

Carlos Roberto Benatti

Propriedades Físico-Químicas de Vesículas
Unilamelares Obtidas por Sonicação a Banho



Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Departamento de Física

**“PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE VESÍCULAS
UNILAMELARES OBTIDAS POR SONICAÇÃO A BANHO”**

CARLOS ROBERTO BENATTI

Prof. Dr. Laerte Miola
Presidente

Orientador: **Laerte Miola**

Prof. Dr. João Baptista Sargi Bonilla
Examinador

Apoio Financ.: **FAPESP**



730/96

Dissertação de Mestrado

São José do Rio Preto

1996

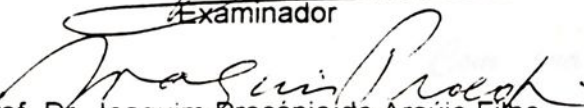
Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Departamento de Física

**“PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE VESÍCULAS
UNILAMELARES OBTIDAS POR SONICAÇÃO A BANHO”**

CARLOS ROBERTO BENATTI


Prof. Dr. Laerte Miola
Presidente


Prof. Dr. João Baptista Sargi Bonilha
Examinador


Prof. Dr. Joaquim Procópio de Araújo Filho
Examinador

São José do Rio Preto

1996



Para:

Geraldo e Ireni (meus pais); Edson,

José Heder e Fátima (meus irmãos);

*Com prazer, a vida é uma
aventura criativa; sem ele, é
uma luta pela sobrevivência.*

A. Lowen

para chegar (médico e escritor americano)

Aos Prof^{os}. Drs.:

Para: **Leitosa e Laerte Miola**

Geraldo e Ireni (meus pais); Edson,
José Heder e Fátima (meus irmãos);
Lucy Raquel e Luciana (minhas
cunhadas); minha querida esposa
Lucimara e Igor ou Isa, quem está
para chegar.

para que este trabalho
pudesse ser executado.

Agradecimentos

Considero esta uma das partes mais difícil para ser escrita, pois relacionar o nome de todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta dissertação não chega a ser uma tarefa tão fácil.

Portanto, prefiro mencionar o nome daqueles que acreditaram e muito contribuíram à viabilidade desta dissertação. Retiro-me aos professores Laerte Miola (orientador), Eloi Feitosa, João Ruggiero Neto, Marcelo Fossey, Augusto Agostinho Neto, não deixando de mencionar os professores Chahine e José Ruggiero, enfim, todos os professores do depto de Física do IBILCE, pelas valiosas sugestões e gratas descontrações. Ao professor Joaquim Procópio (USP- São Paulo). Contribuição não menos importante foram também a dos funcionários do depto: a secretária Ilva, e os técnicos e "engenheiros" Paulo Salinas e ... Barbosa.

Agradeço a todos os colegas do depto. de física, os quais aqui os represento pelo "pioneiro" Uderiel, a "plantonista" Raquel, o "MacGiver" Alexandre e o "pai Gu" Gustavo.

Muito grato sou também por toda minha família que sempre estiveram na torcida de todos os fatos e acontecimentos, a minha esposa Luciana que faz contigo minha alegria maior.

Agradeço a atenção de Návia Carvalho em sua valiosa correção ortográfica deste trabalho que quanto mais lia, menos entendia.

As bibliotecárias do IBILCE que sempre de forma agradável forneceram os objetos do saber: a FAPESP, de quem sou bolsista, ao CNPq que de forma indireta também contribuiu neste trabalho.

Finalizo agradecendo a UNESP, onde fiz minha graduação e agora a pós.

Aos Prof^s. Dr^s.:

Eloi Feitosa e Laerte Miola

O primeiro, por acreditar em minha pessoa e acompanhar mesmo de tão longe todo este trabalho, e o segundo, pela credibilidade a mim depositada e por dar todas as condições para que este trabalho pudesse ser executado.

Considero esta uma das partes mais difícil para ser escrita, pois relacionar o nome de todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta dissertação não chega a ser uma tarefa tão fácil.

Portanto, prefiro mencionar o nome daqueles que acreditaram e muito contribuíram à viabilidade desta dissertação. Refiro-me aos professores Laerte Miola (orientador), Eloi Feitosa, João Ruggiero Neto, Marcelo Fossey, Augusto Agostinho Neto, não deixando de mencionar os professores Chahine e José Ruggiero, enfim, todos os professores do depto de Física do IBILCE, pelas valiosas sugestões e gratas descontrações. Ao professor Joaquim Procópio (USP- São Paulo). Contribuição não menos importante foram também a dos funcionários do depto: a secretária Ilva , e os técnicos e “engenheiros” Paulo Salinas e ... Barbosa.

Agradeço a todos os colegas do depto. de física, os quais aqui os represento pelo “pioneiro” Uderlei, a “plantonista” Raquel, o “MacGiver” Alexandre e o “pai Gu” Gustavo.

Muito grato sