heterogêneos como o interior das micelas e vesículas, a isomerização depende da localização da sonda.^{79,80}

I.6.4. Anisotropia de Fluorescência

A anisotropia de fluorescência (r) é muito utilizada no estudo da fluidez de membranas.^{73,78} Uma sonda excitada por uma luz polarizada terá emissão máxima se durante o tempo de vida do estado excitado *singlet* a sonda não variar sua posição ou orientação, o que ocorre quando a sonda está em um meio rígido. Pois em meio fluido o movimento da sonda tenderá a tirar a orientação do momento de dipolo imposta pela polarização de excitação.⁸¹

A luz polarizada excita preferencialmente os fluoróforos cujos eixos moleculares estejam orientados paralelamente ao plano de polarização. A excitação seletiva de uma população de fluoróforos parcialmente orientada (foto-seleção) resulta em emissão de fluorescência parcialmente polarizada. Os momentos de transição em relação à absorção e emissão, têm orientação pré-

determinada para cada fluoróforo, e o ângulo relativo entre estes momentos determina a anisotropia máxima medida.⁷³ Vários fatores diminuem a anisotropia, sendo o mais comum a difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado, deslocando a orientação do fluoróforo. Medidas de anisotropia são muito utilizadas em estudos do comportamento de fase e temperatura de transição em membranas anfifílicas.^{17,77,79} A difusão rotacional de fluoróforos que determina a anisotropia, depende da viscosidade da região na qual estão incorporados os fluoróforos. Variações na microviscosidade da bicamada vesicular com a temperatura, pH, força iônica, etc., pode ser investigada monitorando-se a anisotropia de fluorescência.

1.6.5. Intensidade das Bandas Vibrônicas I_1 e I_3 do Espectro de Emissão do Pireno

O pireno (Py) é uma sonda fluorescente muito útil no estudo de sistemas estruturados. A intensidade das bandas vibrônicas do espectro de emissão do Py é sensível à polaridade do meio.⁸¹ O pireno tem sido muito usado como sonda para determinar a concentração micelar crítica (cmc) e o nível de penetração de água em várias micelas.⁸² A Figura 13 mostra o espectro de emissão do Py em água.

O espectro de fluorescência do Py depende da polaridade do meio. A variação espectral se deve à intensificação das bandas de simetrias proibidas. Este fenômeno foi primeiro observado em benzeno por Ham⁸³ (Efeito Ham) e depois em pireno por Nakajima,⁸⁴ sendo posteriormente comprovado por Kalyanasundaram e Thomas.⁸² A razão I_1/I_3 , da intensidade do primeiro (I_1) pelo terceiro (I_3) picos vibrônicos do espectro de emissão do Py pode então ser usada como um índice de polaridade do meio de solubilização do Py. Em vesículas no estado gel o pireno é solubilizado na bicamada anfifílica próximo à região polar, e no estado líquido-cristalino, o pireno move-se para a região mais interna da

bicamada, sendo sensível a qualquer variação local.⁸¹ O estudo da polaridade é importante pois a função de muitos sistemas biológicos varia com a polaridade do meio.⁸⁵ Em água a solubilização do pireno é $\approx 2 \times 10^{-6} \text{ M}$.⁸¹

Várias moléculas derivadas do pireno foram sintetizadas aumentando ainda mais a sua aplicação. Rompimento de bicamadas, volume interno, fusão, difusão em membranas, polaridade, comportamento termotrópico, são exemplos de propriedades vesiculares geralmente monitoradas por pireno.

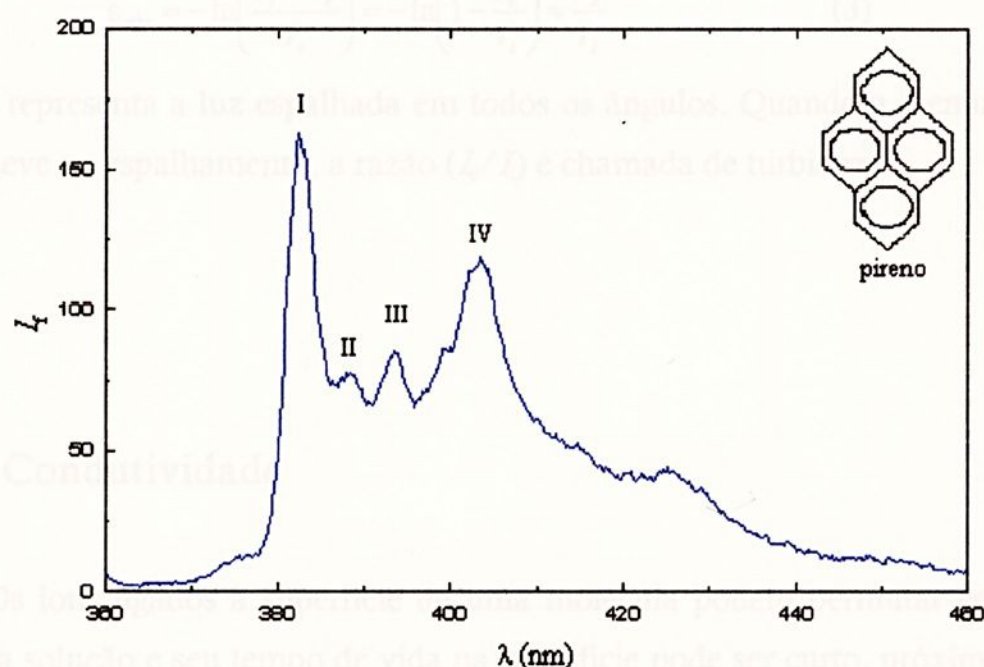


Figura 13: Bandas vibrônicas do espectro de emissão do Py (10^{-6} M) em água.

I.6.6. Turbidez

Um feixe de luz quando incide sobre uma molécula que não absorve energia eletromagnética, tem a luz transmitida ou espalhada. O espectrofotômetro UV-visível mede a razão da intensidade de luz transmitida (I_t) pela intensidade de luz incidente (I_i). A absorbância por unidade do caminho óptico é definida como⁸⁶

$$\epsilon_{abs} = -\ln(I_t/I_i) \quad (1)$$

Como a intensidade de luz transmitida é igual a intensidade de luz incidente menos a intensidade de luz espalhada (I_e),

$$I_t = I_i - I_e \quad (2)$$

temos,⁸⁶

$$\epsilon_{abs} = -\ln\left(\frac{I_i - I_e}{I_i}\right) = -\ln\left(1 - \frac{I_e}{I_i}\right) \approx \frac{I_e}{I_i} \quad (3)$$

onde I_e representa a luz espalhada em todos os ângulos. Quando a atenuação da luz se deve ao espalhamento, a razão (I_e/I_i) é chamada de turbidez.

I.6.7. Condutividade

Os íons ligados à superfície de uma molécula podem permutar com íons livres da solução e seu tempo de vida na superfície pode ser curto, próximo a 10^{-9} seg., ou tão longo como muitas horas.⁷ A carga na superfície é balanceada por um número de carga igual, mas opostamente carregado, contra-íons-, alguns dos quais ligados à superfície na camada de Stern, enquanto outros formam uma atmosfera de íons em rápido movimento térmico, conhecida como a dupla camada elétrica difusa, Figura 14. O efeito da distribuição iônica em torno de uma macromolécula pode ser investigado por condutimetria.

Uma célula de condutividade é ligada a uma ramificação de uma ponte de resistências (ponte de Wheatstone), que é balanceada ajustando para zero, através

de uma resistência variável (R_s), o galvanômetro G. Nessas condições determina-se a resistência desconhecida (R_x) quando a igualdade das razões entre as resistências da ponte é satisfeita,⁸⁷

$$R_x = R_s(R_1/R_2) \quad (4)$$

A condutividade depende do número de íons na solução e, portanto, do grau de ionização (α) do eletrólito. Neste trabalho investigamos por condutividade o efeito da temperatura no grau de ionização de vesículas de DODAB.

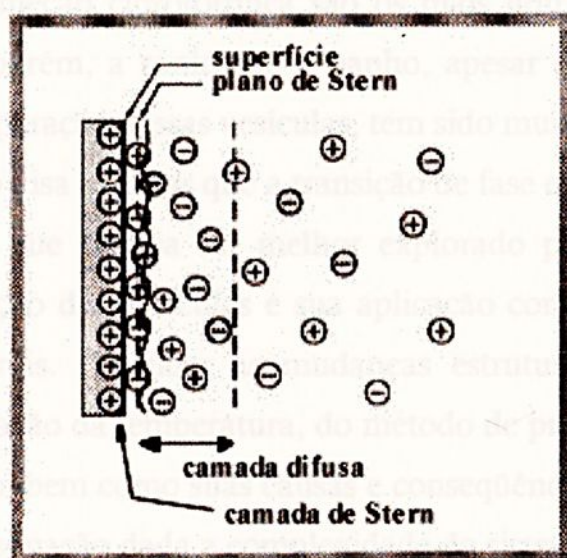


Figura 14: Ilustração das camadas formadas pelos íons na superfície de uma macromolécula.

I.7. Objetivos

Após mais de duas décadas de estudos de vesículas de anfífilicos derivados de amônio quaternário, algumas de suas propriedades ainda precisam ser melhor esclarecidas. As propriedades físicas das vesículas de anfífilicos sintéticos ou naturais em geral dependem, dentre outras coisas, do método de preparação das mesmas. O potencial de aplicação das vesículas na mimetização de membranas naturais depende do conhecimento de suas propriedades físicas, da monodispersidade e estabilidade das dispersões. Resultados da literatura mostram valores discrepantes de propriedades físicas de vesículas preparadas por um mesmo protocolo, tais como o tamanho²³ e a temperatura de transição da fase gel para a líquido-cristalina (T_m),^{34,54,66,67} de modo que estudos de propriedades físicas e estruturais de vesículas ainda são muito importantes. Os métodos de sonicação com ponta de Ti e injeção clorofórmica são os mais utilizados no preparo das vesículas sintéticas, porém, a sonicação a banho, apesar de ter sido o primeiro método usado na preparação dessas vesículas, tem sido muito pouco explorado.

Nosso trabalho visa mostrar que a transição de fase em sistemas vesiculares ainda é um assunto que precisa ser melhor explorado para que se entenda a relação estrutura-função das vesículas e sua aplicação como sistemas miméticos de membranas naturais. Entender as mudanças estruturais que ocorrem nos anfífilicos com a variação da temperatura, do método de preparação das vesículas ou natureza do soluto, bem como suas causas e conseqüências, é um trabalho que exige uma vasta investigação dada a complexidade do sistema.

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Preparação de Amostras

A preparação das vesículas foi padronizada para todos os experimentos. Utilizamos água ultra-pura tipo Milli-Q, e os experimentos foram sempre realizados 18 horas após a preparação das vesículas. As amostras sonicadas após preparadas e resfriadas foram filtradas através de uma membrana de náilon com diâmetro de poro de 0,45 μm ou centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min., para a remoção de possíveis agregados de vesículas, e armazenadas à temperatura ambiente. Para as medidas feitas com variação de temperatura, foi feito um experimento padrão no qual se mediu a temperatura diretamente na cubeta, que difere da temperatura do banho. Para o preparo das dispersões, inicialmente foi medido em uma balança analítica a massa do anfifílico a ser adicionado junto a solução aquosa de forma a obtermos a concentração final desejada.

Brometo de dimetildioctadecilamônio (DODAB) (Estman Kodak), brometo de octadeciltrimetilamônio (C_{18}TAB) (Sigma) e dihexadecil fosfato de sódio (DHP) (Sigma), foram utilizados conforme adquiridos do fabricante. Brometo de tetrametilamônio (Aldrich) foi recristalizado e, juntamente com o cloreto de dimetildioctadecilamônio (DODAC), foi preparado a partir de DODAB (Kodak) através de troca iônica,²⁵ e gentilmente cedidos pela Prof^a. Dra. Iolanda Cuccovia, IQ-USP de São Paulo.

D-glicose, sacarose, uréia e NaCl (Merck) foram utilizados conforme recebidos do fornecedor.

Foi feita uma análise elementar do DODAB (Kodak) utilizado neste trabalho, no Centro de Análises do departamento de Química, USP, São Paulo, para nos certificarmos da pureza do produto. O resultado obtido em porcentagem do carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) está na Tabela 3, que é comparado aos valores esperados (de acordo com o razão $PM_{\text{elemento}}/PM_{\text{molécula}}$), onde PM_{elemento} é o peso molecular do elemento químico presente na molécula e $PM_{\text{molécula}}$ é o peso molecular da molécula.

Tabela 3: Porcentagem do carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H), na molécula de DODAB obtida por análise elementar e valores esperados.

Valores	%C	%H	%N	%Br
determinado				
	71,73	11,62	2,46	-
	71,61	11,86	2,53	-
esperado				
	72,34	12,77	2,22	12,66

II.1.1. Métodos de preparação das vesículas

DODAX (X = Br ou Cl):

a) Vesículas não-sonicadas, gigantes. Moléculas de DODAB 5,0 mM foram diluídas em um tubo de ensaio contendo 5,0 ml de água a 58 °C, sob agitação num

agitador tipo “vortex” por 5 minutos, depois foi resfriada e deixada em repouso a temperatura ambiente;

b) Vesículas injetadas ou clorofórmicas, grandes. DODAB foi diluída em 1,0 ml de clorofórmio (ponto de ebulição 61 °C) e a solução foi injetada em uma cela de vidro contendo 5,0 ml de água e conectada a um banho a 70 °C sob um fluxo constante de N₂, obtendo a concentração média final de DODAB 2,0 mM, sendo depois resfriada e deixada em repouso a temperatura ambiente;

c) Vesículas sonicadas a banho, pequenas. A dispersão preparada conforme o item (a), vedada, foi exposta a ondas de ultra-som num sonicador tipo banho (Branson, 1210), por 90 minutos a 58 °C, depois foi resfriada e deixada em repouso a temperatura ambiente;

d) Vesículas sonicadas com ponta de titânio (Ti), pequenas. O procedimento inicial é o mesmo descrito no item (c), exceto que neste caso foi utilizado um sonicador tipo ponta de Ti (Fisher Scientific - Dismembrer 50) e o tempo de sonicação foi de 20 e 30 minutos. Após a sonicação a amostra foi resfriada e deixada em repouso por três horas, sendo então centrifugada a 14000 rpm por 20 min. e deixada em repouso a temperatura ambiente.

DHP:

Vesículas sonicadas a banho, conforme descrito no item (d) acima. Moléculas de DHP 5,0 mM foram diluídas num tubo de ensaio em solução tampão Hepes 50,0 mM pH 8,0 a 75 °C, a dispersão foi sonicada a banho por 90 minutos a 75 °C. Resfriada e deixada em repouso a temperatura ambiente.

C₁₈TAB

As micelas foram preparadas por diluição de C₁₈TAB 5,0 mM em 5,0 ml de água a 40 °C em um tubo de ensaio, após resfriada foi estocada a temperatura ambiente..

II.1.2. Sondas Fluorescentes

Os fluoróforos *trans-trans*-1,4-difenil-1,3-butadieno (DPB) e *trans-trans-trans*-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Merck) foram recristalizados em acetona⁷⁹ e suas sondas derivadas *trans-trans*-1-[4-(3-carboxi-propil)difenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno (4B4A) e *trans-trans-trans*-1-[4-(3-carboxi-propil)-fenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno (4H4A) foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Laerte Miola. As sondas DPB e DPH foram diluídas em ciclohexano (Merck) e as 4B4A e 4H4A em clorofórmio (Merck). Pireno (Sigma) foi recristalizado e dissolvido em metanol.

II.1.3. Marcadores de Spin (*Spin labels*):

Os marcadores de spin 5- e 16-SASL e 5- e 16-MESL (Sigma), derivados do ácido esteárico e do metil éster, respectivamente, e marcados no 5º e 16º carbonos, foram utilizados conforme recebidos do fornecedor e diluídos em clorofórmio.

II.2. Parte Experimental

II.2.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE):

Experimento:

Os experimento de RPE foram feitos em um espectrômetro Bruker EMX. Em um pequeno frasco de vidro foi depositado o marcador de spin diluído em clorofórmio, de forma que a concentração final do marcador na amostra

sonda/vesícula não ultrapassasse 1% da concentração do anfifílico (5,0 mM). Este volume foi evaporado sob fluxo de N_2 e o filme formado foi colocado em vácuo por 2 horas. Sobre o filme adicionou-se a dispersão vesicular que ficou sob agitação num agitador tipo "vortex", por 5 min. A solução com sonda ($\sim 60 \mu l$) foi então transferida para uma cela de quartzo e inserida na cavidade do espectrômetro para as medidas. O espectro RPE foi obtido para diferentes temperaturas, controlada por um termômetro Fluke 51 K/J, com a sonda colocada logo acima da cavidade de ressonância; entre duas medidas consecutivas era aguardado 5 min. O ajuste do aparelho foi mantido nos seguintes padrões: campo magnético de 3356,77 G, medido com um Bruker ER 035 NMR Gaussmeter, resolução de 1024 pontos, potência de micro-ondas de 10,107 mW, ganho de $7E+5$ e frequência de modulação de 100 kHz. Quando desejado, o espectro foi convertido para uma escala de valor-g com o programa computacional Winepr (Bruker). Dependendo da concentração de anfifílico na amostra, foram feitas cinco ou dez leituras dos espectros e estas somadas automaticamente pelo aparelho.

Parâmetros de RPE

As análises dos espectros RPE foram feitas utilizando os parâmetros empíricos $A_{\text{máx}}$ e as razões entre as alturas das interações hiperfinas h_{-1} , h_0 e h_{+1} , diretamente medidos dos espectros RPE, conforme descritos no capítulo anterior (vide Figura 8). ΔH_0 foi medido diretamente no espectro pela largura da segunda linha hiperfina. A constante hiperfina isotrópica (a_0) que mede a polaridade do meio de solubilização da sonda, também medida diretamente dos espectros RPE, para os espectros de 16-MESL e 16-SASL, foi obtida medindo-se a distância entre o primeiro e o terceiro pico para $y=0$ (no ponto onde o sinal passa de positivo para negativo). Para os espectros anisotrópicos obtidos por 5-MESL e 5-SASL, a_0 pode ser calculado dos valores principais do tensor hiperfino obtido pelo espectro de uma simulação teórica, $a_0 = (1/3)(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$. Para a simulação espectral nós utilizamos o programa de computador NLSL desenvolvido por Freed e *colbs.*⁸⁸⁻⁹⁰ Os parâmetros usados têm sido extensamente discutidos em seus artigos, e os

pontos mais relevantes para fazer a simulação têm sido recentemente revisado. Os componentes do tensor-g foram mantidos como $g_{xx} = 2,0089$, $g_{yy} = 2,0058$ e $g_{zz} = 2,0021$.^{90,91} O tensor de interação hiperfina foi considerado para ser axial, $A_{xx} = A_{yy} = A_{\perp}$, e os valores de $A_{\perp}$ e A_{zz} foram permitidos para variar dentro de um intervalo razoável.⁹¹

II.2.2. Fluorescência:

Rendimento Quântico (Φ_f): As sondas fluorescentes diluídas em solvente orgânico, foram depositadas num pequeno frasco de vidro e o solvente evaporado sob fluxo de N_2 . Em seguida foi adicionada a dispersão vesicular na concentração desejada, ficando a mistura sob lenta agitação com uma barra magnética por 18 horas. Em alguns experimentos, a sonda 4H4A foi diluída em metanol e adicionada diretamente na amostra.

Mediu-se a absorção (Espectrofotômetro UV-visível Cary-1E) da sonda incorporada na vesícula e o comprimento de onda (λ) correspondente ao pico de absorção (A_{sonda}) usado na excitação para as medidas de emissão de fluorescência (25 °C). Em seguida, numa cubeta com ciclohexano contendo o mesmo volume da amostra vesicular, foi adicionado a sonda referência até atingir um valor da absorbância próximo ao da amostra sonda/vesícula (A_{ref}) no mesmo comprimento de onda do pico encontrado. Mediu-se então a intensidade de fluorescência (Fluorímetro Hitachi-F4500) da referência (I_{ref}) à mesma temperatura e da amostra sonda-vesícula (I_{sonda}) entre 15 e 66°C, em intervalos de 5°C, ou de 3°C na vizinhança da T_m . Entre duas medidas consecutivas esperou-se 20 min. para que a amostra atingisse a temperatura desejada. O controle de temperatura foi feito usando um banho termostatzado (Fisher-Scientific) acoplado ao porta cela do espectrofluorímetro. Cada medida foi feita três vezes e a média desses valores usada nos cálculos de Φ_f através da equação⁹²

$$\Phi_f = \frac{I_{sonda} \cdot \Phi_{ref}}{I_{ref}} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{ref}}}{1 - 10^{-A_{sonda}}} \quad (5)$$

onde Φ_{ref} é o rendimento quântico da sonda referência (DPH ou DPB).

A obtenção do valor da T_p e da T_m nos gráficos de Φ_f versus temperatura foi feita pelo intercepto das curvas lineares de melhor ajuste aos pontos do gráfico.

Anisotropia ($\langle r \rangle$): A incorporação das sondas nas vesículas foi feita conforme descrito no item anterior. Usamos as seguintes combinações dos ângulos de excitação e emissão (EX-EM) dos polarizadores para as medidas das intensidades de emissão: 0-0 ($I_{//}$), 90°-0 ($I_{\perp}$), 90°-90° ($i_{//}$) e 0-90° ($I_{\perp}$). A temperatura da amostra foi variada nas mesmas condições das medidas de Φ_f . Os comprimentos de onda de excitação (λ_{EX}) e de emissão (λ_{EM}) das sondas incorporadas nas vesículas foram obtidos dos valores máximos dos espectros de fluorescência de emissão e excitação, respectivamente. Foram feitas três medidas, e o valor médio obtido foi aplicado a equação⁷⁸

$$\langle r \rangle = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \quad (6)$$

onde G é um fator de compensação das diferenças na resposta instrumental da luz polarizada vertical e horizontalmente, dado pela razão $G = i_{\perp}/i_{//}$.⁷⁸

Para as sondas DPB e 4B4A, $\lambda_{EX} = 321$ nm e $\lambda_{EM} = 365$ nm e para DPH e 4H4A, $\lambda_{EX} = 360$ nm e $\lambda_{EM} = 428$. A concentração das sondas utilizadas nas medidas de anisotropia depende da razão sonda:anfifílico. Usamos 1:200 para DPB e 4B4A e 1:165 para DPH e 4H4A.

A obtenção do valor da T_m para os gráficos de anisotropia vs. temperatura foram feitas através do valor médio entre os dois patamares da curva sigmóide de melhor ajuste aos pontos do gráfico.

Razão dos Picos Vibrônicos I_1 e I_3 do Espectro de Emissão do Pireno (Py): Os espectros do Py foram obtidos para $\lambda_{EX} = 310$ nm e janela de leitura com abertura entre 320 e 500 nm. Na região de 450 nm observa-se a formação de uma banda larga correspondente a excímeros (complexos de Py) quando formados. O

espectro de emissão típico do Py contém 4 picos vibrônicos. A razão dos picos I_1 e I_3 é sensível à polaridade da região de solubilização do Py. Todos os experimentos foram feitos para Py $\approx 10^{-6}$ M, diluído em metanol e adicionado à dispersão alguns minutos antes das medidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.2.3. Turbidez (ϵ_{abs})

As dispersões de DODAB foram preparadas em água ou solução aquosa de D-glicose, sacarose ou uréia até 0,4 M, e de NaCl até 2,0 mM, isomolar. Antes dos experimentos as dispersões de vesículas foram filtradas em uma membrana de náilon com 0,45 μm de diâmetro de poro, para retenção de possíveis agregados muito grandes. As medidas de turbidez foram feitas variando-se o comprimento de onda (λ) de 220 a 400 nm para as vesículas sonicadas de DODAB e descontado a linha de base ou turbidez do solvente.

II.2.4. Condutividade (σ):

A resistência elétrica das soluções vesiculares foram medidas com um condutivímetro Hanna HI-9032, contendo uma célula de 4 anéis de platina com constante de cela igual a 0,1 cm^{-1} . A temperatura da amostra foi monitorada através de um eletrodo ligado ao aparelho que dispõe de uma compensação automática de variação da temperatura.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1. EFEITO DA TEMPERATURA

III.1.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Investigamos o comportamento termotrópico de fase das dispersões sonicadas e não-sonicadas de DODAB, e alguns de seus surfactantes homólogos, DODAC e $C_{18}TAB$, por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) dos marcadores de spin (*spin labels*) n-SASL, n-MESL ($n = 5$ e 16), derivados de ácido esteárico e de metil éster, respectivamente, em concentrações menores do que 1 % da concentração de anfílicos, e temperaturas entre 15 e 55 °C.

Dispersões não-sonicadas de DODAB

A Figura 15 mostra os espectros RPE de 5- e 16-SASL e 5- e 16-MESL em dispersões não-sonicadas de DODAB 5,0 mM em quatro diferentes temperaturas. A 15 °C (abaixo da T_m) o espectro RPE dessas sondas exibem um alargamento das interações hiperfinas, indicando que os anfílicos estão densamente empacotados. A 50 °C (acima da T_m), as linhas das interações hiperfinas são mais estreitas, mostrando maior mobilidade dos anfílicos. Nas temperaturas intermediárias

observam-se dois sinais sobrepostos, um mais estreito e o outro mais alargado, típicos de mistura de duas fases, com graus de fluidez distintos.

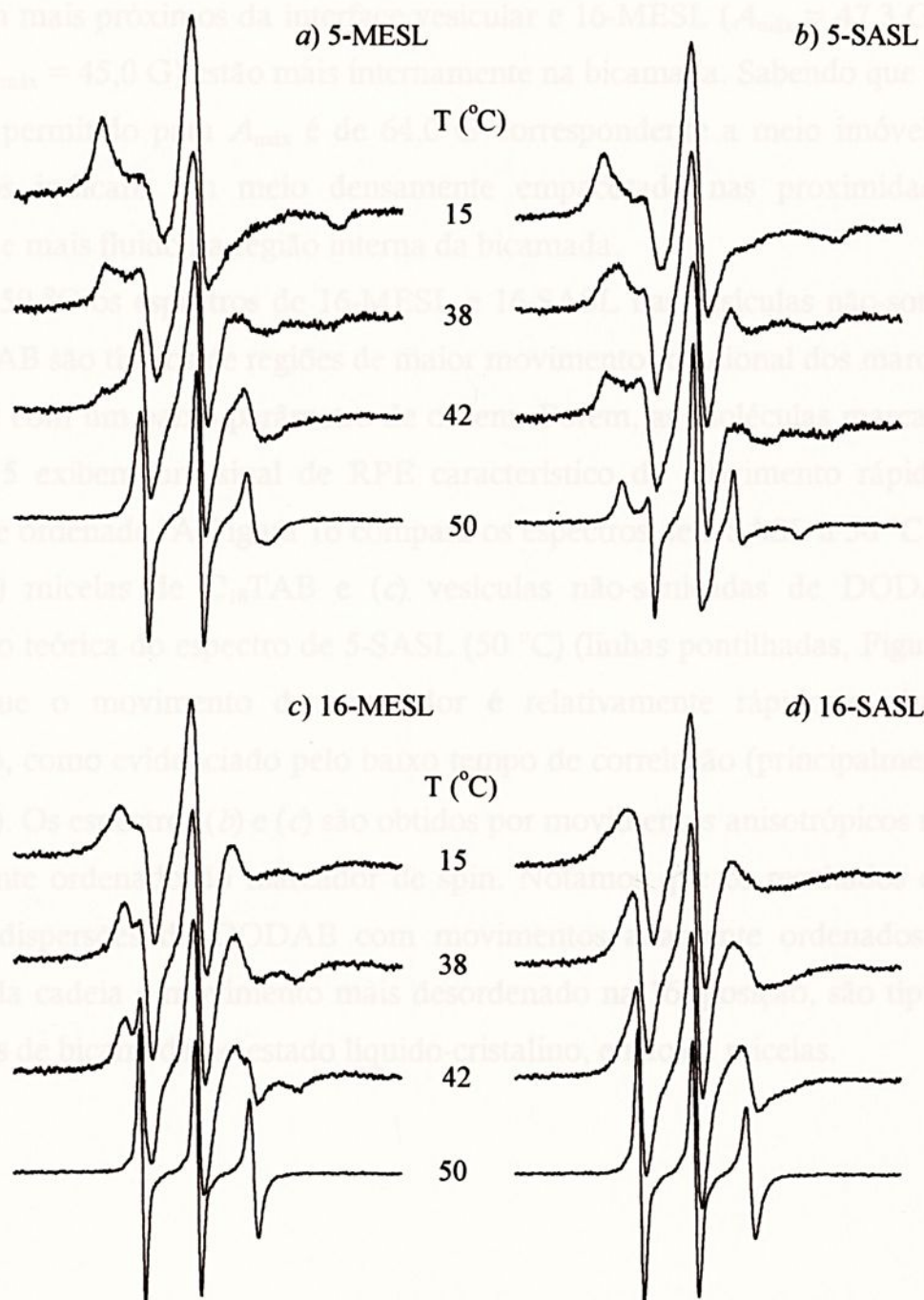


Figura 15: Espectros RPE de 5- e 16-MESL e 5- e 16-SASL 0,7 μ M em vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM em diferentes temperaturas.

Considerando que as bicamadas anfifílicas apresentam um gradiente de flexibilidade na direção do seu centro,⁸ e usando o parâmetro externo do desdobramento hiperfino de RPE $A_{\text{máx}}$ (Figura 8), que aumenta com a viscosidade ou empacotamento do meio no qual se encontra o marcador de spin,⁷⁷ notamos que a 15 °C, 5-MESL ($A_{\text{máx}} = 61,4$ G) seguido do 5-SASL ($A_{\text{máx}} = 60,4$ G) se localizam mais próximos da interface vesicular e 16-MESL ($A_{\text{máx}} = 47,3$ G) e 16-SASL ($A_{\text{máx}} = 45,0$ G) estão mais internamente na bicamada. Sabendo que o valor máximo permitido para $A_{\text{máx}}$ é de 64,0 G correspondente a meio imóvel, esses resultados indicam um meio densamente empacotado nas proximidades da interface e mais fluido na região interna da bicamada.

A 50 °C os espectros de 16-MESL e 16-SASL nas vesículas não-sonicadas de DODAB são típicos de regiões de maior movimento rotacional dos marcadores de spin e com um baixo parâmetro de ordem. Porém, as moléculas marcadas no carbono 5 exibem um sinal de RPE característico de movimento rápido mas altamente ordenado. A Figura 16 compara os espectros de 5-SASL a 50 °C em (a) água, (b) micelas de $C_{18}\text{TAB}$ e (c) vesículas não-sonicadas de DODAB. A simulação teórica do espectro de 5-SASL (50 °C) (linhas pontilhadas, Figura 16c) indica que o movimento do marcador é relativamente rápido e altamente ordenado, como evidenciado pelo baixo tempo de correlação (principalmente um baixo $\tau_{\parallel}$). Os espectros (b) e (c) são obtidos por movimentos anisotrópicos rápidos e altamente ordenado do marcador de spin. Notamos que os resultados obtidos para as dispersões de DODAB com movimentos altamente ordenados na 5ª posição da cadeia e movimento mais desordenado na 16ª posição, são típicos de estruturas de bicamada no estado líquido-cristalino, e não de micelas.

Figura 16: Espectros RPE 50 °C do 5-SASL em (a) água, (b) micelas de $C_{18}\text{TAB}$ 3,0 mM e (c) vesículas não-sonicadas de DODAB 3,0 mM. As linhas pontilhadas representam a simulação teórica para as vesículas de DODAB.

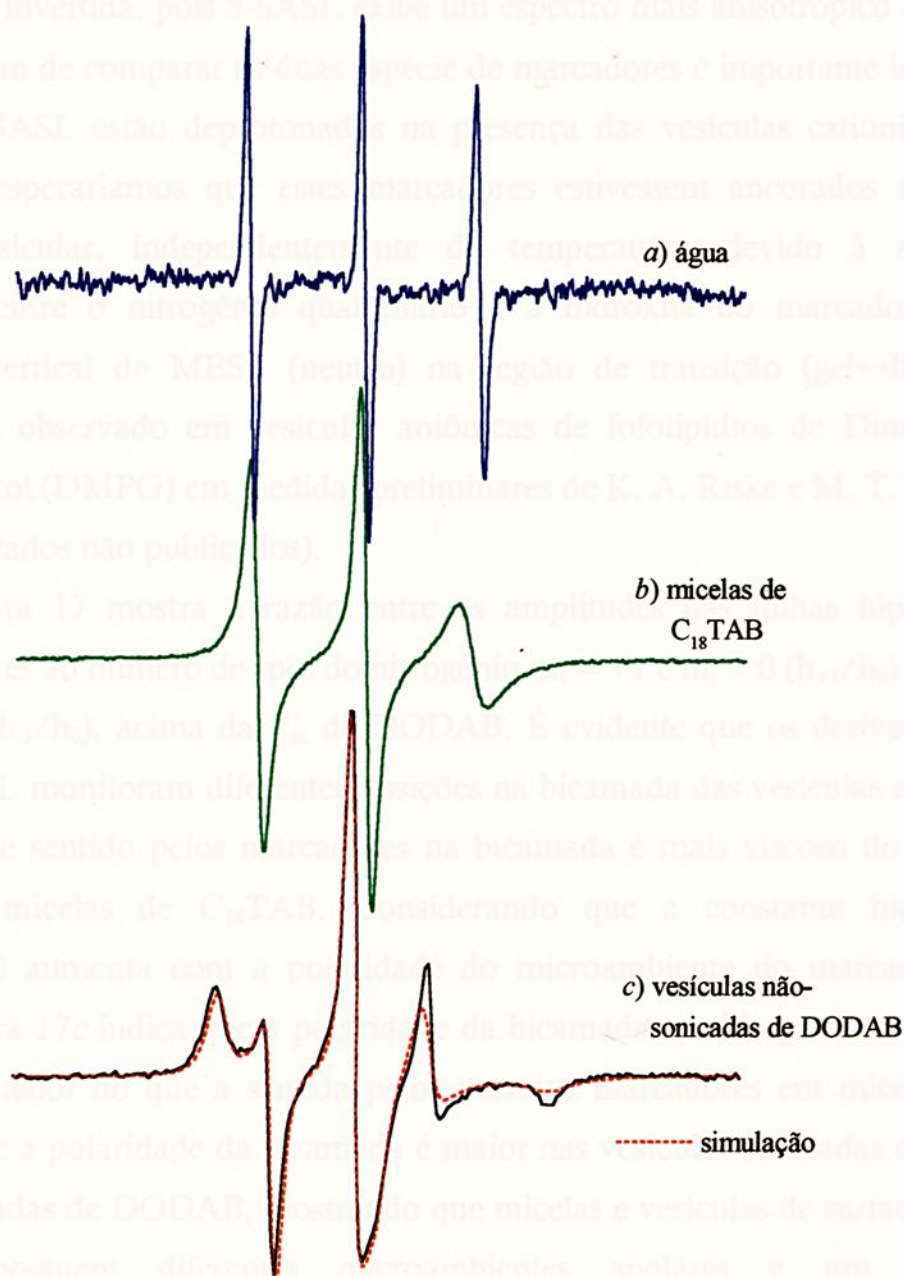


Figura 16: Espectros RPE (50 °C) de 5-SASL em (a) água, (b) micelas de $C_{18}TAB$ 5,0 mM e (c) vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM. As linhas pontilhadas representam a simulação espectral para as vesículas de DODAB.

É interessante notar que na fase gel os derivados de ácidos esteáricos (SASL) estão em uma posição na bicamada mais interior (menor $A_{\text{máx}}$) do que os metil éster (MESL). Porém, na fase líquido-cristalina a relativa posição dos marcadores é invertida, pois 5-SASL exibe um espectro mais anisotrópico do que 5-MESL. A fim de comparar as duas espécie de marcadores é importante lembrar que 5- e 16-SASL estão deprotonados na presença das vesículas catiônicas de DODAB, e esperaríamos que estes marcadores estivessem ancorados mais à superfície vesicular, independentemente da temperatura, devido à atração eletrostática entre o nitrogênio quaternário e a hidroxila do marcador. Um movimento vertical de MESL (neutro) na região de transição (gel $\leftrightarrow$ líquido-cristalino) foi observado em vesículas aniônicas de fofolipídios de Dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) em medidas preliminares de K. A. Riske e M. T. Lamy-Freund (resultados não publicados).

A Figura 17 mostra a razão entre as amplitudes das linhas hiperfinas correspondentes ao número de spin do nitrogênio $m_I = +1$ e $m_I = 0$ (h_{+1}/h_0) e $m_I = -1$ e $m_I = 0$ (h_{-1}/h_0), acima da T_m de DODAB. É evidente que os derivados de SASL e MESL monitoram diferentes posições na bicamada das vesículas e que o microambiente sentido pelos marcadores na bicamada é mais viscoso do que o interior das micelas de $C_{18}\text{TAB}$. Considerando que a constante hiperfina isotrópica (a_0) aumenta com a polaridade do microambiente do marcador de spin,⁷⁷ a Figura 17c indica que a polaridade da bicamada sentida por 16-SASL e 16-MESL é menor do que a sentida pelos mesmos marcadores em micelas de $C_{18}\text{TAB}$, e que a polaridade da bicamada é maior nas vesículas sonicadas do que nas não-sonicadas de DODAB, mostrando que micelas e vesículas de surfactantes homólogos possuem diferentes microambientes apolares e um maior empacotamento da bicamada de DODAB nas vesículas não-sonicadas relativamente às sonicadas.

Figura 17. Razão da amplitude da linha de amplitude das linhas hiperfinas correspondentes ao número de spin do nitrogênio (a) $m_I = +1$ e $m_I = 0$ (h_{+1}/h_0), (b) $m_I = -1$ e $m_I = 0$ (h_{-1}/h_0), e (c) a constante hiperfina isotrópica (a_0) de 16-SASL em água (*), em vesículas sonicadas (■) e não-sonicadas (□) de DODAB e em micelas de $C_{18}\text{TAB}$ (▲) e de 16-MESL em vesículas sonicadas (□) e não-sonicadas (■) de DODAB e em micelas de $C_{18}\text{TAB}$ (▲).

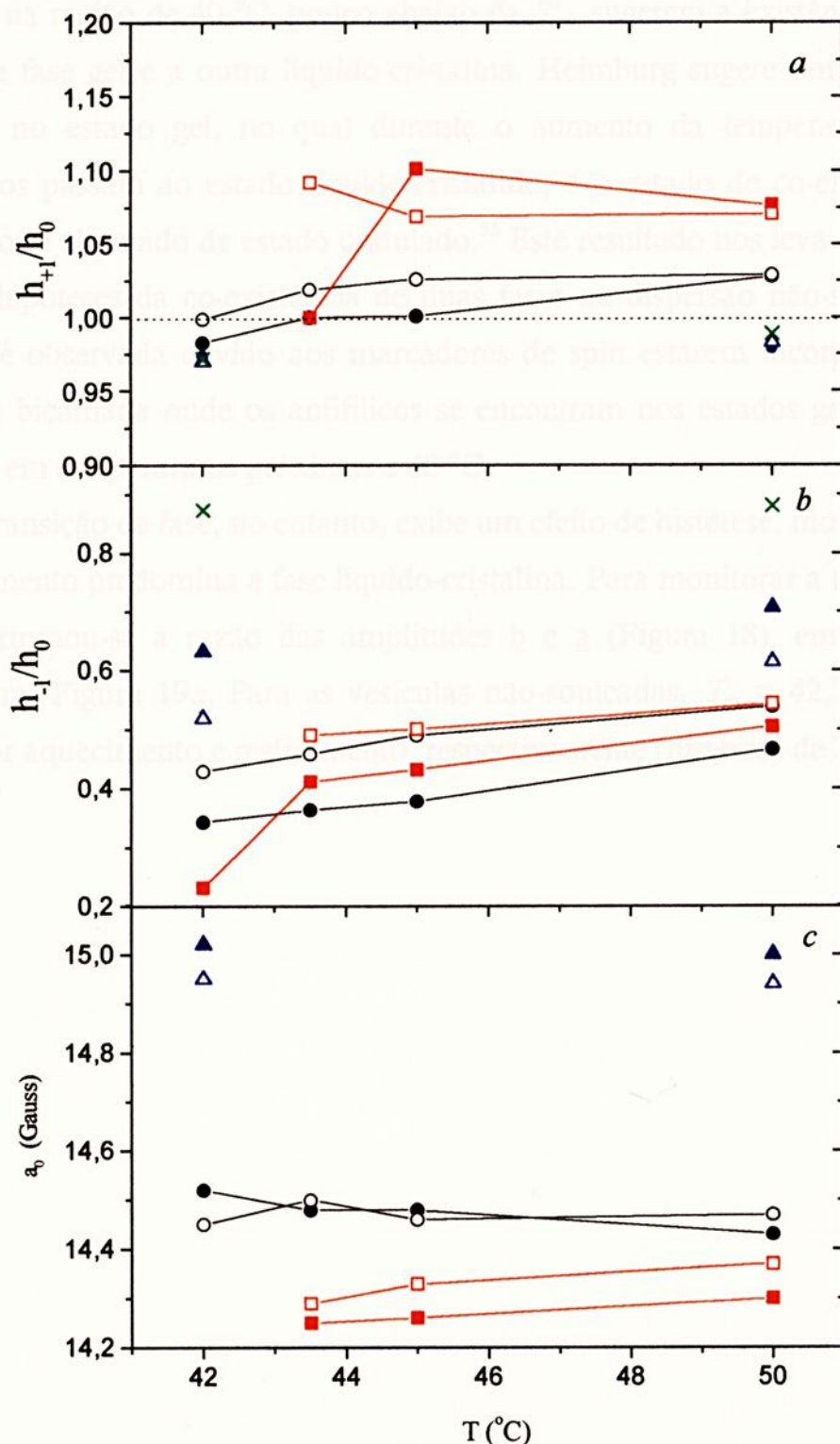


Figura 17: Efeito da temperatura na razão de amplitude das linhas hiperfinas correspondentes ao número de spin do nitrogênio (a) $m_I = +1$ e $m_I = 0$ (h_{+1}/h_0), (b) $m_I = -1$ e $m_I = 0$ (h_{-1}/h_0) e (c) na constante hiperfina isotrópica (a_0) de 16-SASL em água (X), em vesículas sonicadas (●) e não-sonicadas (■) de DODAB e em micelas de C_{18}TAB (▲), e de 16-MESL em vesículas sonicadas (○) e não-sonicadas (□) de DODAB e em micelas de C_{18}TAB (Δ).

Como mencionado anteriormente, os espectros RPE em vesículas não-sonicadas na região de 40 °C, pouco abaixo da T_m , sugerem a existência de duas fases: uma fase gel e a outra líquido-cristalina. Heimburg sugere um modelo de bicamada no estado gel, no qual durante o aumento da temperatura alguns fosfolipídios passam ao estado líquido-cristalino, e o estado de co-existência de dois estados é chamado de estado ondulado.⁵³ Este resultado nos leva a supor que uma das hipóteses da co-existência de duas fases na dispersão não-sonicada de DODAB é observada devido aos marcadores de spin estarem incorporados em regiões da bicamada onde os anfifílicos se encontram nos estados gel e líquido-cristalino, em temperaturas próximas a 40 °C.

A transição de fase, no entanto, exibe um efeito de histerese, mostrando que no resfriamento predomina a fase líquido-cristalina. Para monitorar a transição de fase, determinou-se a razão das amplitudes b e a (Figura 18), em função da temperatura, Figura 19a. Para as vesículas não-sonicadas, $T_m = 42,7$ e $39,5$ °C obtidas por aquecimento e resfriamento, respectivamente (histerese de $3,2$ °C).

Figura 18: Espectros RPE de 16-MESL em vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM a 40 °C, obtidos por aquecimento seguido de resfriamento no intervalo de temperatura de 15 a 35 °C.

Um outro parâmetro empírico do espectro de RPE que dá para monitorar a transição de fase de DODAB é a largura da segunda linha hiperfina correspondente ao nitrogênio de spin do nitrogênio $m_N = 2$ (ΔH_2). O efeito da temperatura na razão b/a e em ΔH_2 de 16-MESL em vesículas não-sonicadas de DODAB (Figura 19), confirma a histerese observada pelos espectros, Figura 18.

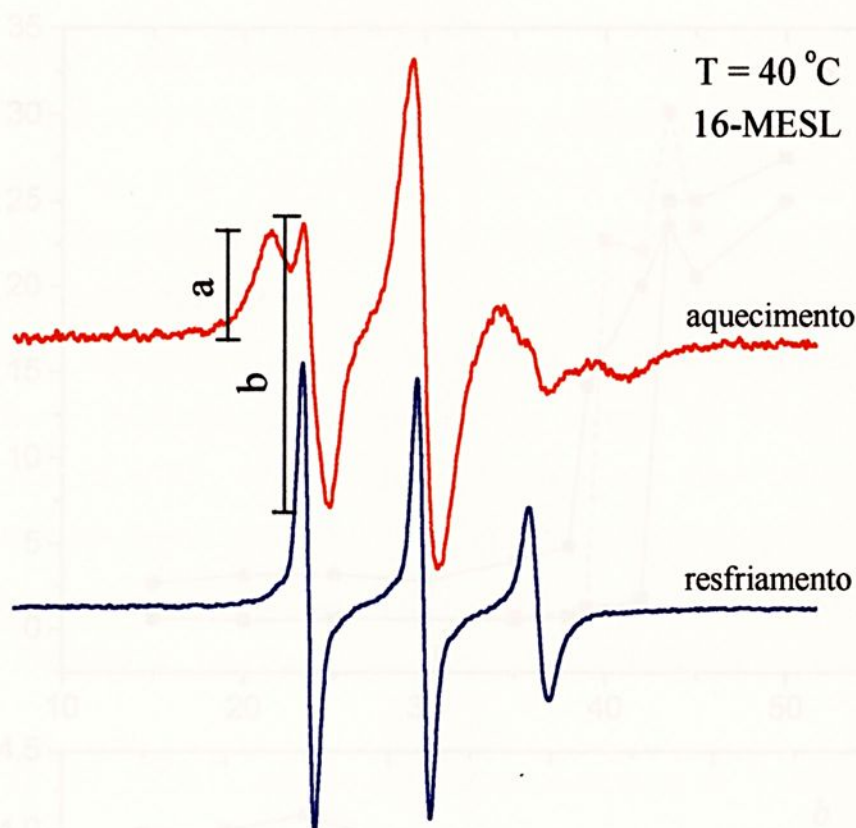


Figura 18: Espectros RPE de 16-MESL em vesículas não-sonicadas de DODAB 5,0 mM a 40 °C, obtidos por aquecimento seguido de resfriamento da dispersão no intervalo de temperatura de 15 a 55 °C.

Um outro parâmetro empírico do espectro de RPE que dá para monitorar a transição de fase de DODAB é a largura da segunda linha hiperfina correspondente ao número de spin do nitrogênio $m_I = 0$ (ΔH_0). O efeito da temperatura na razão b/a e em ΔH_0 de 16-MESL em vesículas não-sonicadas de DODAB (Figura 19), confirma a histerese observada pelos espectros, Figura 18

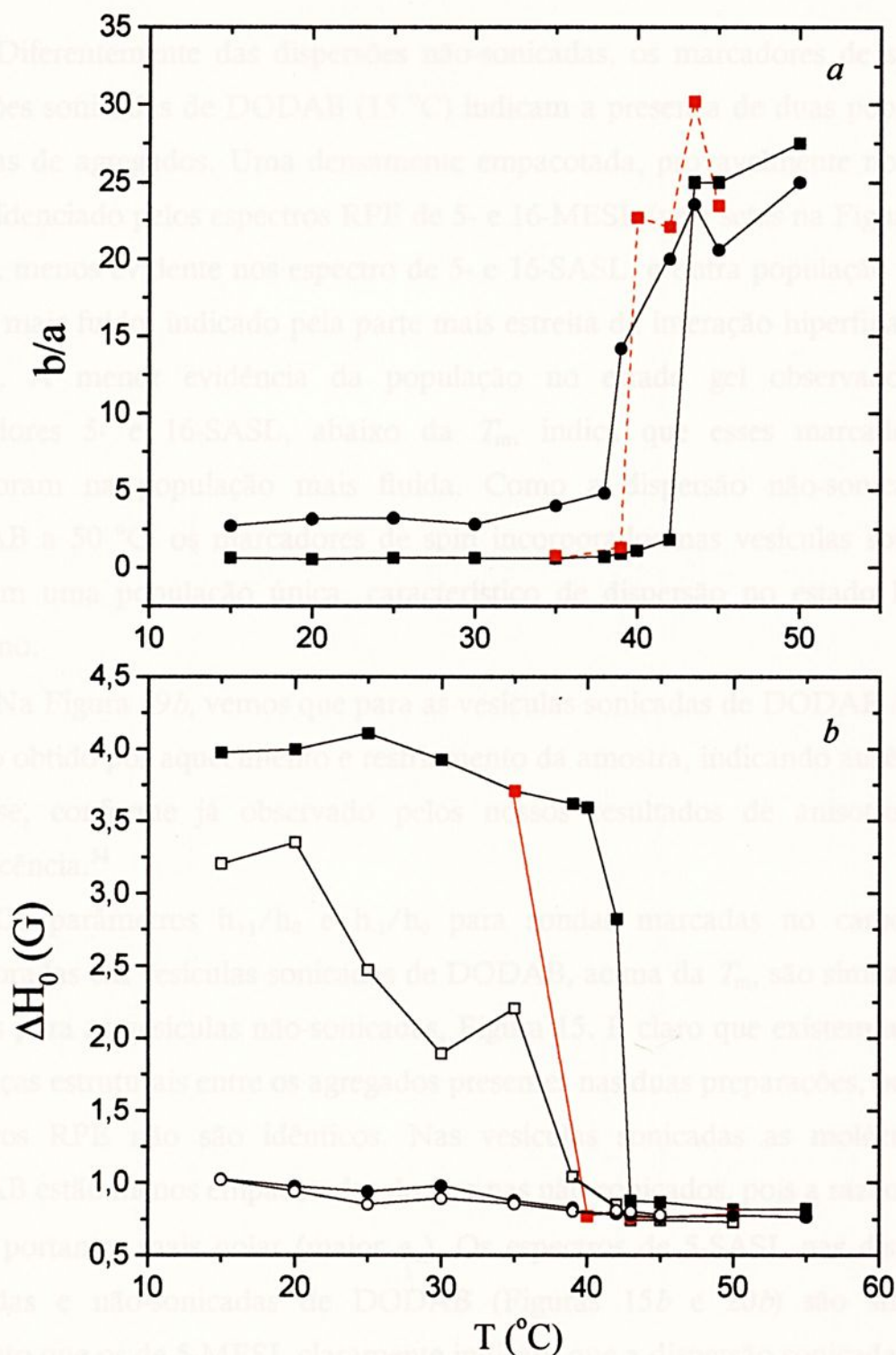


Figura 19: (a) Efeito da temperatura na razão b/a das amplitudes dos picos do espectro de RPE de 16-MESL em vesículas de DODAB 5,0 mM não-sonicadas, obtido por aquecimento (■) e resfriamento (●) e sonicadas, por aquecimento (●). (b) Efeito da temperatura na largura da segunda linha hiperfina (ΔH_0) do espectro de RPE de 16-SASL em vesículas de DODAB 5,0 mM não-sonicadas (□) e sonicadas (O), obtido por aquecimento, e de 16-MESL em vesículas não-sonicadas obtido por aquecimento (■) e resfriamento (●) em vesículas sonicadas por aquecimento (●).

Dispersões sonicadas de DODAB

Diferentemente das dispersões não-sonicadas, os marcadores de spin em dispersões sonicadas de DODAB (15 °C) indicam a presença de duas populações distintas de agregados. Uma densamente empacotada, provavelmente no estado gel, evidenciado pelos espectros RPE de 5- e 16-MESL (veja setas na Figura 20c), porém, menos evidente nos espectro de 5- e 16-SASL, e outra população em um estado mais fluido, indicado pela parte mais estreita da interação hiperfina de 16-MESL. A menor evidência da população no estado gel observado pelos marcadores 5- e 16-SASL, abaixo da T_m , indica que esses marcadores se incorporam na população mais fluida. Como a dispersão não-sonicada de DODAB a 50 °C, os marcadores de spin incorporados nas vesículas sonicadas mostram uma população única, característico de dispersão no estado líquido-cristalino.

Na Figura 19b, vemos que para as vesículas sonicadas de DODAB ΔH_0 é o mesmo obtido por aquecimento e resfriamento da amostra, indicando ausência de histerese, conforme já observado pelos nossos resultados de anisotropia de fluorescência.⁵⁴

Os parâmetros h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 para sondas marcadas no carbono 16 incorporadas em vesículas sonicadas de DODAB, acima da T_m , são similares aos obtidos para as vesículas não-sonicadas, Figura 15. É claro que existem algumas diferenças estruturais entre os agregados presentes nas duas preparações, pois seus espectros RPE não são idênticos. Nas vesículas sonicadas as moléculas de DODAB estão menos empacotadas do que nas não-sonicadas, pois a razão $h_{+1}/h_0 \approx 1$ e, portanto, mais polar (maior a_0). Os espectros de 5-SASL nas dispersões sonicadas e não-sonicadas de DODAB (Figuras 15b e 20b) são similares, enquanto que os de 5-MESL claramente indicam que a dispersão sonicada é mais fluida, Figura 20a.

Figura 20. Espectros RPE de 5- e 16-MESL, e 5- e 16-SASL 0,7 μ M em vesículas sonicadas de DODAB 5,0 mM para quatro diferentes temperaturas.

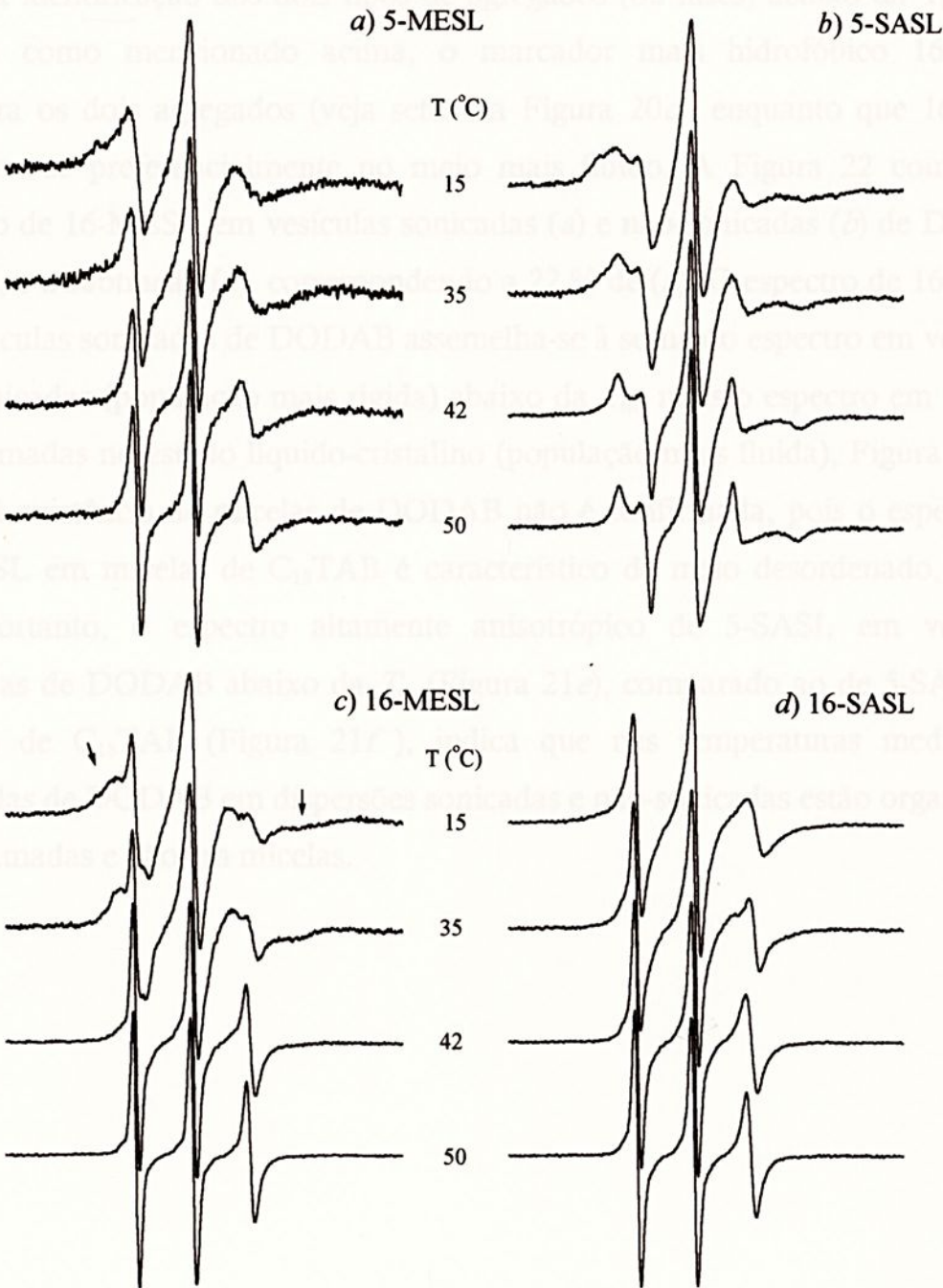


Figura 20: Espectros RPE de 5- e 16-MESL, e 5- e 16-SASL 0,7 μ M em vesículas sonicadas de DODAB 5,0 mM para quatro diferentes temperaturas.

A identificação dos dois tipos de agregados (ou fases) abaixo da T_m não é simples como mencionado acima, o marcador mais hidrofóbico 16-MESL monitora os dois agregados (veja setas na Figura 20c), enquanto que 16-SASL particiona-se preferencialmente no meio mais fluido. A Figura 22 compara o espectro de 16-MESL em vesículas sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB a 35 °C, e a subtração (c), correspondendo a 22 % de (a). O espectro de 16-MESL em vesículas sonicadas de DODAB assemelha-se à soma do espectro em vesículas não-sonicadas (população mais rígida) abaixo da T_m , mais o espectro em micelas ou bicamadas no estado líquido-cristalino (população mais fluida), Figura 21d. A possível existência de micelas de DODAB não é confirmada, pois o espectro de 16-MESL em micelas de $C_{18}TAB$ é característico de meio desordenado, Figura 21d. Portanto, o espectro altamente anisotrópico de 5-SASL em vesículas sonicadas de DODAB abaixo da T_m (Figura 21e), comparado ao de 5-SASL em micelas de $C_{18}TAB$ (Figura 21f), indica que nas temperaturas medidas as moléculas de DODAB em dispersões sonicadas e não-sonicadas estão organizadas em bicamadas e não em micelas.



Figura 21: Espectros RPE de 16-MESL a 35 °C em dispersões sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB; (c) diferença dos espectros (a) menos (b) e em micelas de $C_{18}TAB$ (d). Espectros de 5-SASL em dispersões sonicadas (e) e micelas de $C_{18}TAB$ (f).

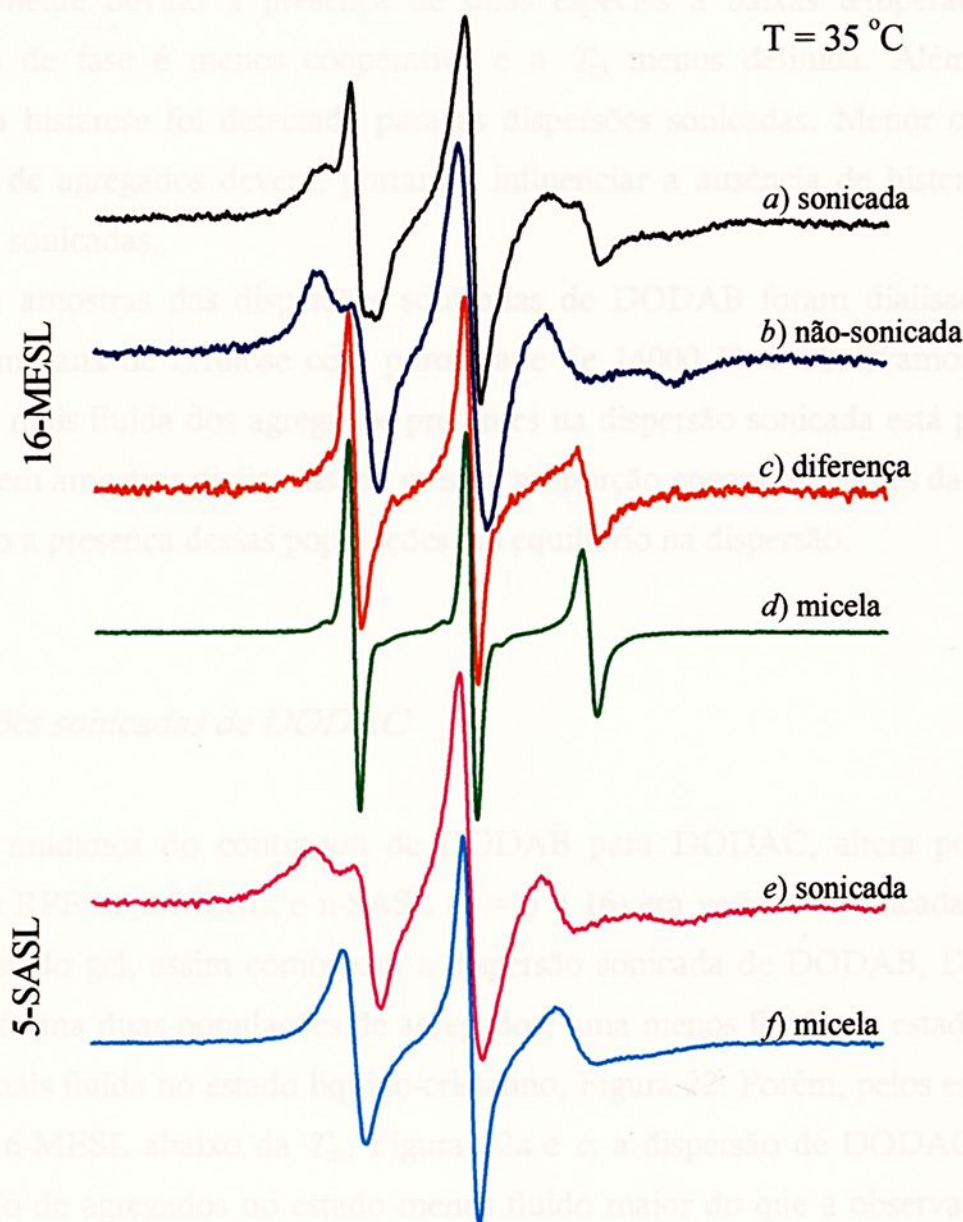


Figura 21: Espectros RPE de 16-MESL a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ em dispersões sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB; (c) diferença dos espectros (a) menos (b) e em micelas de C_{18}TAB (d). Espectros de 5-SASL em dispersões sonicadas (e) e micelas de C_{18}TAB (f).

A T_m de DODAB em dispersões não-sonicadas pode ser monitorada pela razão b/a do espectro de 16-MESL, Figura 18. Porém, em dispersões sonicadas, provavelmente devido à presença de duas espécies a baixas temperaturas, a transição de fase é menos cooperativa e a T_m menos definida. Além disso, nenhuma histerese foi detectada para as dispersões sonicadas. Menor ordem e misturas de agregados devem, portanto, influenciar a ausência de histerese nas vesículas sonicadas.

As amostras das dispersões sonicadas de DODAB foram dialisadas por uma membrana de celulose com porosidade de 14000 D, e observamos que a estrutura mais fluida dos agregados presentes na dispersão sonicada está presente também em amostras dialisadas, na mesma proporção encontrada antes da diálise, sugerindo a presença dessas populações em equilíbrio na dispersão.

Dispersões sonicadas de DODAC

A mudança do contra-íon de DODAB para DODAC, altera pouco os espectros RPE de n-MESL, e n-SASL ($n = 5$ e 16) em vesículas sonicadas. A 15°C , no estado gel, assim como para a dispersão sonicada de DODAB, DODAC também forma duas populações de agregados, uma menos fluida no estado gel, e a outra mais fluida no estado líquido-cristalino, Figura 22. Porém, pelos espectros de 5- e 16-MESL abaixo da T_m , Figura 22a e c, a dispersão de DODAC tem a população de agregados no estado menos fluido maior do que a observada para DODAB, indicando que no estado gel, Cl^- favorece mais do que Br^- a formação da população menos fluida. O parâmetro empírico $A_{\text{máx}}$ obtido de 5- e 16-MESL, indica que a bicamada de DODAC é mais empacotada do que as de DODAB, o que provavelmente contribui para o maior valor da T_m de DODAC do que DODAB.⁶⁶ Resultado semelhante foi obtido por Nascimento e cols.⁶⁴ Esses pesquisadores relataram também que o contra-íon brometo gera menor repulsão eletrostática entre as regiões polares dos anfifílicos adjacentes, favorecendo o menor empacotamento das cadeias hidrofóbicas.

A 50 °C, o espectro de 16-MESL e 16-SASL nas vesículas sonicadas de DODAC são característicos de regiões de menor viscosidade e desordem. Nesta mesma temperatura, um meio de maior ordem nas vesículas sonicadas de DODAC é mostrado por 5-MESL e 5-SASL, que deve estar incorporado na região da bicamada vesicular mais próxima à interface. Esses resultados são similares aos encontrados para as vesículas de DODAB na mesma temperatura.



Figura 22: Espectros RPE de 5- e 16-MESL, e 5- e 16-SASL em vesículas sonicadas de DODAC 5,0 mM em quatro diferentes temperaturas.

III.1.2. Intensidade de Fluorescência

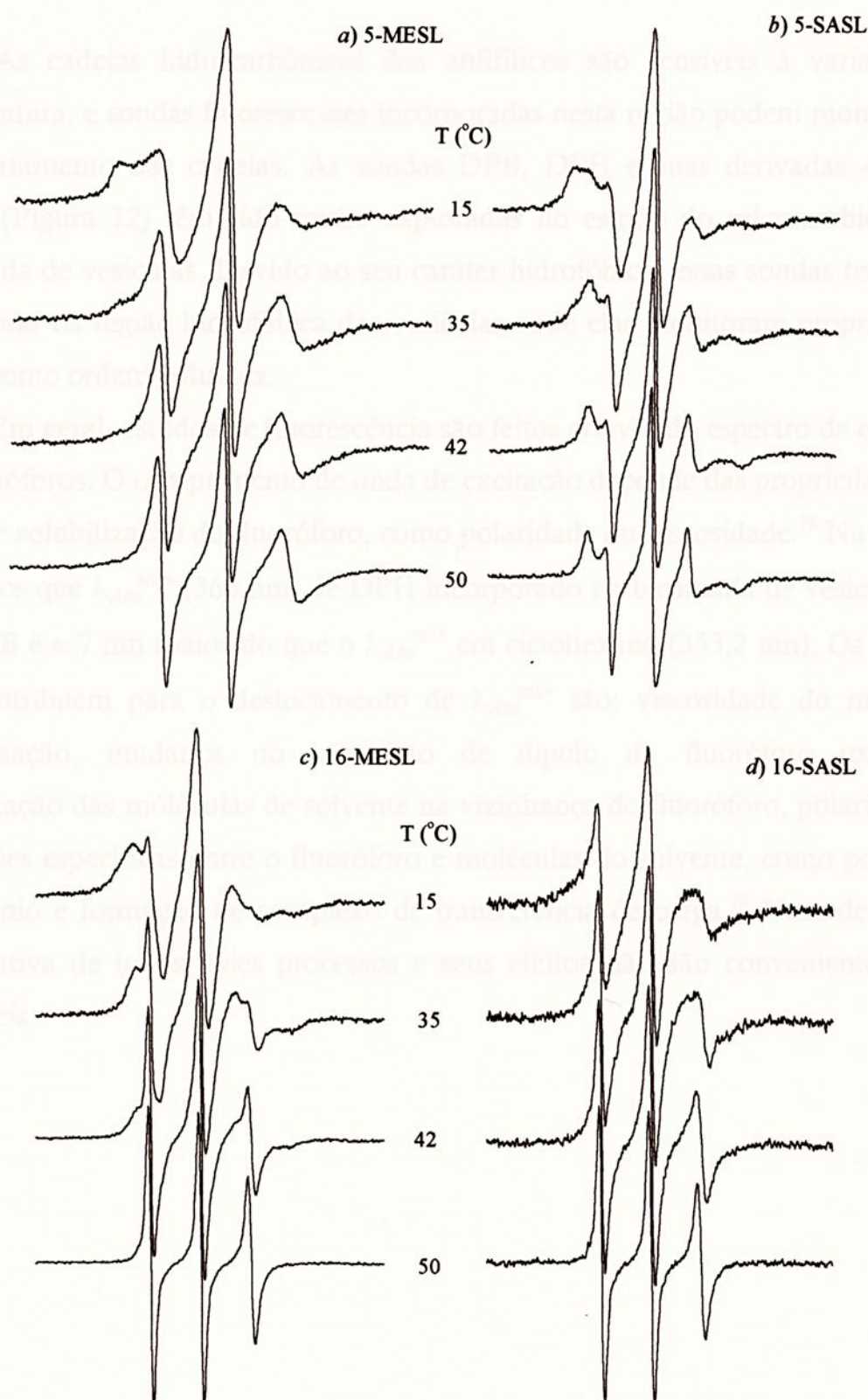


Figura 22: Espectros RPE de 5- e 16-MESL, e 5- e 16-SASL em vesículas sonicadas de DODAC 5,0 mM em quatro diferentes temperaturas.

III.1.2. Intensidade de Fluorescência

As cadeias hidrocarbônicas dos anfifílicos são sensíveis à variação de temperatura, e sondas fluorescentes incorporadas nesta região podem monitorar o comportamento das cadeias. As sondas DPB, DPH e suas derivadas 4B4A e 4H4A (Figura 12) têm sido muito exploradas no estudo do microambiente da bicamada de vesículas. Devido ao seu caráter hidrofóbico, essas sondas tendem a incorporar na região hidrofóbica das vesículas onde elas monitoram propriedades locais como ordem e fluidez.

Em geral, estudos de fluorescência são feitos através do espectro de emissão de fluoróforos. O comprimento de onda de excitação depende das propriedades do meio de solubilização do fluoróforo, como polaridade ou viscosidade.⁷⁸ Na Figura 23 vemos que $\lambda_{Abs}^{máx}$ (360 nm) de DPH incorporado na bicamada de vesículas de DODAB é ≈ 7 nm maior do que o $\lambda_{Abs}^{máx}$ em ciclohexano (353,2 nm). Os fatores que contribuem para o deslocamento de $\lambda_{Abs}^{máx}$ são: viscosidade do meio de solubilização, mudança no momento de dipolo do fluoróforo excitado, reorientação das moléculas de solvente na vizinhança do fluoróforo, polaridade e interações específicas entre o fluoróforo e moléculas do solvente, como ponte de hidrogênio e formação de complexo de transferência de carga.⁷⁸ Uma descrição quantitativa de todos esses processos e seus efeitos não são convenientemente avaliáveis.

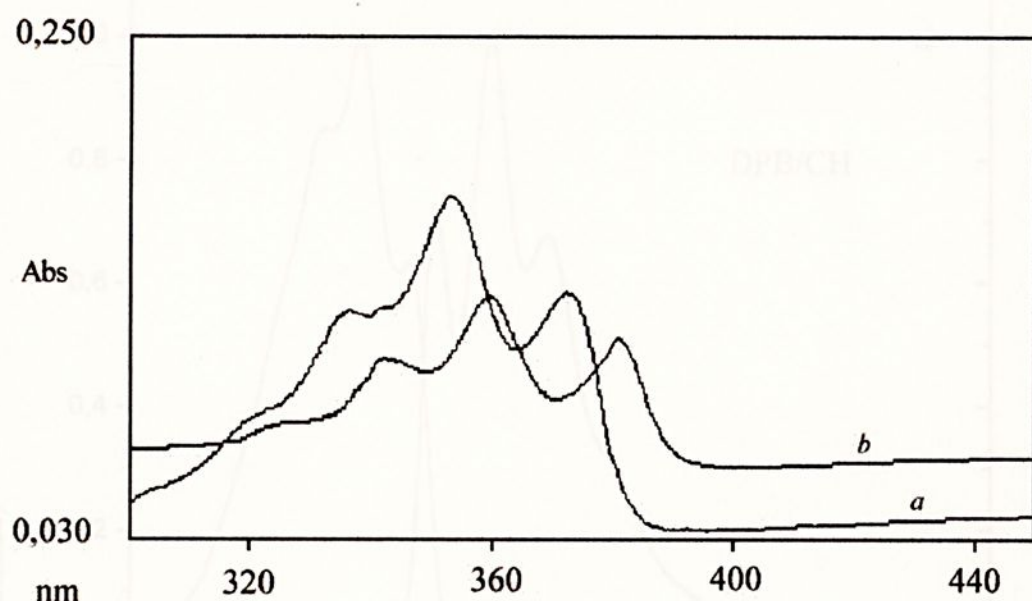


Figura 23: Espectro de absorção de DPH 2,2 μM em ciclohexano (a) e em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM (b) a 25 °C.

O espectro de emissão de fluorescência depende da estrutura química do fluoróforo e do solvente no qual está diluído. Em geral, o espectro de excitação de um fluoróforo em solução diluída se assemelha ao espectro de absorção deste fluoróforo. Sob as mesmas condições, o espectro de emissão de fluorescência independe do comprimento de onda de excitação devido à dissipação parcial da energia de excitação durante o tempo de vida do estado excitado.⁷⁸ As Figuras 24 e 25 mostram os espectros de excitação e emissão de quatro sondas *t*-Dpo em diferentes ambientes de solubilização.

Figura 24: Espectros de excitação (—) e emissão (---) de fluorescência de DPH 2,2 μM em ciclohexano (CH) e clorofórmio.

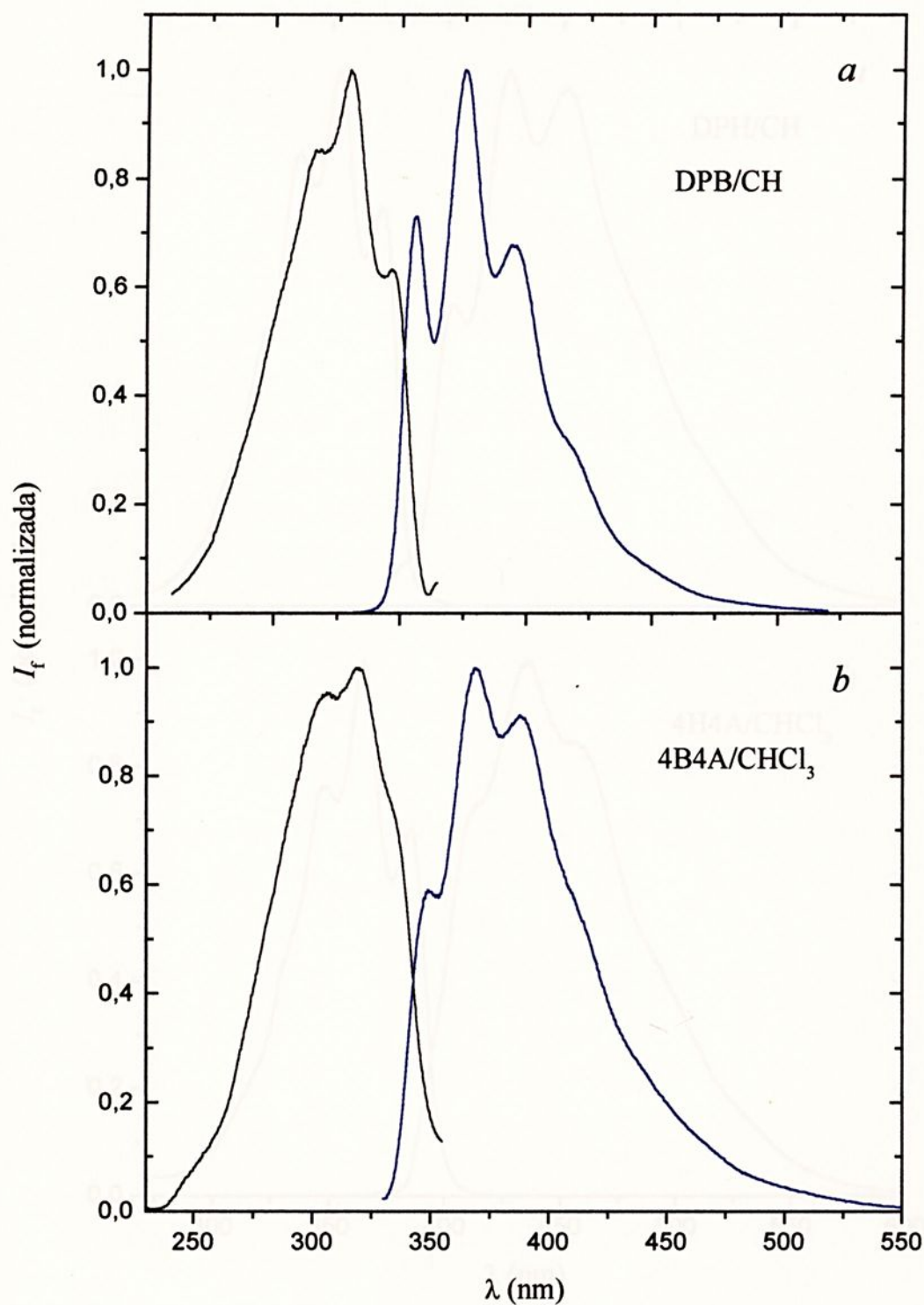


Figura 24: Espectros de excitação (—) e emissão (---) de fluorescência de DPB e 4B4A em ciclohexano (CH) e clorofórmio.

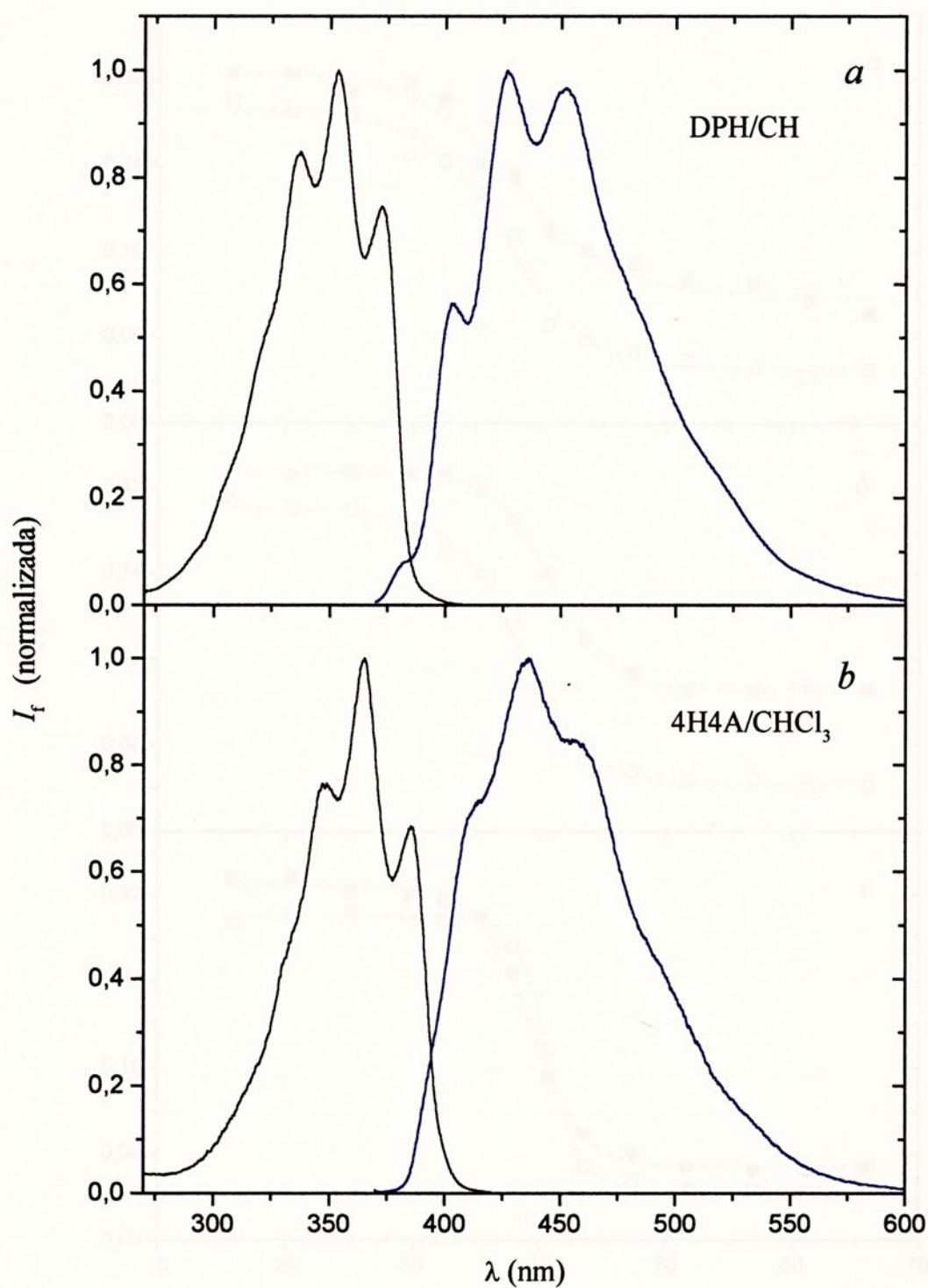


Figura 25: Espectros de excitação (—) e emissão (---) de fluorescência de DPH e 4H4A em ciclohexano (CH) e clorofórmio.

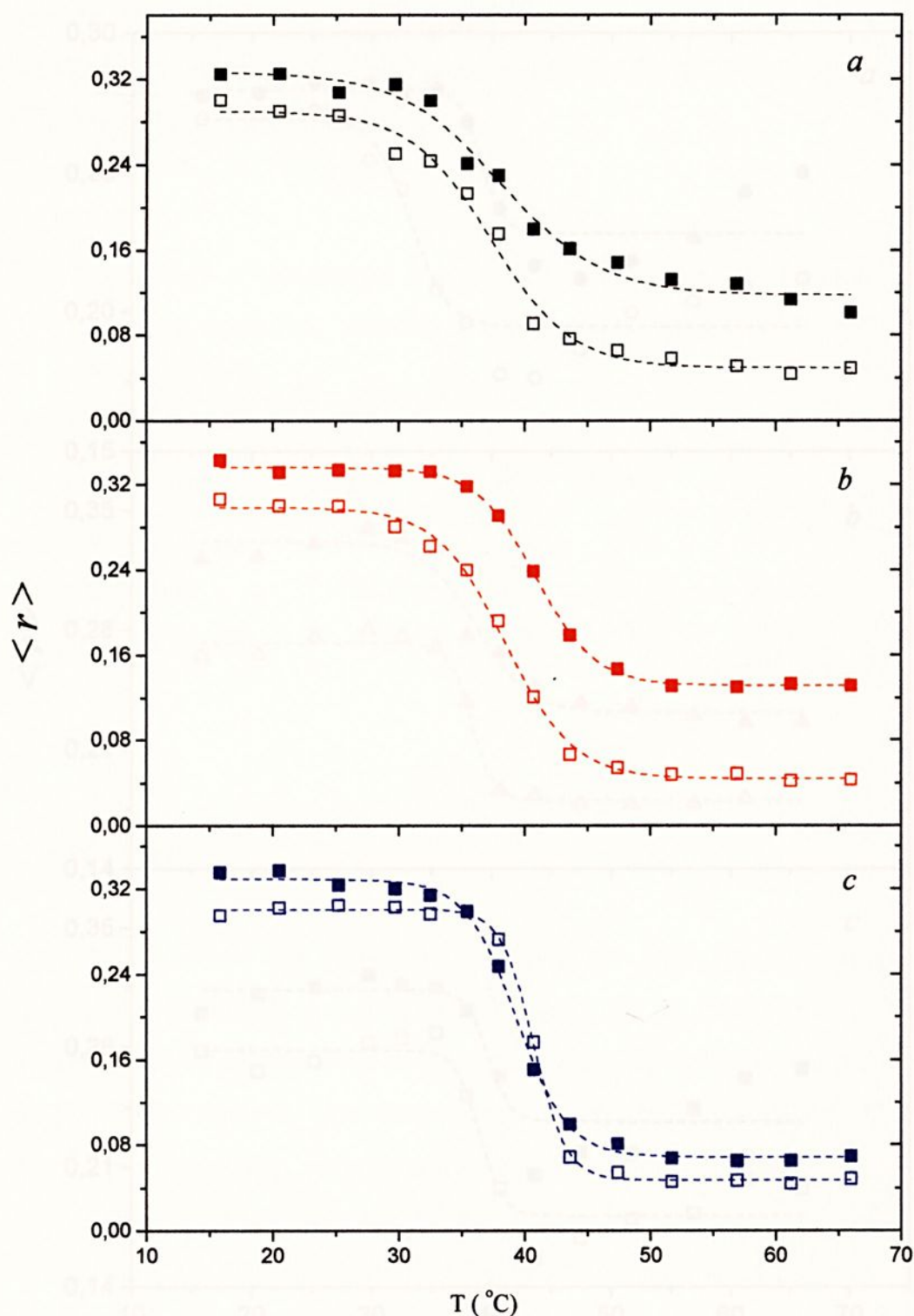


Figura 35 : Efeito da temperatura na anisotropia de DPH (O, Δ e $\square$) e 4H4A ($\bullet$, $\blacktriangle$ e $\blacksquare$) em vesículas (a) sonicadas, (b) injetadas e (c) não-sonicadas de DODAB.

Figura 36 : Efeito da temperatura na anisotropia de DPB (O, Δ e $\square$) e 4H4A ($\bullet$, $\blacktriangle$ e $\blacksquare$) em vesículas (a) sonicadas, (b) injetadas e (c) não-sonicadas de DODAB.

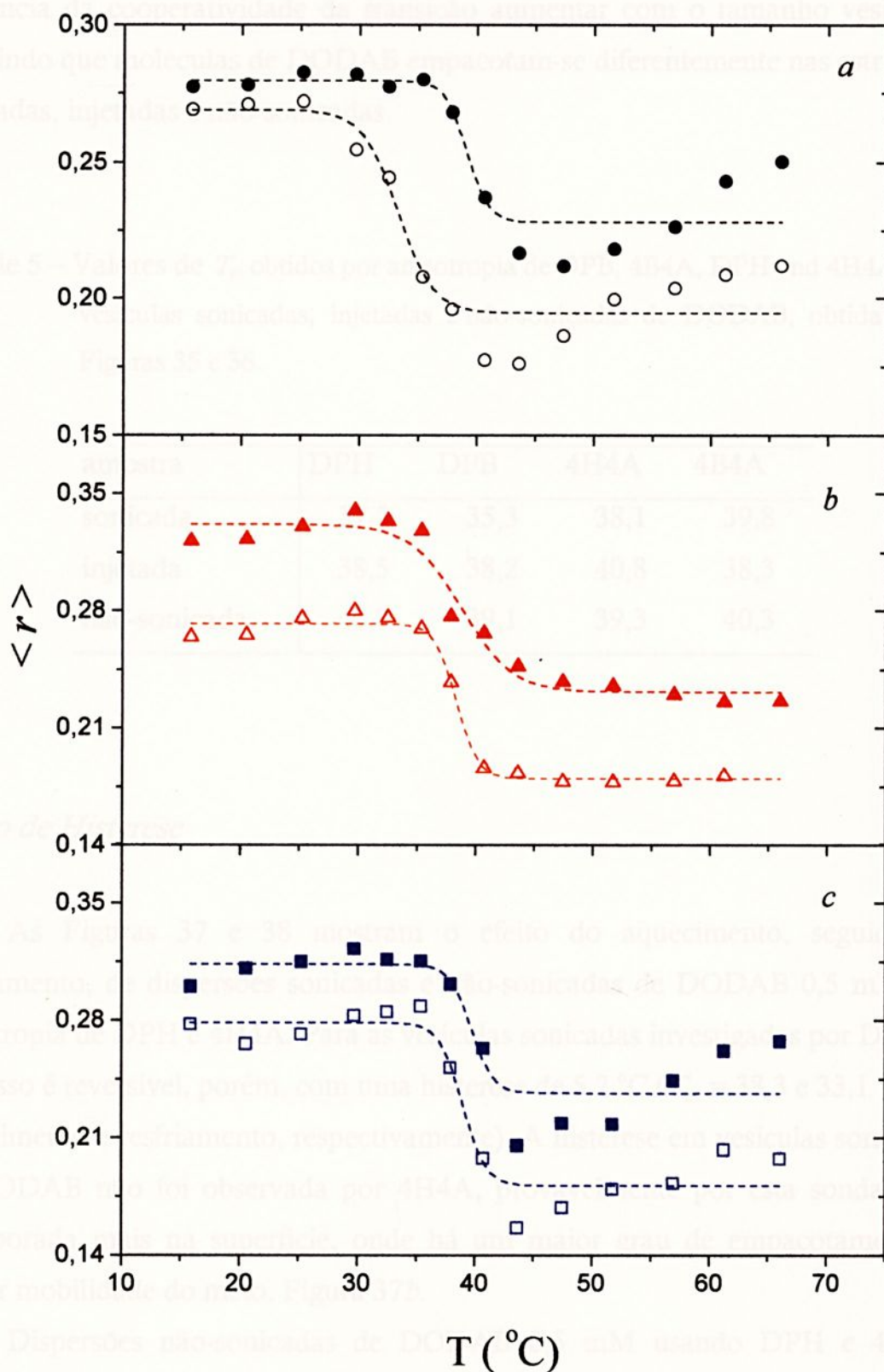


Figura 36 : Efeito da temperatura na anisotropia de DPB (O, Δ e $\square$) e 4B4A ($\bullet$, $\blacktriangle$ e $\blacksquare$) em vesículas (a) sonicadas, (b) injetadas e (c) não-sonicadas de DODAB.

O perfil das curvas de anisotropia (Figuras 35 e 36) mostram a tendência da cooperatividade da transição aumentar com o tamanho vesicular, sugerindo que moléculas de DODAB empacotam-se diferentemente nas estruturas sonicadas, injetadas e não-sonicadas.

Table 5 – Valores de T_m obtidos por anisotropia de DPB, 4B4A, DPH and 4H4A em vesículas sonicadas, injetadas e não-sonicadas de DODAB, obtidas das Figuras 35 e 36.

amostra	DPH	DPB	4H4A	4B4A
sonicada	37,3	35,3	38,1	39,8
injetada	38,5	38,2	40,8	38,3
não-sonicada	40,7	39,1	39,3	40,3

Efeito de Histerese

As Figuras 37 e 38 mostram o efeito do aquecimento, seguido de resfriamento, de dispersões sonicadas e não-sonicadas de DODAB 0,5 mM, na anisotropia de DPH e 4H4A. Para as vesículas sonicadas investigadas por DPH, o processo é reversível, porém, com uma histerese de 5,2 °C ($T_m = 38,3$ e 33,1 °C, no aquecimento e resfriamento, respectivamente). A histerese em vesículas sonicadas de DODAB não foi observada por 4H4A, provavelmente por esta sonda estar incorporada mais na superfície, onde há um maior grau de empacotamento e menor mobilidade do meio, Figura 37b.

Dispersões não-sonicadas de DODAB 0,5 mM usando DPH e 4H4A, apresentam histerese mínima, Figura 38. Para DPH, Figura 38a, os valores da T_m obtidos no aquecimento e resfriamento foram de 40,3 e 39,7 °C, respectivamente, e para 4H4A, Figura 38b, $T_m = 40,7$ e 39,0 °C, com histerese de 0,6 e 1,7 °C, obtida por DPH e 4H4A, respectivamente.

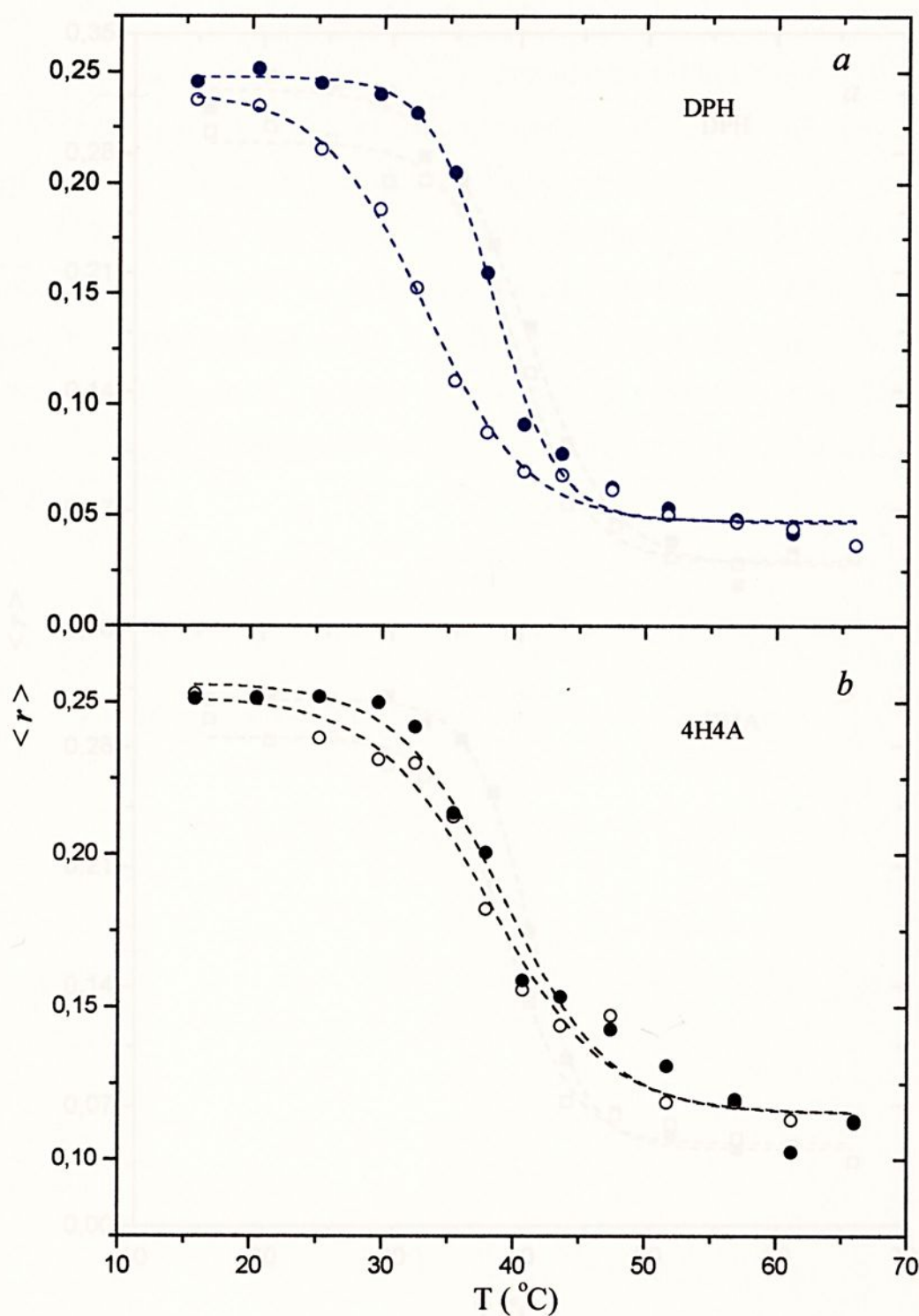


Figura 37 : Efeito da temperatura na anisotropia de (a) DPH e (b) 4H4A em vesículas sonicadas de DODAB, obtido por aquecimento (● e ●) e resfriamento (○ e ○) da amostra.

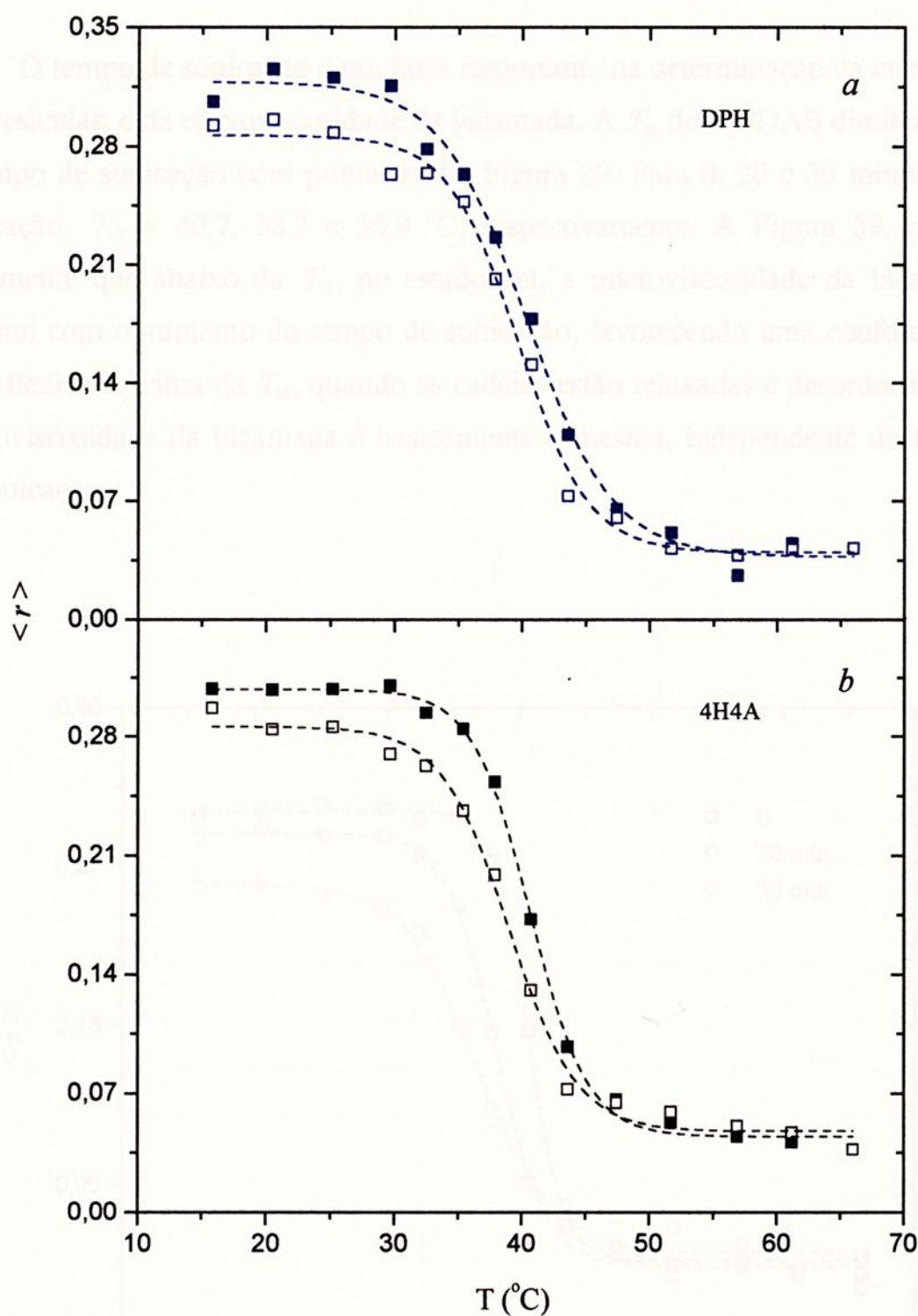


Figura 38 : Efeito da temperatura na anisotropia de (a) DPH e (b) 4H4A em vesículas não-sonicadas de DODAB, obtido por aquecimento (■ e ■) e resfriamento (□ e □) da amostra.

Efeito da Sonicação

O tempo de sonicação é um fator importante na determinação da curvatura das vesículas, e da microviscosidade da bicamada. A T_m de DODAB diminui com o tempo de sonicação com ponta de Ti, Figura 29. Para 0, 20 e 30 minutos de sonicação, $T_m = 40,7$, $38,2$ e $36,9$ °C, respectivamente. A Figura 39, mostra claramente que abaixo da T_m , no estado gel, a microviscosidade da bicamada diminui com o aumento do tempo de sonicação, favorecendo uma conformação mais flexível. Acima da T_m , quando as cadeias estão relaxadas e desordenadas, a microviscosidade da bicamada é basicamente a mesma, independente do tempo de sonicação.

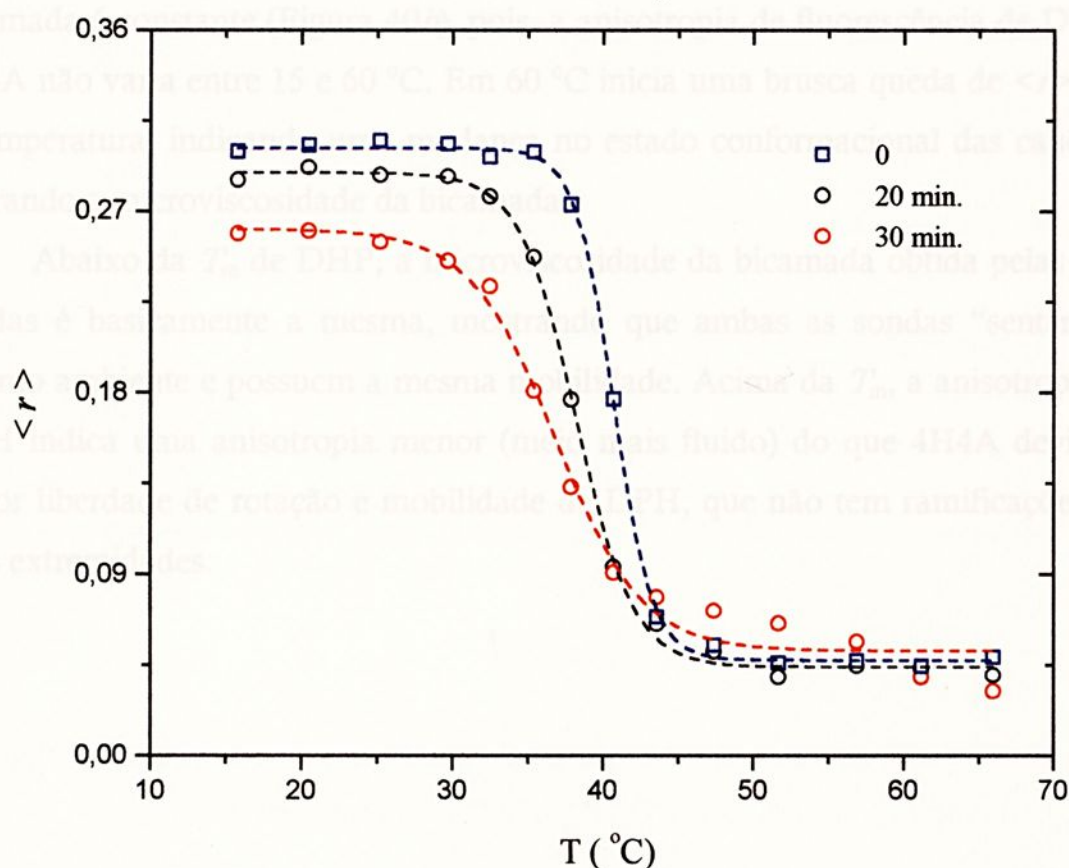


Figura 39 : Efeito da temperatura na anisotropia de DPH em vesículas sonicadas com ponta de Ti por diferentes tempos.

Posição da Sonda na Bicamada

A diferença observada nos valores da T_m se deve provavelmente à localização e mobilidade das sondas no interior da bicamada. A sonda 4H4A por estar desprotonada deve estar localizada mais próximo da superfície da bicamada de DODAB carregada positivamente.⁷⁸ A interação eletrostática de 4H4A com a superfície, bem como sua pequena cauda, limitam sua mobilidade. DPH, por ser eletricamente neutro, deve localizar-se mais no interior da bicamada e ter maior mobilidade.⁷⁹ A Figura 40 compara o efeito da temperatura na anisotropia de DPH e 4H4A incorporados nas vesículas sonicadas de DODAB e DHP 1,0 mM. Observa-se que para todos os valores de temperatura estudados, a anisotropia de fluorescência de 4H4A é maior do que a de DPH em vesículas de DODAB, indicando que 4H4A sente na bicamada um ambiente mais rígido.

A T_m de DHP obtida foi de 66 °C. Abaixo da T_m , a microviscosidade da bicamada é constante (Figura 40b), pois, a anisotropia de fluorescência de DPH e 4H4A não varia entre 15 e 60 °C. Em 60 °C inicia uma brusca queda de $\langle r \rangle$ com a temperatura, indicando uma mudança no estado conformacional das caudas e alterando a microviscosidade da bicamada.

Abaixo da T_m de DHP, a microviscosidade da bicamada obtida pelas duas sondas é basicamente a mesma, mostrando que ambas as sondas “sentem” o mesmo ambiente e possuem a mesma mobilidade. Acima da T_m , a anisotropia de DPH indica uma anisotropia menor (meio mais fluido) do que 4H4A devido à maior liberdade de rotação e mobilidade de DPH, que não tem ramificações em suas extremidades.

Figura 40. Efeito da temperatura da anisotropia de DPH (●) e 4H4A (○) em vesículas sonicadas de (a) DODAB 1,0 mM e (b) DHP 1,0 mM.

III.1.5. Supressão de Fluorescência

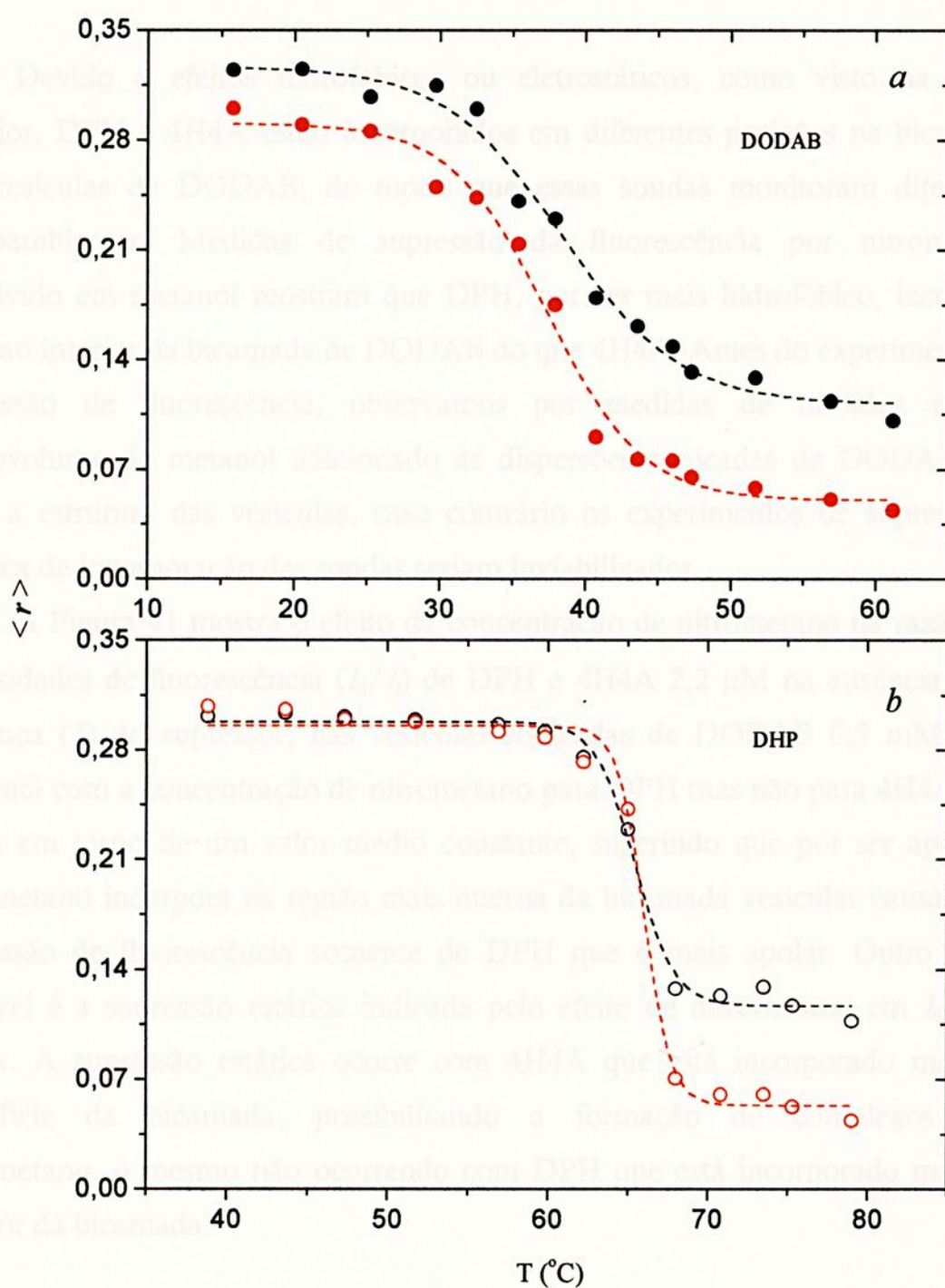


Figura 40: Efeito da temperatura na anisotropia de DPH (● e ○) e 4H4A (● e ○) em vesículas sonicadas de (a) DODAB 1,0 mM e (b) DHP 1,0 mM.

III.1.5. Supressão de Fluorescência

Devido a efeitos hidrofóbicos ou eletrostáticos, como visto na seção anterior, DPH e 4H4A estão incorporados em diferentes posições na bicamada das vesículas de DODAB, de modo que essas sondas monitoram diferentes microambientes. Medidas de supressão da fluorescência por nitrometano dissolvido em metanol mostram que DPH, por ser mais hidrofóbico, incorpora mais ao interior da bicamada de DODAB do que 4H4A. Antes do experimento de supressão de fluorescência, observamos por medidas de turbidez que o microvolume de metanol adicionado às dispersões sonicadas de DODAB não afeta a estrutura das vesículas, caso contrário os experimentos de supressão e cinética de incorporação das sondas seriam inviabilizados.

A Figura 41 mostra o efeito da concentração de nitrometano na razão das intensidades de fluorescência (I_0/I_f) de DPH e 4H4A 2,2 μM na ausência (I_0) e presença (I_f) do supressor, nas vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM. I_0/I_f aumenta com a concentração de nitrometano para DPH mas não para 4H4A, que oscila em torno de um valor médio constante, sugerindo que por ser apolar o nitrometano incorpora na região mais interna da bicamada vesicular causando a supressão de fluorescência somente de DPH que é mais apolar. Outro efeito possível é a supressão estática indicada pelo efeito de nitrometano em I_0/I_f de 4H4A. A supressão estática ocorre com 4H4A que está incorporado mais na superfície da bicamada, possibilitando a formação de complexos com nitrometano, o mesmo não ocorrendo com DPH que está incorporado mais no interior da bicamada.

III.1.6. Solubilização do Pireno em Vesículas de DODAB

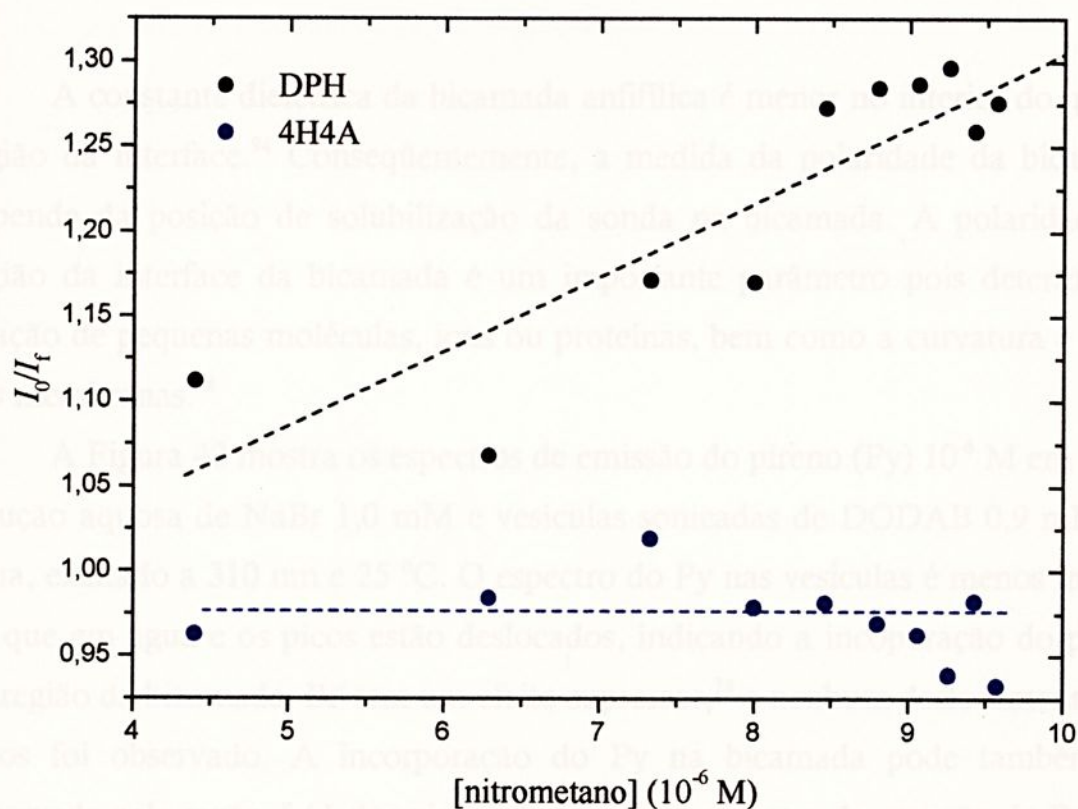


Figura 41: Efeito do nitrometano na supressão de fluorescência de DPH e 4H4A em vesículas sonificadas de DODAB 0,5 mM. I_0 e I_f são, respectivamente, a intensidade de fluorescência sem e com o supressor. O nitrometano 10^{-6} M previamente diluído em metanol foi adicionado à amostra (0,5 mM).

III.1.6. Solubilização do Pireno em Vesículas de DODAB

A constante dielétrica da bicamada anfifílica é menor no interior do que na região da interface.⁹⁴ Conseqüentemente, a medida da polaridade da bicamada depende da posição de solubilização da sonda na bicamada. A polaridade na região da interface da bicamada é um importante parâmetro pois determina a ligação de pequenas moléculas, ions ou proteínas, bem como a curvatura e fusão das membranas.⁹⁴

A Figura 42 mostra os espectros de emissão do pireno (Py) 10^{-6} M em água, solução aquosa de NaBr 1,0 mM e vesículas sonicadas de DODAB 0,9 mM em água, excitado a 310 nm e 25 °C. O espectro do Py nas vesículas é menos intenso do que em água e os picos estão deslocados, indicando a incorporação do pireno na região da bicamada. Br⁻ tem um efeito supressor,⁷⁸ e nenhum deslocamento dos picos foi observado. A incorporação do Py na bicamada pode também ser observada pela razão I_1/I_3 dos picos vibrônicos do espectro de emissão do Py, que é proporcional à polaridade do meio, I_1/I_3 é igual a 1,9 (água), 1,8 (NaBr) e 1,4 (vesículas); o menor valor de I_1/I_3 mostra que o pireno está em meio mais apolar, i.e., na bicamada. Os valores de I_1/I_3 acima foram obtidos dos espectros da Figura 42.⁸⁰

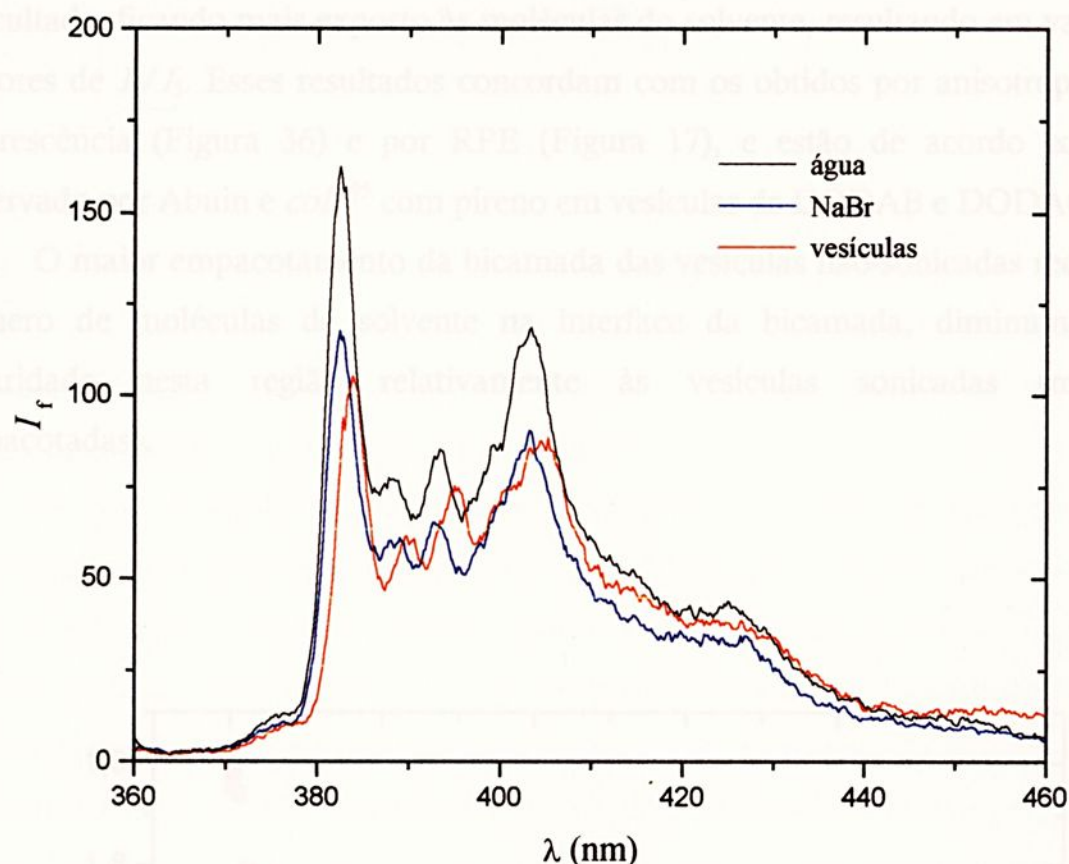


Figura 42: Espectros de emissão do pireno 10^{-6} M em água, NaBr e vesículas sonicadas de DODAB 0,9 mM (25 °C).

Nossas medidas de anisotropia de fluorescência de *t*-Dpo em dispersões de DODAB indicam que as características termotrópicas das vesículas dependem do método de preparação. A Figura 43 mostra o efeito da concentração de DODAB na razão I_1/I_3 do Py 10^{-6} M a 25 °C. I_1/I_3 inicialmente diminui até atingir um patamar em $\approx 1,3$ e $1,5$ nas concentrações de DODAB $\approx 0,1$ e $0,6$ mM, para as dispersões sonicadas e não-sonicadas, respectivamente, sugerindo que o Py particiona mais no interior da bicamada das vesículas sonicadas do que das não-sonicadas, ou seja, os anfífilos nas vesículas sonicadas estão menos empacotados do que nas não-sonicadas, facilitando a incorporação do Py. Como a bicamada

das vesículas não-sonicadas é mais empacotada, a incorporação do Py é dificultada, ficando mais exposto às moléculas do solvente, resultando em valores maiores de I_1/I_3 . Esses resultados concordam com os obtidos por anisotropia de fluorescência (Figura 36) e por RPE (Figura 17), e estão de acordo com o observado por Abuin e cols.⁹⁵ com pireno em vesículas de DODAB e DODAC.

O maior empacotamento da bicamada das vesículas não-sonicadas reduz o número de moléculas de solvente na interface da bicamada, diminuindo a polaridade nesta região relativamente às vesículas sonicadas (menos empacotadas).

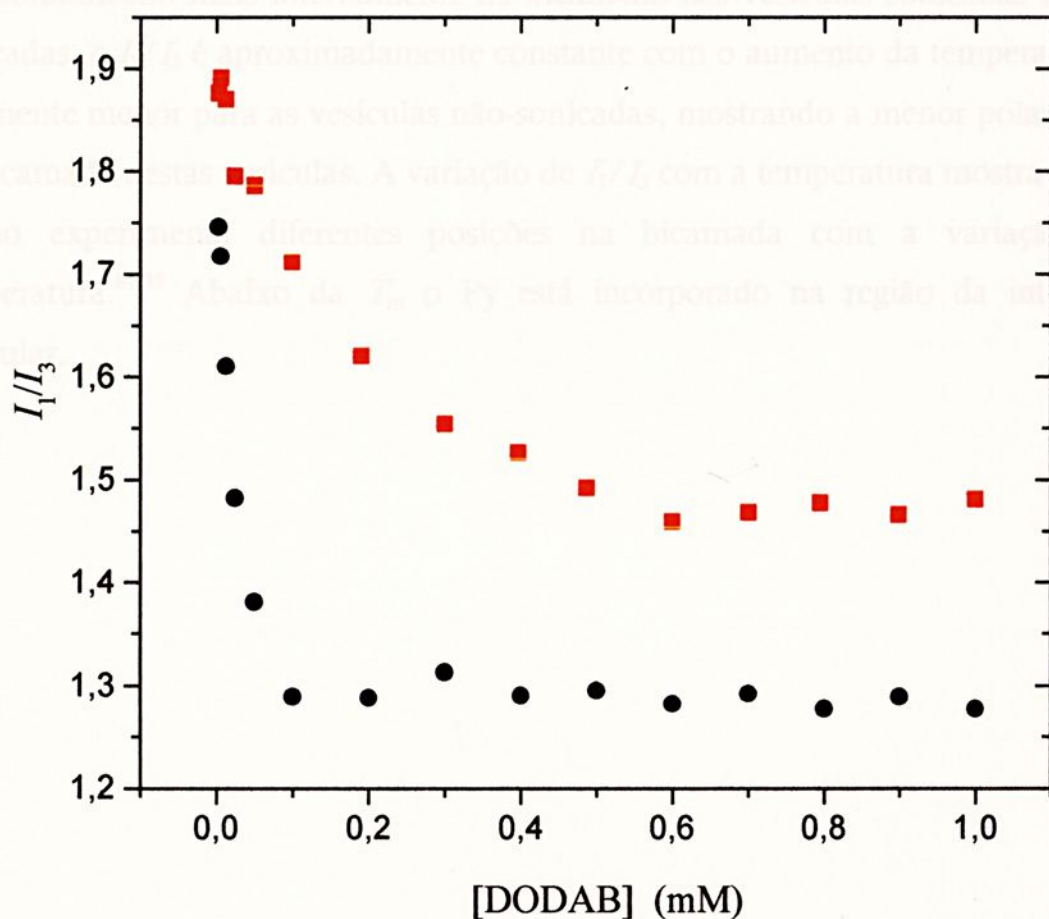


Figura 43: Razão (I_1/I_3) dos picos vibrônicos de emissão de fluorescência do pireno em vesículas sonicadas (●) e não-sonicada (■) de DODAB a 25 °C.

O efeito da temperatura na razão I_1/I_3 do Py 10^{-6} M é diferente para as dispersões sonicadas e não-sonicadas de DODAB, Figura 44. I_1/I_3 para as vesículas sonicadas diminui suavemente até atingir um patamar a ≈ 43 °C, indicando que a T_m é menos cooperativa do que para as vesículas não-sonicadas que exibem dois patamares, um acima e o outro abaixo da $T_m \cong 39$ °C. Dois fatores colaboram para a variação do comportamento termotrópicas das dispersões de DODAB: a) a presença de duas fases no estado gel das vesículas sonicadas, e b) a maior curvatura das vesículas sonicadas que resulta em uma menor pressão entre os anfifílicos da bicamada.⁵⁸

Nossos resultados de anisotropia de fluorescência mostram que acima da T_m a microviscosidade na bicamada de DODAB é aproximadamente a mesma para as vesículas sonicadas e não-sonicadas. Provavelmente, acima da T_m , o Py está solubilizado mais internamente na bicamada das vesículas sonicadas e não-sonicadas, e I_1/I_3 é aproximadamente constante com o aumento da temperatura e levemente menor para as vesículas não-sonicadas, mostrando a menor polaridade na bicamada destas vesículas. A variação de I_1/I_3 com a temperatura mostra que o pireno experimenta diferentes posições na bicamada com a variação da temperatura.^{81,95} Abaixo da T_m o Py está incorporado na região da interface vesicular.

III.1.7. Condutividade de Dispersões de DODAB

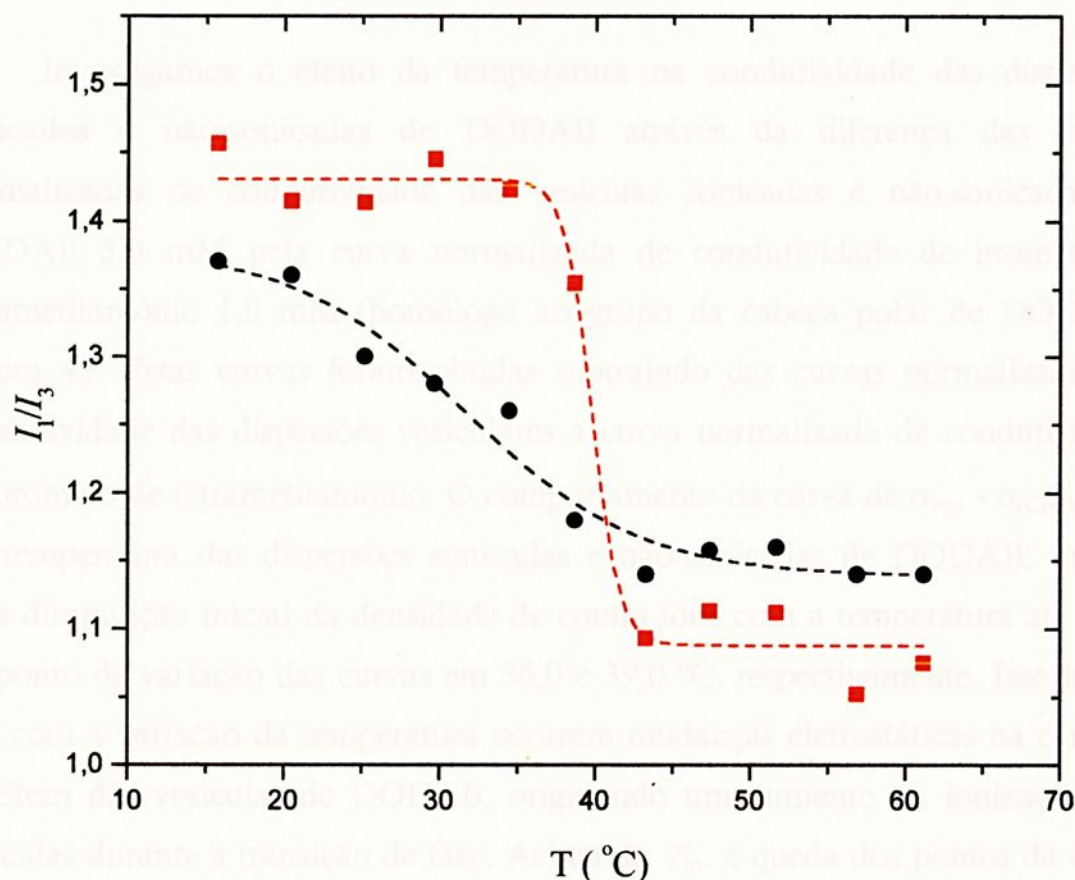


Figura 44: Efeito da temperatura na razão I_1/I_3 dos picos vibrônicos de emissão de fluorescência de Py 10^{-6} M em dispersão de vesículas sonicadas (●) e não-sonicada (■) de DODAB 0,5 mM. Adaptado da referência 54.

III.1.7. Condutividade de Dispersões de DODAB

Investigamos o efeito da temperatura na condutividade das dispersões sonicadas e não-sonicadas de DODAB através da diferença das curvas normalizadas de condutividade das vesículas sonicadas e não-sonicadas de DODAB 5,0 mM pela curva normalizada de condutividade de brometo de tetrametilamônio 1,0 mM (homólogo ao grupo da cabeça polar de DODAB), Figura 45. Estas curvas foram obtidas subtraindo das curvas normalizadas de condutividade das dispersões vesiculares a curva normalizada de condutividade do brometo de tetrametilamônio. O comportamento da curva de $\sigma_{\text{ves.}} - \sigma_{(\text{CH}_3)_4\text{N}^+\text{Br}^-}$ vs. temperatura das dispersões sonicadas e não-sonicadas de DODAB, mostra uma diminuição inicial da densidade de contra-íons com a temperatura até a T_m no ponto de variação das curvas em 36,0 e 39,0 °C, respectivamente. Isso indica que com a variação da temperatura ocorrem mudanças eletrostáticas na camada de Stern das vesículas de DODAB, originando um aumento na ionização das vesículas durante a transição de fase. Acima da T_m , a queda dos pontos da curva mostra um efeito contrário ao observado no estado gel, indicando uma diminuição na ionização da interface vesicular, provavelmente devido a uma tendência de acomodação das cargas na interface após a transição de fase. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho através das técnicas anisotropia de fluorescência, I_1/I_3 e RPE, mostrando o comportamento diferenciado existente na transição de fase de vesículas sonicadas e não-sonicadas de DODAB. Vale ressaltar que a importância destes resultados não está em obter o valor da T_m , mas observarmos o comportamento eletrônico na superfície vesicular durante a transição de fase.

III.2. EFEITO DA TEMPERATURA E DE SOLUTOS

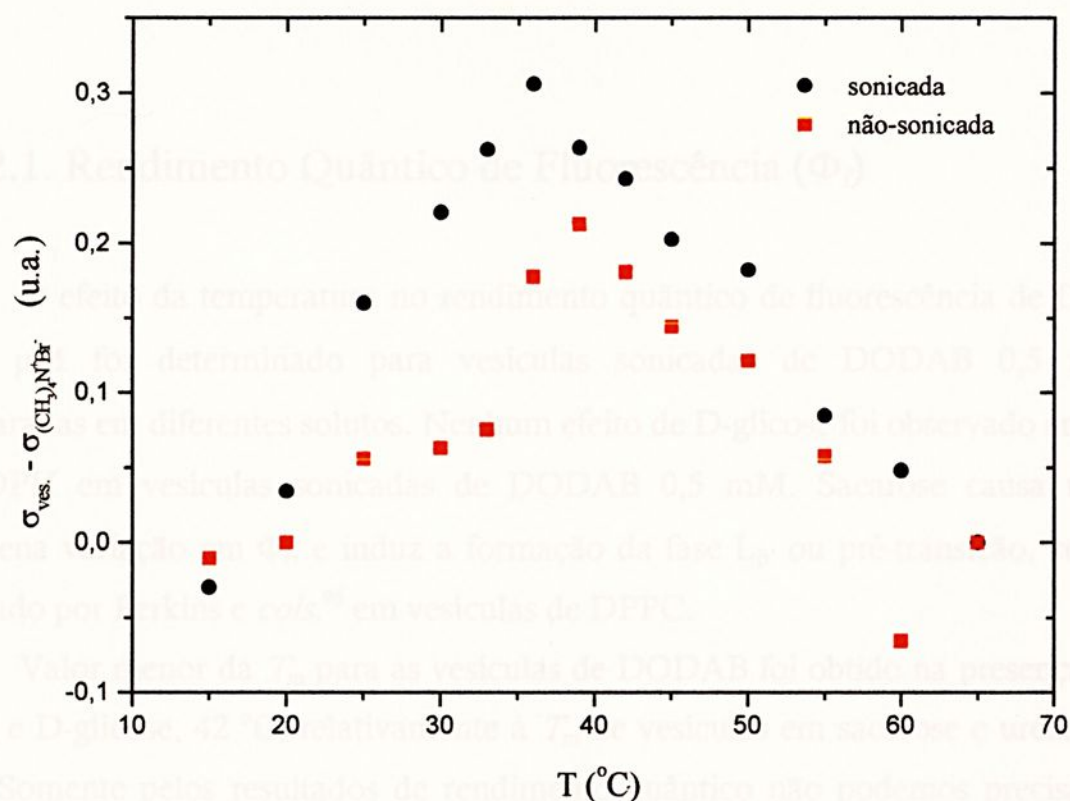


Figura 45: Efeito da temperatura na subtração da condutividade normalizada da dispersão sonicada (●) e não-sonicada (■) de DODAB 5,0 mM pela condutividade normalizada de brometo de tetrametilamônio ($(CH_3)_4N^+Br^-$) 1,0 mM.

III.2. EFEITO DA TEMPERATURA E DE SOLUTOS

III.2.1. Rendimento Quântico de Fluorescência (Φ_f)

O efeito da temperatura no rendimento quântico de fluorescência de DPH 2,22 μM foi determinado para vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em diferentes solutos. Nenhum efeito de D-glicose foi observado em Φ_f de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM. Sacarose causa uma pequena variação em Φ_f , e induz a formação da fase L_β , ou pré-transição, como relatado por Perkins e *cols.*⁹⁶ em vesículas de DPPC.

Valor menor da T_m para as vesículas de DODAB foi obtido na presença de água e D-glicose, 42 °C, relativamente à T_m de vesículas em sacarose e uréia (43 °C). Somente pelos resultados de rendimento quântico não podemos precisar o efeito dos solutos na bicamada vesicular, Figura 46.

Figura 46: Efeito da temperatura no rendimento quântico de fluorescência normalizado de DPH 2,22 μM em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em água e diferentes solutos a 0,4 M.

III 2.2. Anisotropia de Fluorescência (r)

DPH

Na Figura 47 vemos o efeito da temperatura na anisotropia de DPH e

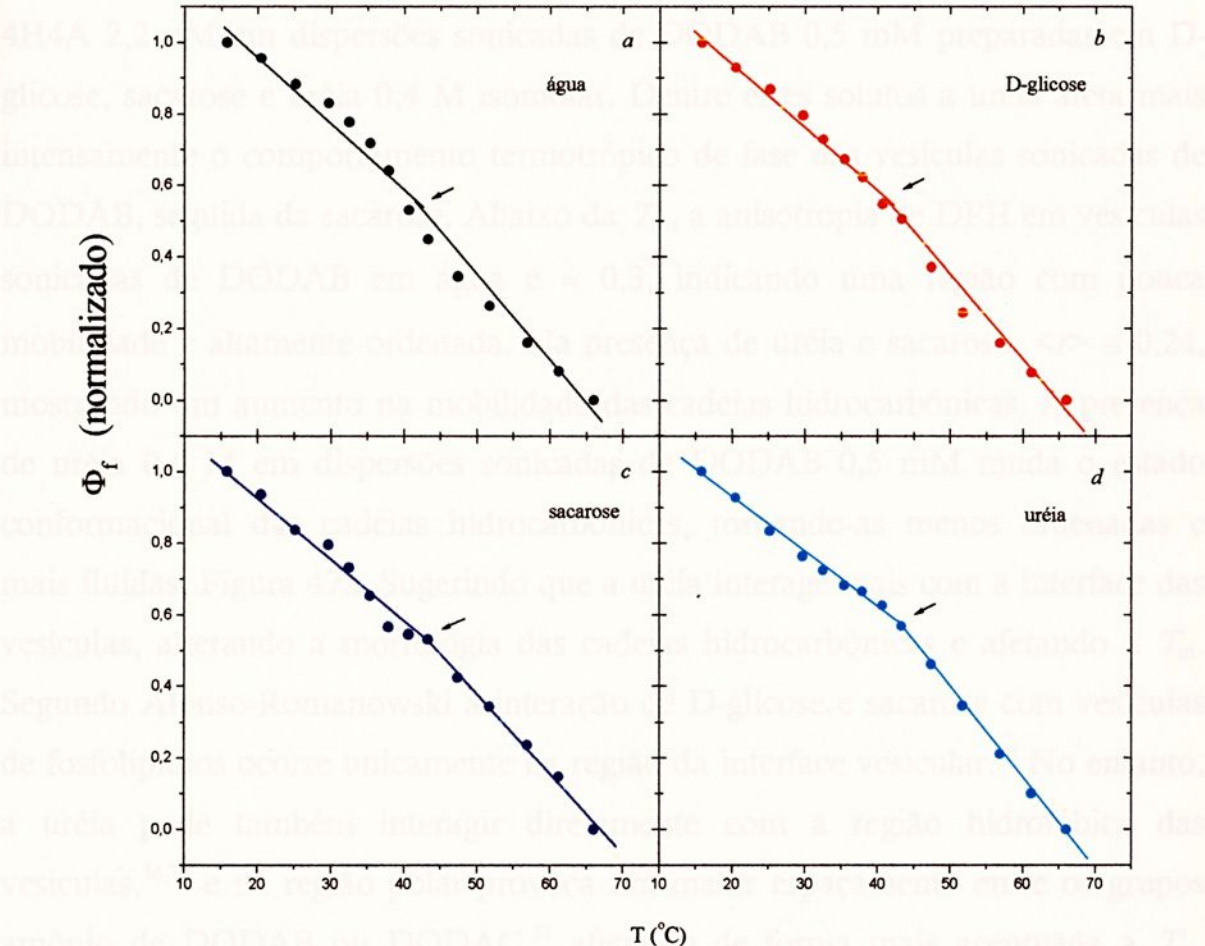


Figura 46: Efeito da temperatura no rendimento quântico de fluorescência normalizado de DPH 2,22 μM em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em água e diferentes solutos a 0,4 M.

$^{\circ}\text{C}$ relativo a DODAB em água pura ($T_m = 37,9^{\circ}\text{C}$). Na presença de sacarose 0,4 M, abaixo da T_m , a variação em r é aproximadamente a mesma do observado com a uréia, mas o efeito na T_m é menor ($T_m = 37,5^{\circ}\text{C}$). Ureia e sacarose 0,4 M causam maior perturbação na bicamada vesicular do que D-glicose que não afeta a microviscosidade da bicamada das vesículas sonificadas de DODAB 0,5 mM, sendo a variação de anisotropia com a temperatura semelhante ao de DODAB em água. Nas dispersões contendo a sacarose, a T_m na presença de D-glicose é de $38,3^{\circ}\text{C}$, 1°C

III.2.2. Anisotropia de Fluorescência (r)

DPH

Na Figura 47 vemos o efeito da temperatura na anisotropia de DPH e 4H4A 2,2 μ M em dispersões sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M isomolar. Dentre estes solutos a uréia afeta mais intensamente o comportamento termotrópico de fase das vesículas sonicadas de DODAB, seguida da sacarose. Abaixo da T_m , a anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB em água é $\approx 0,3$, indicando uma região com pouca mobilidade e altamente ordenada. Na presença de uréia e sacarose, $\langle r \rangle \approx 0,24$, mostrando um aumento na mobilidade das cadeias hidrocarbônicas. A presença de uréia 0,4 M em dispersões sonicadas de DODAB 0,5 mM muda o estado conformacional das cadeias hidrocarbônicas, tornando-as menos ordenadas e mais fluidas, Figura 47a. Sugerindo que a uréia interage mais com a interface das vesículas, alterando a morfologia das cadeias hidrocarbônicas e afetando a T_m . Segundo Alonso-Romanowski a interação de D-glicose e sacarose com vesículas de fosfolipídios ocorre unicamente na região da interface vesicular.⁷⁰ No entanto, a uréia pode também interagir diretamente com a região hidrofóbica das vesículas,^{36,70} e na região polar provoca um maior espaçamento entre os grupos amônio de DODAB ou DODAC,³⁷ afetando de forma mais acentuada a T_m . Efeito análogo foi observado nas vesículas de fosfolipídios.^{70,97} Simulações de mecânica estatística mostram que a uréia pode também interagir diretamente com grupos hidrofóbicos e com a interface dos agregados.^{98,99} A T_m de DODAB em dispersões sonicadas com uréia 0,4 M é de 35,2 °C, com uma diminuição de ≈ 3 °C relativo a DODAB em água pura ($T_m = 37,9$ °C). Na presença de sacarose 0,4 M, abaixo da T_m , a variação em $\langle r \rangle$ é aproximadamente a mesma do observado com a uréia, mas o efeito na T_m é menor ($T_m = 37,8$ °C). Uréia e sacarose 0,4 M causam maior perturbação na bicamada vesicular do que D-glicose que não afeta a microviscosidade da bicamada das vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM, sendo a variação da anisotropia com a temperatura semelhante ao de DODAB em água. Nas dispersões sonicadas, a T_m na presença de D-glicose é de 38,8 °C, 1°C

acima da T_m em água. Acima da T_m , no estado líquido-cristalino, as cadeias anfifílicas apresentam a mesma fluidez para todos os solutos. Esse resultado provém da desordem natural das caudas no estado líquido-cristalino que é pouco afetada pelo soluto na interface vesicular.

A anisotropia de fluorescência de 4H4A 2,2 μ M em vesículas sonicadas de DODAB indica que D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M isomolar altera muito pouco a conformação das cadeias na região mais próxima da interface vesicular, no estado gel das vesículas sonicadas de DODAB, Figura 47b. A variação da T_m de DODAB obtida por anisotropia de 4H4A em vesículas sonicadas é similar à observada por DPH. Dentro do erro experimental, a T_m de DODAB (sonicada) é a mesma para D-glicose e sacarose, mas diminui para a uréia 0,4 M (Tabela 6).

Tabela 6: T_m de vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em diferentes solutos. Valores obtidos da Figura 48.

solutos (0,4 M)	T_m (°C)	
	DPH	4H4A
sem soluto	37,9	38,1
D-glicose	38,8	38,1
sacarose	37,8	38,9
uréia	35,2	36,5

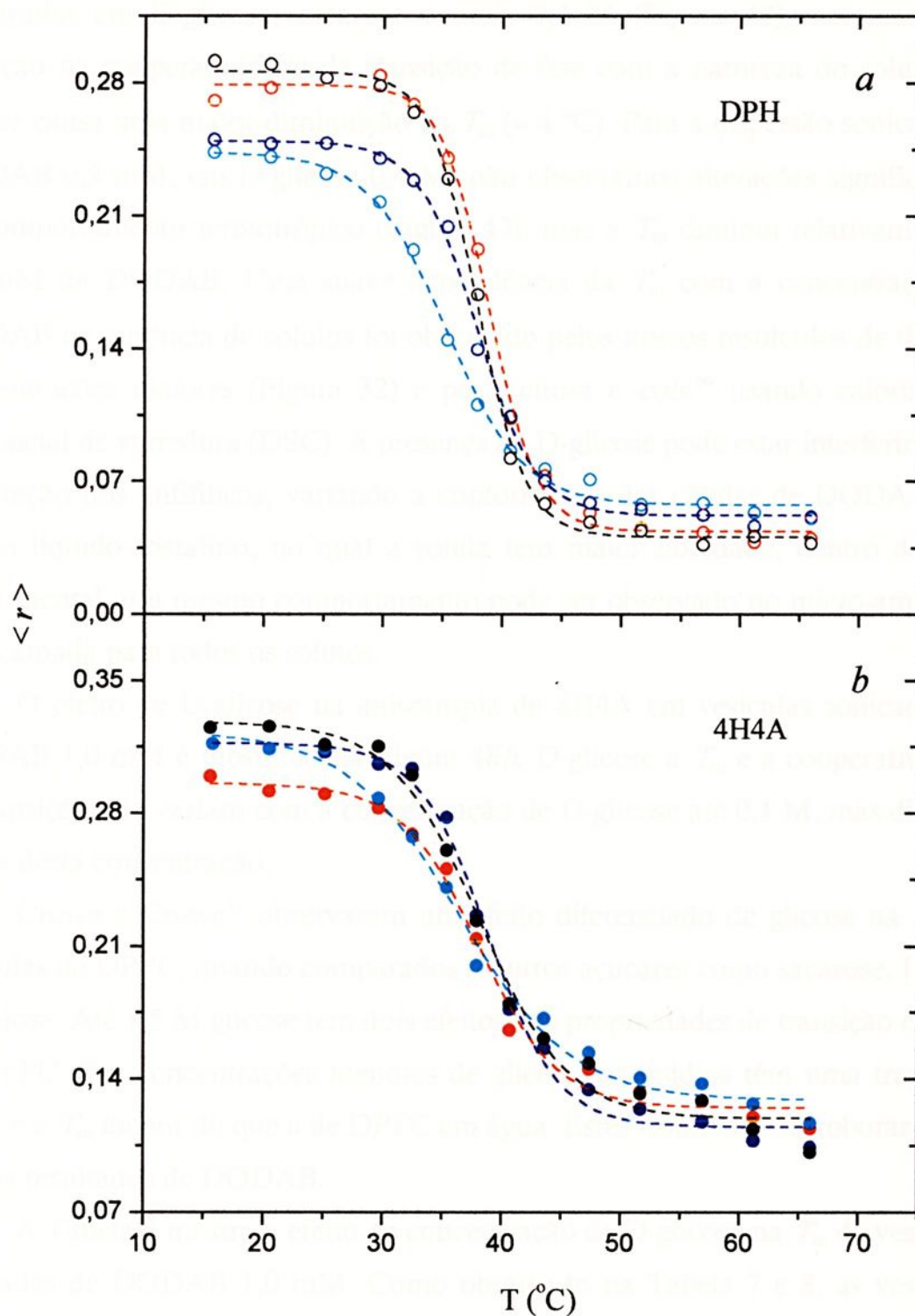


Figura 47: Efeito da temperatura na anisotropia de (a) DPH e (b) 4H4A em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM preparadas em (preto) água, (vermelho) D-glicose, (azul escuro) sacarose e (azul claro) uréia 0,4 M.

Da anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM preparadas em D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M (Figura 48), notamos uma variação na cooperatividade da transição de fase com a natureza do soluto. D-glicose causa uma maior diminuição na T_m ($\approx 4^\circ\text{C}$). Para a dispersão sonicada de DODAB 0,5 mM, em D-glicose 0,4 M, não observamos alterações significativas no comportamento termotrópico (Figura 47), mas a T_m diminui relativamente a 1,0 mM de DODAB. Uma suave dependência da T_m com a concentração de DODAB na ausência de solutos foi observado pelos nossos resultados de Φ_f para concentrações maiores (Figura 32) e por Feitosa e cols.⁶⁶ usando calorimetria diferencial de varredura (DSC). A presença de D-glicose pode estar interferindo na solvatação dos anfifílicos, variando a conformação das caudas de DODAB. No estado líquido-cristalino, no qual a sonda tem maior liberdade, dentro do erro experimental, um mesmo comportamento pode ser observado no micro-ambiente da bicamada para todos os solutos.

O efeito de D-glicose na anisotropia de 4H4A em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM é mostrado na Figura 48b. D-glicose a T_m e a cooperatividade da transição não variam com a concentração de D-glicose até 0,1 M, mas diminui acima desta concentração.

Crowe e Crowe⁷¹ observaram um efeito diferenciado de glicose na T_m de vesículas de DPPC, quando comparados a outros açúcares como sacarose, frutose e trealose. Até 1,5 M glicose tem dois efeitos nas propriedades de transição de fase de DPPC. Em concentrações menores de glicose, os lipídios têm uma transição suave e a T_m menor do que a de DPPC em água. Estes resultados corroboram com nossos resultados de DODAB.

A Tabela 8 mostra o efeito da concentração de D-glicose na T_m de vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM. Como observado na Tabela 7 e 8, as vesículas sonicadas de DODAB 0,5 e 1,0 mM preparadas em água, sacarose e uréia, apresentam a mesma variação nos valores da T_m , exceto D-glicose que diminui a T_m de DODAB 1,0 mM. Para concentrações de D-glicose maiores do que 0,1 M em DODAB 1,0 mM, observamos uma leve dependência da T_m com a concentração de D-glicose.

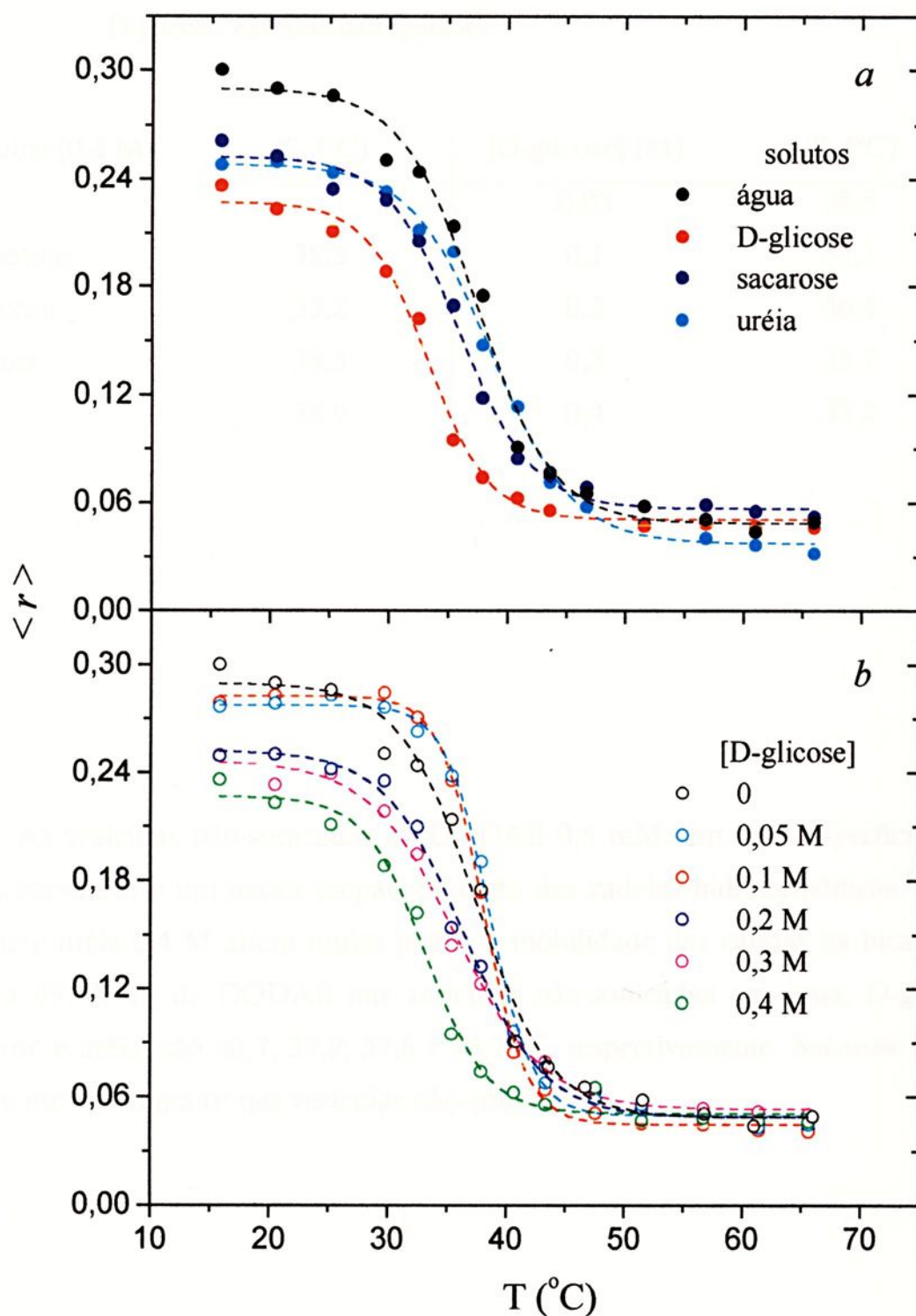


Figura 48: Efeito da temperatura na anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM, (a) preparadas em água e diferentes solutos 0,4 M e (b) diferentes concentrações de D-glicose.

Tabela 7: T_m obtida por anisotropia de DPH em vesículas sonicadas de DODAB 1,0 mM, preparadas em diferentes solutos e diferentes concentrações de D-glicose, extraída da Figura 49.

Solutos (0,4 M)	T_m (°C)	[D-glicose] (M)	T_m (°C)
		0,05	38,5
sem soluto	38,3	0,1	37,1
D-glicose	33,2	0,2	36,4
sacarose	38,5	0,3	35,7
uréia	35,9	0,4	33,2

As vesículas não-sonicadas de DODAB 0,5 mM têm uma superfície com baixa curvatura e um maior empacotamento das cadeias hidrocarbônicas.^{58,61} D-glicose e uréia 0,4 M altera muito pouco a mobilidade das caudas na bicamada, Figura 49. A T_m de DODAB nas vesículas não-sonicadas em água, D-glicose, sacarose e uréia, são 40,7; 39,9; 37,8 e 40,7 °C, respectivamente. Sacarose 0,4 M exerce um efeito maior nas vesículas não-sonicadas.

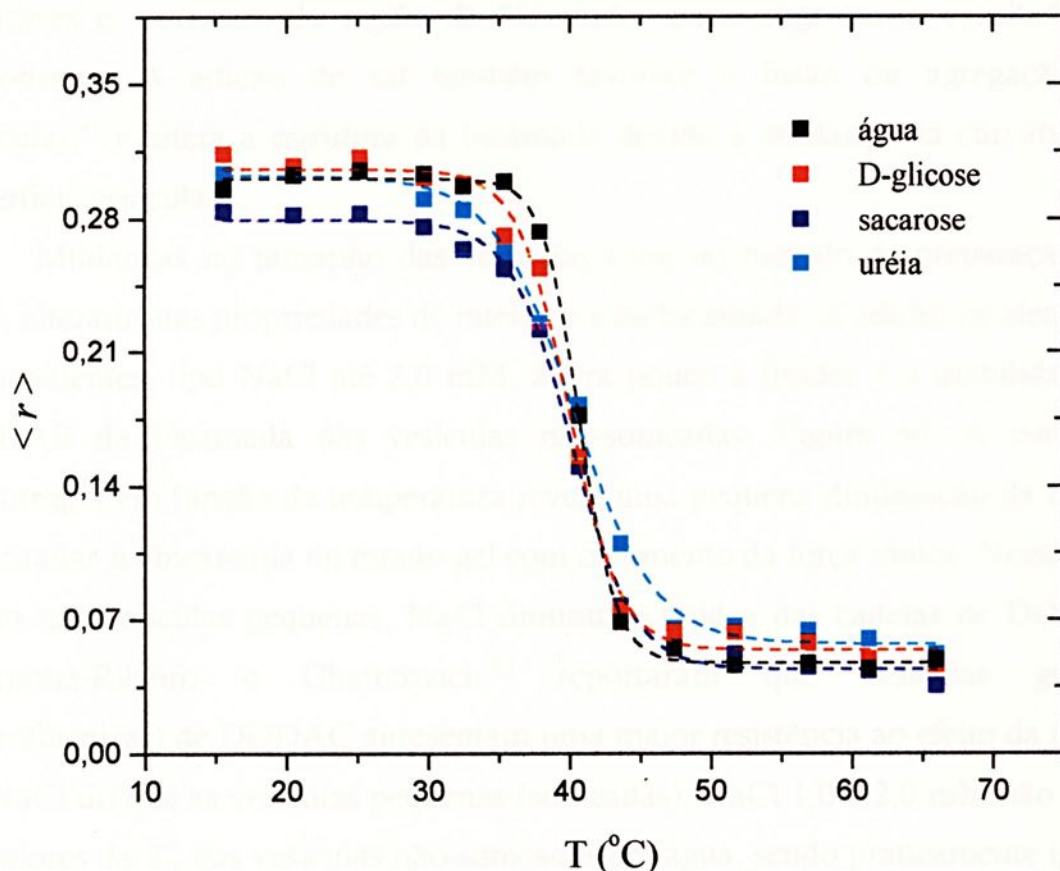


Figura 49: Efeito da temperatura na anisotropia de DPH, em vesículas não-sonicadas de DODAB 0,5 mM, preparadas em água e 0,4 M de diferentes solutos.

NaCl tem um grande efeito nas interações inter e intra-vesiculares. Em vesículas sonicadas de DODAB 0,5 mM, abaixo da T_m , a mobilidade da sonda aumenta com a concentração de NaCl 0,5, 1,0 e 2,0 mM (Figura 50), mas permanece constante acima da T_m . Na presença de NaCl 0,5 e 1,0 mM, a rigidez da bicamada diminui, ocasionando uma queda de 1,5 °C na T_m ($= 36,4$ °C) com relação à T_m das vesículas em água; na presença de NaCl 2,0 mM, abaixo da T_m , a bicamada é ainda mais fluida no estado gel. Nesta concentração de sal a $T_m = 35,8$ °C, 2 °C abaixo da observada para a dispersão sonicada em água. Acima da T_m a sonda experimenta uma alta mobilidade.

Medidas de anisotropia sozinhas não nos permite descever a região externa da bicamada. Sabemos que em presença de sal há um acúmulo de contra-íons

próximo das superfícies vesiculares que contribui para mudar as propriedades das interfaces e, portanto, da região da bicamada, como sugerem os resultados de anisotropia. A adição de sal também favorece a fusão ou agregação das vesículas,⁶¹ e altera a estrutura da bicamada devido à mudança na curvatura da superfície vesicular.

Mudanças no tamanho das vesículas e/ou no método de preparação, em geral, alteram suas propriedades de interface e da bicamada. A adição de eletrólitos monovalentes, tipo NaCl até 2,0 mM, altera pouco a fluidez e a mobilidade de DODAB da bicamada das vesículas não-sonicadas, Figura 50. A curva de anisotropia em função da temperatura revela uma pequena diminuição da rigidez das caudas na bicamada no estado gel com o aumento da força iônica. Nesse caso, como nas vesículas pequenas, NaCl diminui a rigidez das cadeias de DODAB. Carmona-Ribeiro e Chaimovich,⁶¹ reportaram que vesículas grandes (clorofórmicas) de DODAC apresentam uma maior resistência ao efeito da adição de NaCl do que as vesículas pequenas (sonicadas). NaCl 1,0 e 2,0 mM não altera os valores da T_m das vesículas não-sonicadas em água, sendo praticamente igual a 40,7 °C, estranhamente uma queda mais acentuada no valor da T_m foi observado para NaCl 0,5 mM, com T_m igual a 36,7 °C. Neste caso, a diminuição da T_m não implica na diminuição na cooperatividade da transição. Cuccovia e cols.²¹ mostraram que as vesículas maiores de DODAB e DODAC estão mais blindadas do que as menores, o que corrobora os nossos resultados de anisotropia, nos quais as vesículas não-sonicadas de DODAB sofre um menor efeito de NaCl, pois estão mais blindadas.

A fusão de vesículas sonicadas de DODAB induzida por Na₂SO₄ foi observada por Guillame e cols.,⁶⁹ formando vesículas com maior curvatura. Resultados de anisotropia de 4H4A 2,2 μM, que monitora a região mais próxima da interface da bicamada, mostram um aumento da T_m de vesículas sonicadas e não-sonicadas de DODAB 0,5 mM na presença de NaCl 0,5 mM isoosmolar (T_m = 40,5 e 41,9 °C, respectivamente), indicando que o aumento da força iônica diminui a mobilidade próximo da interface, provavelmente provocada pela menor distância entre as cabeças polares dos anfifílicos causada pelo efeito de blindagem eletrostática, Figura 51.

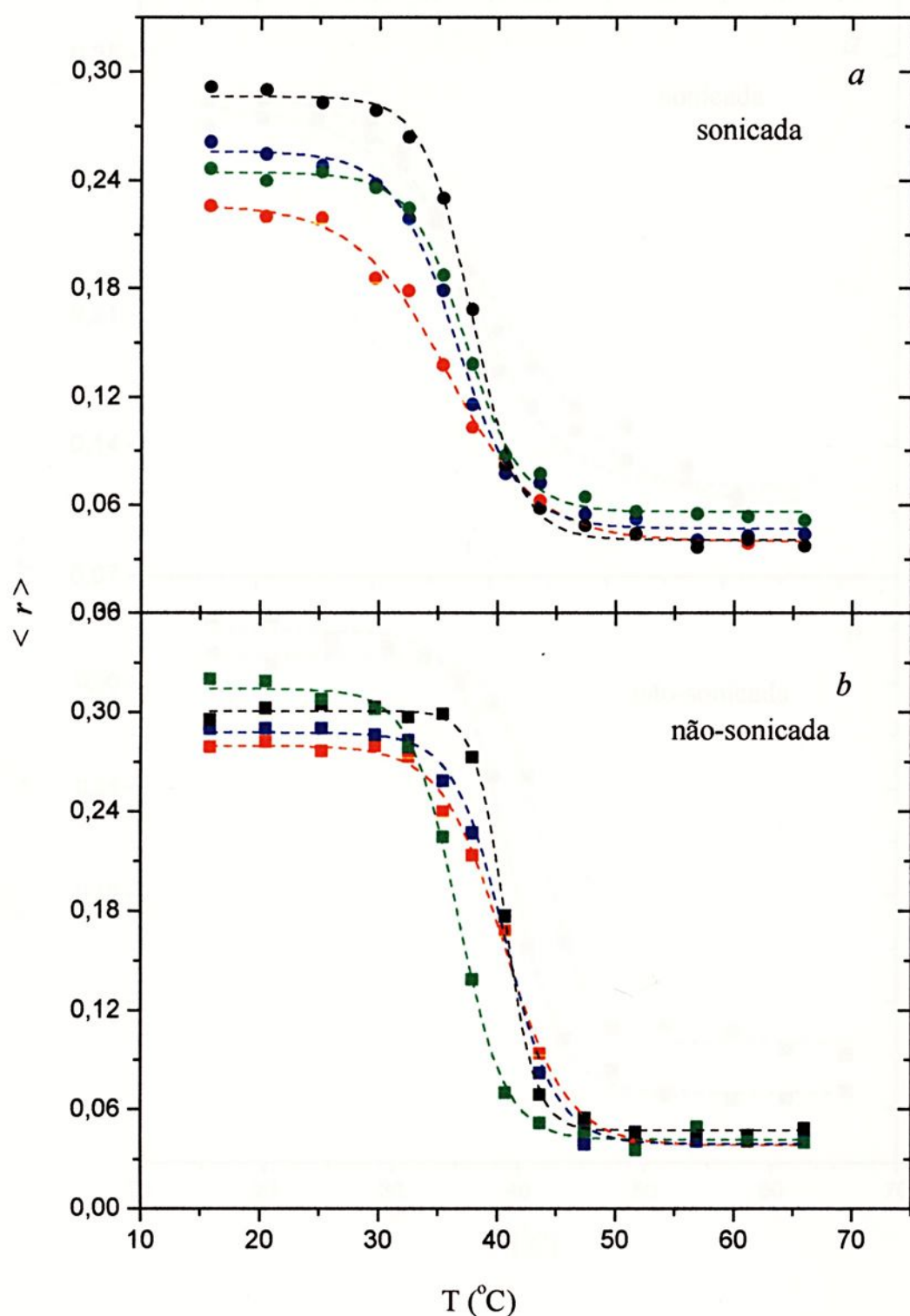


Figura 50: Efeito da temperatura na anisotropia de DPH em vesículas sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB 0,5 mM, preparadas em água (●), 0,5 (●), 1,0 (●) e 2,0 mM (●) de NaCl.



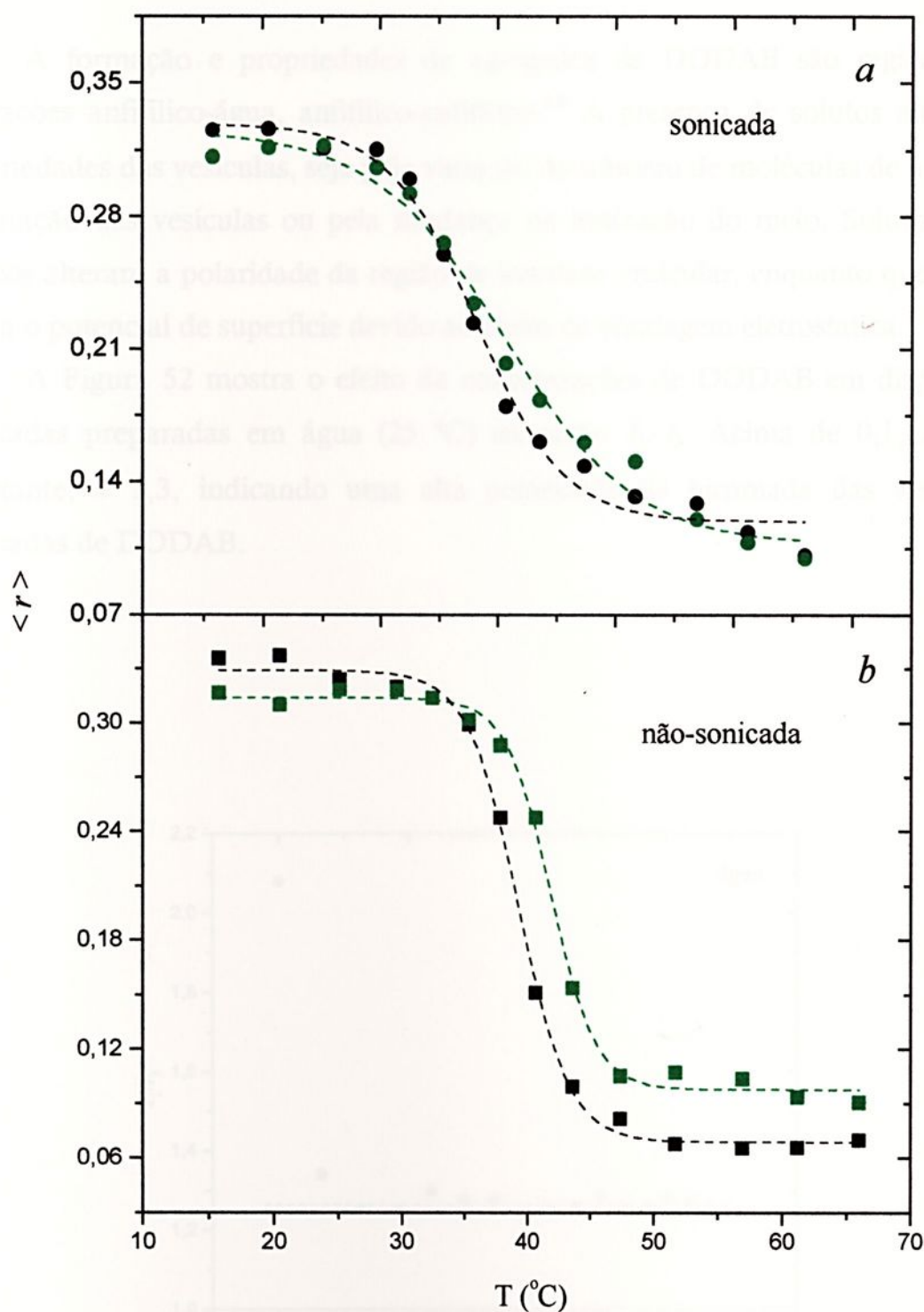


Figura 51: Efeito da temperatura na anisotropia de 4H4A em vesículas sonicadas (a) e não-sonicadas (b) de DODAB 0,5 mM, preparadas em água (●) e NaCl 0,5 mM (■).

III.2.3. Efeito de Solutos na Solubilização de Pireno

A formação e propriedades de agregados de DODAB são regidas por interações anfifílico-água, anfifílico-anfifílico.⁶⁻⁸ A presença de solutos altera as propriedades das vesículas, seja pela variação do número de moléculas de água de hidratação das vesículas ou pela mudança na ionização do meio. Solutos não-iônicos alteram a polaridade da região de interface vesicular, enquanto que NaCl muda o potencial de superfície devido ao efeito de blindagem eletrostática.⁷

A Figura 52 mostra o efeito da concentrações de DODAB em dispersões sonicadas preparadas em água (25 °C) na razão I_1/I_3 . Acima de 0,1, I_1/I_3 é constante, $\approx 1,3$, indicando uma alta polaridade da bicamada das vesículas sonicadas de DODAB.

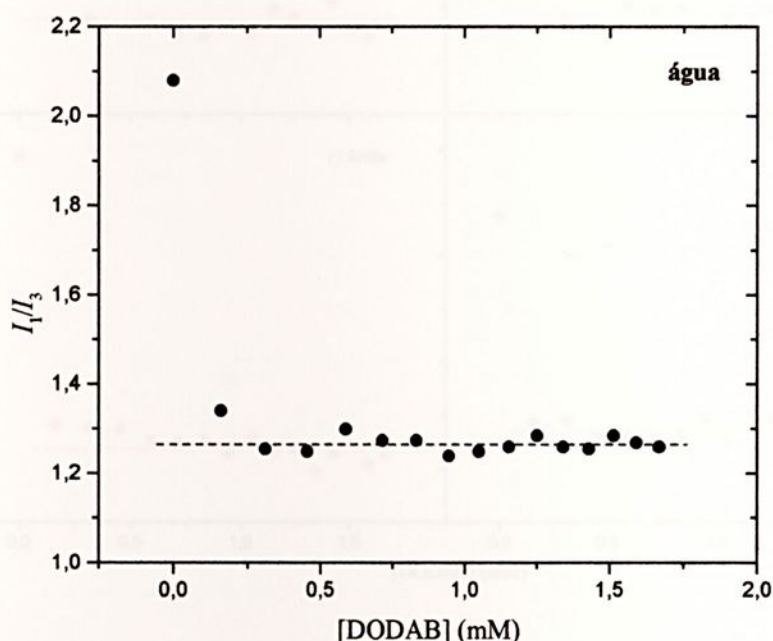


Figura 52: Efeito da concentração de DODAB na razão I_1/I_3 dos picos vibrônicos de emissão do pireno 10^{-6} M em dispersão sonicada em água, a 25 °C.

O efeito da concentração de DODAB na razão I_1/I_3 em dispersões sonicadas foi também investigado para as vesículas preparadas em D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M e NaCl 2,0 mM, Figura 53. Nenhuma variação acentuada ocorre na razão I_1/I_3 em vesículas sonicadas em presença destes solutos, mostrando que 0,4 M de solutos não-iônicos e até 2,0 mM de NaCl não alteram a polaridade da bicamada.

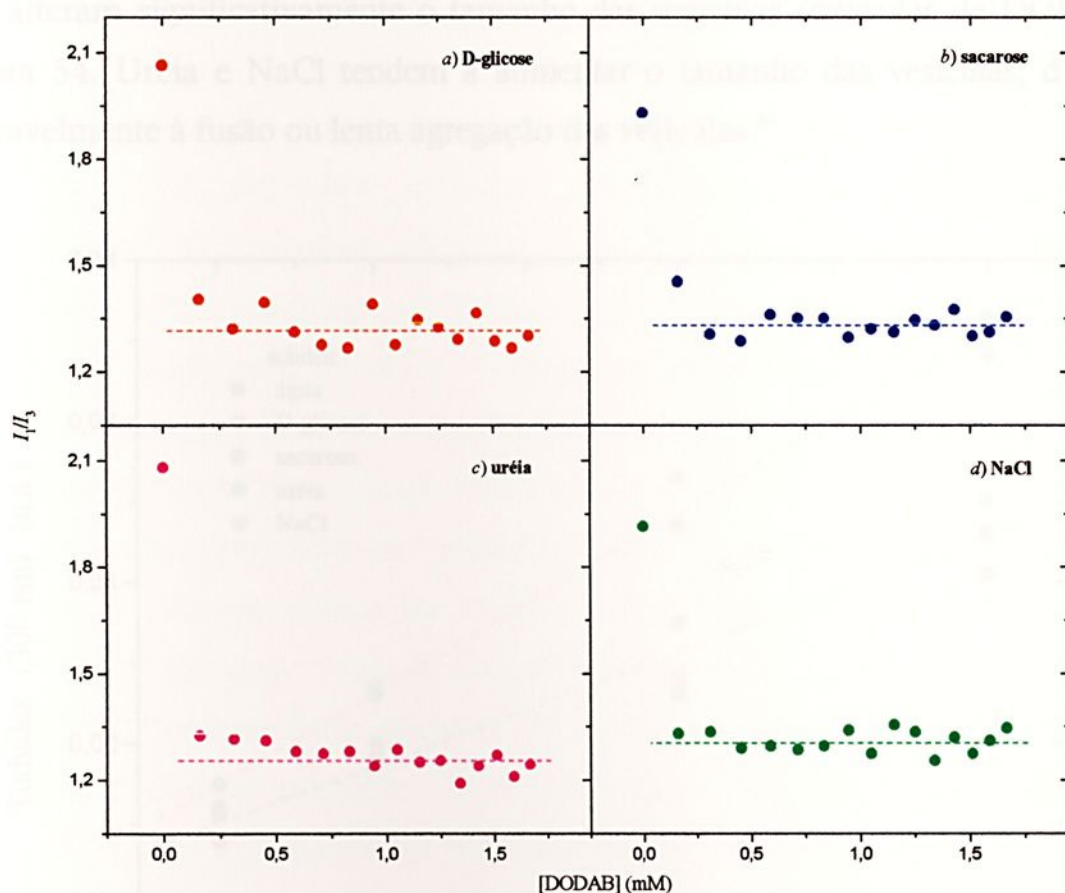


Figura 53: Efeito da concentração de DODAB na razão dos picos vibrônico de emissão de fluorescência I_1 e I_3 do pireno 10^{-6} M em dispersão sonicada em diferentes solutos não-iônicos 0,4 M e NaCl 2,0 mM, a 25 °C.

III.2.4. Turbidez

As medidas de anisotropia mostram que a presença de solutos alteram a mobilidade das cadeias hidrocarbônicas. Medidas de turbidez são usadas para estimar a variação do tamanho das vesículas. Investigamos por medidas de turbidez ($\lambda = 300$ nm) a variação do tamanho das vesículas sonicadas de DODAB preparadas em água e alguns solutos. Para cada série de medidas foi feita uma linha de base no aparelho com o solvente correspondente. A interação desses solutos com a bicamada das vesículas ocorre predominantemente na interface da bicamada, alterando ou não o tamanho vesicular. Em uma primeira aproximação, a turbidez é proporcional ao tamanho vesicular.^{37,70} D-glicose e sacarose 0,4 M não alteram significativamente o tamanho das vesículas sonicadas de DODAB, Figura 54. Uréia e NaCl tendem a aumentar o tamanho das vesículas, devido provavelmente à fusão ou lenta agregação das vesículas.⁶¹

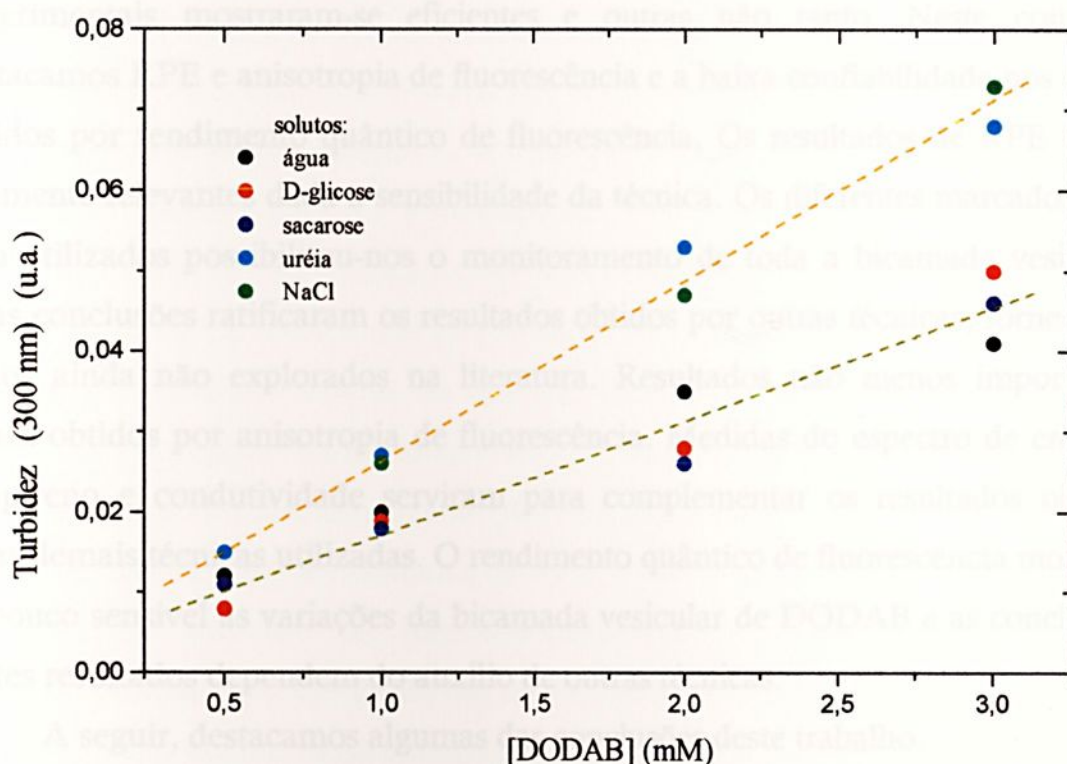


Figura 54: Efeito da concentração de DODAB na turbidez de vesículas sonicadas de DODAB, preparadas em água, D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M e NaCl 2,0 mM (25 °C).

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

IV.1 Considerações Finais

No estudo das propriedades termotrópicas das dispersões de DODAB preparadas por diferentes métodos, observamos que algumas técnicas experimentais mostraram-se eficientes e outras não tanto. Neste contexto, destacamos RPE e anisotropia de fluorescência e a baixa confiabilidade nos dados obtidos por rendimento quântico de fluorescência. Os resultados de RPE foram altamente relevantes dada a sensibilidade da técnica. Os diferentes marcadores de spin utilizados possibilitou-nos o monitoramento de toda a bicamada vesicular, cujas conclusões ratificaram os resultados obtidos por outras técnicas, fornecendo dados ainda não explorados na literatura. Resultados não menos importantes foram obtidos por anisotropia de fluorescência. Medidas do espectro de emissão do pireno e condutividade serviram para complementar os resultados obtidos pelas demais técnicas utilizadas. O rendimento quântico de fluorescência mostrou-se pouco sensível às variações da bicamada vesicular de DODAB e as conclusões destes resultados dependem do auxílio de outras técnicas.

A seguir, destacamos algumas das conclusões deste trabalho.

Os resultados de RPE mostraram que abaixo da T_m , as dispersões sonicadas de DODAB possuem duas populações de agregados, uma no estado gel e a outra no estado líquido-cristalino, e a dispersão não-sonicada exibe uma população mais uniforme no estado mais rígido (gel) e duas populações (gel, líquido-cristalino) na

região da T_m , sugerindo a presença da fase ondulada, L_β .⁵³

Os resultados de anisotropia de fluorescência indicam que a localização das sondas fluorescentes com duas e três duplas ligações conjugadas derivadas de *t*-Dpo, em vesículas de DODAB no estado gel tem a posição de solubilização na bicamada dependente da carga vesicular. A T_m diminui com o tamanho das vesículas, que diminui com os métodos de preparação de acordo com: não-sonicação > injeção > sonicação. Vários autores têm relacionado mudanças no empacotamento dos anfífilicos com o método de preparo ou curvatura vesicular.^{21,30b,58} Observamos que a cooperatividade da transição de fase e o empacotamento da bicamada tendem a aumentar com o tamanho das vesículas, enquanto que a polaridade da bicamada diminui com o aumento do tamanho.

Os dados enunciadas acima possibilitam-nos concluir que após a sonicação, existem duas formas nas quais os anfífilicos de DODAB se agregam: *a*) em vesículas esféricas co-existindo com bicamadas com alta curvatura ou fragmentos de vesículas,²³ em um estado líquido-cristalino ou *b*) vesículas em forma de lentes,¹⁷ onde, abaixo da T_m , os anfífilicos na região central estão no estado gel e os das bordas, com alta curvatura, na fase líquido-cristalina.

No estado gel, a presença de solutos não iônicos como D-glicose, sacarose e uréia 0,4 M altera a ordem e a mobilidade da bicamada vesicular, o mesmo não ocorre no estado líquido-cristalino, devido a desordem natural dos anfífilicos neste estado. O efeito de solutos nas propriedades termotrópicas de DODAB é menor nas dispersões não-sonicadas do que nas sonicadas, provavelmente devido ao estado mais compacto da bicamada das vesículas não-sonicadas, permitindo uma menor interação do soluto com a interface da bicamada.

De acordo com os resultados de RPE, a mudança do contra-íon Br^- para Cl^- na dispersão sonicada de dioctadecildimentilamônio não altera de forma acentuada o estado de agregação das dispersões sonicadas.

A tabela abaixo mostra os valores da T_m de vesículas de DODAB em água preparadas por diferentes métodos, obtidas neste trabalho. Desconsiderando os valores obtidos por rendimento quântico, que apresentam baixa confiabilidade, obtemos valores médios de T_m iguais a 38, 39 e 40 °C, para as vesículas sonicadas, injetadas e não-sonicadas de DODAB, respectivamente. Estas médias mostram

que os nossos valores de T_m das dispersões de DODAB, obtidos por diferentes técnicas, não apresentam discrepância e ratificam a tendência da T_m aumentar com o tamanho das vesículas.

Tabela 8: Valores de T_m de DODAB em água obtidos neste trabalho por várias técnicas e métodos de preparo das vesículas.

Método de Preparação	T_m (°C)	Metodologia
sonicação	39,0	RPE
	43	rendimento quântico
	44	idem
	37,3	anisotropia de fluorescência
	35,3	idem
	38,1	idem
	39,8	idem
	36	condutividade
injeção/ CHCl_3	46	rendimento quântico
	42	idem
	38,3	anisotropia de fluorescência
	38,2	idem
	40,8	idem
	38,3	idem
não-sonicação	42,7	RPE
	47	rendimento quântico
	42	idem
	40,7	anisotropia de fluorescência
	39,1	idem
	39,3	idem
	40,3	idem
	39,0	pireno
	39	condutividade

IV.2 Trabalhos Futuros

Nossa tentativa de um maior entendimento das propriedades termotrópicas das vesículas de DODAB preparadas por diferentes métodos abriu novas perspectivas de debates servindo de base para que novos estudos possam ser feitos. Alguns pontos de nosso estudo, no entanto, devem ainda ser melhor esclarecidos.

O estudo das estruturas das vesículas de DODAB pode ser aprofundado, por RPE, DSC e espalhamento de luz. Alguns resultados dão indício da formação de multilamelas na estrutura não-sonicada. De fato, E. Feitosa em seus estudos com este método de preparo, com resultados ainda não publicados, tem observado a formação de estruturas unilamelares a baixas concentrações de DODAB (abaixo de $\approx 2,0$ mM) e estruturas multilamelares para concentrações maiores. São vários os fatores que contribuem para a transição de fase e um maior entendimento da contribuição de cada um dos fatores ainda é passível de estudo.

O efeito de solutos nas propriedades de vesículas ainda não está bem esclarecido. Pretendemos ainda esclarecer por que D-glicose provoca uma mudança tão abrupta na T_m de DODAB 1,0 mM, e usar outras técnicas para melhor elucidar o efeito de solutos nos sistemas anfifílicos.

Apesar das dificuldades naturais existentes no estudo das propriedades termotrópicas das vesículas de DODAB, encerramos nosso trabalho com a expectativa de missão cumprida, porém, com um vasto campo ainda a ser explorado.



CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. E. Gorter, F. Grendel, On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood, *J. Exp. Med.* 1925, 41, 439-443.
2. J. F. Danielli, H. A. Davison, A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.* 1935, 5, 495-508.
3. S. J. Singer, G. L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 1972, 175, 720-731.
4. a) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, Difusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 1965, 13, 238-252; b) A. D. Bangham, Membrane models with phospholipids, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1968, 18, 31-96.
5. a) T. Kunitake, Y. Okahata, K. Tamaki, F. Kumamaru, M. Takayanagi, Formation of the bilayer membrane from a series of quaternary ammonium salts, *Chem. Letters.* 1977, 387-390; b) T. Kunitake, Y. Okahata, Totally synthetic bilayer membrane, *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 3860-3861.
6. C. Tanford The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes 2^a ed., Krieger Publishing Company, Malabar, 1991, p. 5.
7. J. Israelachvili Intermolecular & Surface Forces, 2^a ed., Academic Press, Londres, 1992.
8. R. M. Epand, Lipid Polymorphysm and Membrane Properties: current topics in membranes, vol. 44, Academic Press, San Diego, 1997.
9. M. R. Jafari, A. B. Jones, A. H. Hikal, J. S. Williamson, C. M. Wyandt,



- Characterization of drug release from liposomal formulations in ocular fluid, *Drug. Delivery* 1998, 5, 227-238
10. J. H. Fendler, Biomimetic Membrane Chemistry, Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1982.
11. L. M. S. Martins, E. M. Mamizuka, A. M. Carmona-Ribeiro, Cationic vesicles as bactericides, *Langmuir* 1997, 13, 5583-5587.
12. D. D. Lasic, Liposomes, *La Recherche* 1989, 20, 904-913.
13. F. M. P. Wong, D. L. Reimer, M. B. Bally, Cationic lipid binding to DNA: characterization of complex formation, *Biochemistry* 1995, 34, 12877-12883.
14. E. Jungermann, Cationic Surfactants, vol.4, Marcell Dekker Inc., Nova Iorque, 1970.
15. D. Attwood, A. T. Florence, Surfactant Systems *Their chemistry, pharmacy and biology*, Chapman and Hall, Londres, 1985.
16. G. L. Jendrasiak, The hydration of phospholipids and its biological significance, *J. Nutr. Biochem.* 1996, 7, 599-609.
17. M. Andersson, L. Hammarström, K. Edwards, Effect of bilayer phase transition on vesicle structure and its influence on the kinetics of viologen reduction, *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 14531-14538.
18. K. Kano, A. Romero, B. Djermouni, H. J. Ache, J. H. Fendler, Characterization of surfactant vesicles as membrane mimetic agents. 2. Temperature-dependent changes of the turbidity, viscosity, fluorescence polarization of 2-methylanthracene, and positron annihilation in sonicated dioctadecyldimethylammonium chloride, *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 4030-4037.
19. U. Herrmann, J. H. Fendler, Low-angle laser-light scattering and photon-correlation spectroscopy in surfactant vesicles, *Chem. Phys. Letters* 1979, 64, 270-274.
20. R. A. Mortara, F. H. Quina, H. Chaimovich, Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester. Preparation and some properties of vesicles of dihexadecyl phosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978, 81, 1080-1086.
21. I. M. Cuccovia, E. Feitosa, H. Chaimovich, L. Scpulveda, W. Rced, Size,

- electrophoretic mobility, and ion dissociation of vesicles prepared with synthetic amphiphiles, *J. Phys. Chem.* 1990, *94*, 3722-3725.
22. C. R. Benatti Dissertação de Mestrado, Propriedades físico-químicas de vesículas unilamelares obtidas por sonicação a banho, IBILCE – UNESP, S. J. do Rio Preto, 1996.
23. E. Feitosa, Wyn Brown, Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide, *Langmuir* 1997, *13*, 4810-4816.
24. A. M. Carmona-Ribeiro, L. S. Yoshida, A. Sesso, H. Chaimovich, Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles, *J. Coll. Int. Science* 1984, *100*, 433-443.
25. I. C. Cuccovia, A. Sesso, E. B. Abuin, P. F. Okino, P. G. Tavares, J. F. S. Campos, F. H. Florenzano, H. Chaimovich, Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection, *J. Mol. Liquids* 1997, *72*, 323-336.
26. D. G. Hunter, B. J. Frisken, Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles, *Biophys. J.* 1998, *74*, 2996-3002.
27. T. F. Svitova, Y. P. Smirnova, S. A. Pisarev, N. A. Berezina, Self-assembly in double-tailed surfactants in dilute aqueous solutions, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 1995, *98*, 107-115.
28. D. Lichtenberg, E. Freire, C. F. Schmidt, Y. Barenholz, P. L. Felgner, T. E. Thompson, Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar, *Biochemistry* 1981, *20*, 3462-3467.
29. D. Yogev, B. C. R. Guillaume, J. H. Fendler, Sulfate-ion-induced slow fusion of dioctadecyldimethylammonium bromide vesicles, *Langmuir* 1991, *7*, 623-626.
30. a) A. M. Carmona-Ribeiro, C. E. Castuma, A. Sesso, S. Scheirer, Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions, *J. Phys. Chem.* 1991, *95*, 5362-5566; b) A. M. Carmona-Ribeiro, Synthetic amphiphile vesicles, *Chem. Soc. Rev.* 1992, *21*, 209-214.

31. M. Kodama, T. Kunitake, S. Seki, Thermal characterization of the mode of phase transition in the dioctadecyldimethylammonium bromide-water system in relation to the stability of its gel phase, *J. Phys. Chem.* 1990, *94*, 1550-1554.
32. A. M. Carmona-Ribeiro, S. Hix, pH effects on properties of dihexadecyl phosphate vesicles, *J. Phys. Chem.* 1991, *95*, 1812-1817.
33. J. Wilschut, J. Scholma, S. J. Eastman, M. J. Hope, P. R. Cullis, Ca^{2+} -induced fusion of phospholipid vesicles containing free fatty acids: modulation by transmembrane pH gradients, *Biochemistry* 1992, *31*, 2629-2636.
34. M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, A. Kacperska, Vesicle-surfactant interactions: effects of added surfactants on the gel to liquid-crystal transition for two vesicular systems, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1995, *91*, 4275-4278.
35. a) A. M. Carmona-Ribeiro, Theoretical and experimental stabilities of amphiphile vesicles in the presence of NaCl, *J. Phys. Chem.* 1989, *93*, 2630-2634; b) A. M. Carmona-Ribeiro, L. S. Yoshida, H. Chaimovich, Salts effects on the stability of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecyl phosphate vesicles, *J. Phys. Chem.* 1985, *89*, 2928-2933.
36. E. A. Disalvo, Optical properties of lipid dispersions induced by permittant molecules, *Chem. Phys. Lipids* 1991, *59*, 199-206.
37. S. M. B. Souza, H. Chaimovich, M. J. Politi, Effects of urea on dioctadecyldimethylammonium monolayers, *Langmuir* 1995, *11*, 1715-1719.
38. D. Bach, I. R. Miller, Hydration of phospholipid bilayers in the presence and absence of cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* 1998, *1368*, 216-224.
39. G. Strauss, H. Hauser, Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, *83*, 2422-2426.
40. K. A. Riske, M. J. Politi, Wayne F. Reed, M. T. Lamy-Freund, Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions, *Chem. Phys. Lipids* 1997, *89*, 31-44.
41. M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra, Differential scanning microcalorimetric study of sodium di-*n*-dodecylphosphate vesicles in aqueous solution, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1994, *90*, 1905-1907.

42. V. Luzzati, A. Tardieu, Lipid Phases – Structure and structural transition, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 1974, 25, 79-94.
43. P. R. Rand, D. Chapman, K. Larsson, Tilted hydrocarbon chains of dipalmitoyl lecithin become perpendicular to bilayer before melting, *Biophys. J.* 1975, 15, 1117-1124.
44. D. Marsh, Handbook of lipid bilayers, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
45. J. F. Nagle, D. A. Wilkinson, Lecithin bilayers, *Biophys. J.* 1978, 23, 159-175.
46. D. Lichtenberg, P. L. Felgner, T. E. Thompson, Transition of a liquid crystalline phosphatidylcholine bilayer to the gel phase in a vesicle reduces the internal aqueous volume, *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 277-281.
47. D. Needham, E. Evans, Structure and mechanical-properties of giant (DMPC) vesicle bilayers from 20°C below to 10°C above the liquid-crystal crystalline phase-transition at 24°C, *Biochemistry* 1988, 27, 8261-8269.
48. M. Köberl, H. J. Hinz, G. Rapp, Temperature scanning simultaneous small- and wide-angle X-ray scattering studies on glycolipid vesicles: areas, expansion coefficients and hydration, *Chem. Phys. Lipids* 1998, 91, 13-37.
49. L. A. Bagatolli, E. Gratton, Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.* 1999, 77, 2090-2101.
50. T. Heimburg, Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain transition from calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1415, 147-162.
51. D. F. Evans, H. Wennerström, The Colloidal Domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet, Wiley-VCH, Nova Iorque, 1994.
52. M. Caffrey, J. Hogan, LIPIDAT: A Database of Lipid Phase Transition Temperatures and Enthalpy Changes. DMPC Data Subset Analysis, *Chem. Phys. Lipids* 1992, 61, 1-109.
53. T. Heimburg, A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition, *Biophys. J.* 2000, 78, 1154-1165.
54. C. R. Benatti, M. J. Tiera, E. Feitosa, G. Olofsson, Phase behavior of synthetic amphiphile vesicles investigated by calorimetry and fluorescence methods, *Thermochimica Acta* 1999, 328, 137-142.



55. D. Lichtenberg, M. Menash, S. Donaldson, R. L. Biltonen, Thermodynamic characterization of the pretransition of unilamellar dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles, *Lipids* 1984, 19, 395-400.
56. H. W. Meyer, Pretransition-ripples in bilayers of dipalmitoylphosphatidyl choline-undulation or periodic segments – a freeze-fracture study, *Biochem. Biophys. Acta* 1996, 1302, 138-144.
57. M. Kodama, T. Miyata, Effect of the head group of phospholipids on the acyl-chain packing and structure of their assemblies as revealed by microcalorimetry and electron microscopy, *Colloids Surf. A* 1996, 109, 283-289.
58. T. Brumm, K. Jørgensen, O. G. Mouritsen, T. M. Bayerl, The effect of increasing membrane curvature on the phase transition and mixing behavior of a dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine/distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine lipid mixture as studied by fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biophys. J.* 1996, 70, 1373-1379.
59. R. R. C. New, *Liposomes: a practical approach*, Oxford University Press, New York, 1990.
60. M. Gugliotti, M. J. Politi, H. Chaimovich, Phase transition temperature of vesicles determined by surface tension measurements: a fast method, *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 198, 1-5.
61. A. M. Carmona-Ribiero, H. Chaimovich, Salt-induced aggregation and fusion of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecylphosphate, *Biophys. J.* 1986, 50, 621-628.
62. L. Lan, R. Pansu, J. Roncin, J. Faure, T. Arai, K. Tokumaru, Molecular organization in DODAC membrane fragments, *J. Colloid. Interface Sci.* 1992, 148, 118-128.
63. A. M. Carmona-Ribeiro, H. Chaimovich, Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 733, 172-179.
64. D. B. Nascimento, R. Rapuano, M. M. Lessa, A. M. Carmona-Ribeiro, Counterion effects on properties of cationic vesicles, *Langmuir* 1998, 14, 7387-7391.

65. P. C. Schulz, J. L. Rodriguez, F. A. Soltero-Martinez, J. E. Puig, Z. E. Proverbio, Phase behavior of the dioctadecyldimethylammonium bromide water system, *J. Therm. Anal.* 1998, *51*, 49-62.
66. E. Feitosa, P. C. A. Barreleiro, G. Olofsson, Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods, *Chem. Phys. Lipids* 2000, *105*, 210-216.
67. F. M. Linsciscn, S. Baycrl, T. M. Baycrl, ^2H -NMR and DSC study of DPPC-DODAB mixtures, *Chem. Phys. Lipids* 1996, *83*, 9-23.
68. R. S. Sarpal, G. Durocher, Temperature-induced structural and permeability changes in dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) vesicles: a fluorescence investigation using 2-[(*p*-methylamino)phenyl]-3,3-dimethyl-5-carboethoxy-3H-iodole as a probe, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1994, *80*, 307-314.
69. B. C. R. Guillame, D. Yogev, J. H. Fendler, Twister intramolecular charge-transfer emissions of fluorescence probes in didodecyldimethylammonium bromide, dioctadecyldimethylammonium bromide and didodecylphosphate vesicles undergoing fusion, *J. Phys. Chem.* 1991, *95*, 7489-7894.
70. S. Alonso-Romanowski, A. C. Biondi, E. A. Dissalvo, Effect of carbohydrates and glycerol on the stability and surface properties of lyophilized liposomes, *J. Membrane Biol.* 1989, *108*, 1-11.
71. L. M. Crowe, J. H. Crowe, Solution effects on the thermotropic phase transition of unilamellar liposomes, *Biochem. Biophys. Acta* 1991, *1064*, 267-274.
72. W. R. Perkins, X. Li, J. L. Slater, P. A. Harmon, P. L. Ahl, S. R. Minchey, S. M. Gruner, A. S. Janoff, Solute-induced shift of phase transition temperature in Di-saturated PC liposomes: adoption of ripple phase creates osmotic stress, *Biochem. Biophys. Acta* 1997, *1327*, 41-51.
73. M. Shinitzky, A. C. Dianox, C. Gitler, G. Weber, Microviscosity and order in the hydrocarbon region of micelles and membrane determined with fluorescence probes. I. Synthetic Micelles, *Biochemistry* 1971, *10*, 2106-2113.
74. D. Marsh, Membrane assembly studied by spin-label electron spin resonance, *Brazilian J. Med. Biol. Research* 1996, *29*, 863-871.
75. K. A. Riskc, O. R. Nascimento, M. Peric, B. L. Balcs, M. T. Lamy-Freund,

- Probing DMPG vesicle surface with a cationic aqueous soluble spin label, *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1418, 133-146.
76. J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz, *Electron Paramagnetic Resonance Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley & Sons, Nova York, 1994.
77. E. Grell, *Membrane Spectroscopy*, Springer-Verlag, Nova Iorque, 1981, p.209.
78. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, Nova Iorque, 1983.
79. M. T. Allen, L. Miola, D. G. Whitten, Host-Guest interactions: A fluorescence investigation of the solubilization of diphenylpolyene solute molecules in lipid bilayers, *J. A. Chem. Soc.* 1988, 110, 3198-3206.
80. S. Ganapathy, R. S. H. Liu, Photoisomerization of sixteen isomers of retinal. Initial product distribution in direct and sensitized irradiation. Photochemistry of polyenes 31, *Photochem. Photobiol.* 1992, 56, 959-964.
81. K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, Orlando, 1987.
82. K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems, *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 2039-2044.
83. J. S. Ham, A new electronic state in benzene, *J. Chem. Phys.* 1953, 21, 756-758.
84. A. Nakajima, Magnetic properties of some iminoxyl polyradical .2. Tempop triradical and tempop tetradical *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1971, 44, 2120-&.
85. V. A. Parsegian, R. P. Rand, D. C. Rau, Macromolecules and water: probing with osmotic stress, *Methods Enzymol* 1995, 259, 43-94.
86. P. C. Hiemenz, R. Rajagopalan, *Principles of Colloid and Surface Chemistry* 3^a cd., Marcel Dekker, Nova Iorque, 1997, p.209.
87. P. H. Hieger, *Electrochemistry*, Chapman & Hall, Nova Iorque, 1994, p.125.
88. D. J. Schneider, J. H. Freed, Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide. In *Spin Labeling. Theory and Applications* (L.J. Berliner and J Reuben, eds.), vol. 8, Plenum Press, New York, 1989, p. 1-76.
89. D. E. Budil, S. Lee, S. Saxena, J. H. Freed, Nonlinear-least-squares analysis of

- slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. *J. Mag. Res.* 1996, *120*, 155-189.
90. M. Ge, J. H. Freed, Electron-spin resonance study of aggregation of gramicidin in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers and hydrophobic mismatch. *Biophys. J.* 1999, *76*, 264-280.
91. K. A. Earle, J. K. Moscicki, M. Ge, D. E. Budil, J. H. Freed, 250-GHz electron spin resonance studies of polarity gradients along the aliphatic chains in phospholipid membranes. *Biophys. J.* 1994, *66*, 1213-1221.
92. B. R. Suddaby, P. E. Brwon, J. C. Russell, D. G. Whitten, Surfactant and hydrophobic derivatives of *trans*-stilbene as probes of vesicle and micelles solubilization sites. Studies using fluorescence and photoisomerization as probes, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, *107*, 5609-5617.
93. M. T. Allen, D. G. Whitten, The photophysics and photochemistry of α,ω -diphenylpolyene single states, *Chem. Rev.* 1989, *99*, 1691-1702.
94. R. M. Epand, R. Kraayenhof, Fluorescent probes used to monitor membrane interfacial polarity, *Chem. Phys. Lipids* 1999, *101*, 57-64.
95. R. Abuin, E. Lissi, D. Aravena, A. Zanocco, M. Macuer, A fluorescence probe study of the effect of size on the properties of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles, *J. Colloid Interface Sci.* 1988, *122*, 201-208.
96. W. R. Perkins, X. Li, J. L. Slater, P. A. Harmon, P. L. Ahl, S. R. Minchey, S. M. Gruner, A. S. Janoff, Solute-induced shift of phase transition temperature in Di-saturated PC liposomes: adoption of ripple phase creates osmotic stress, *Biochem. Biophys. Acta* 1997, *1327*, 41-51.
97. M. M. Thayer, R. C. Haltiwanger, V. S. Allured, S. C. Gill, S. J. Gill, Peptide urea interactions as observed in diketopiperazine urea cocrystal, *Biophys. Chem.* 1993, *46*, 165-169.
98. M. Roseman, W. P. Jencks, Interactions of urea and other polar compounds in water, *J. Am. Chem. Soc.* 1975, *97*, 631-640.
99. P. Baglioni, E. Rivaraminten, L. Dei, E. Ferroni, ESR study of sodium dodecyl-sulfate and dodecyltrimethylammonium bromide micellar solutions – effect of urea, *J. Phys. Chem.* 1990, *94*, 8218-8222.

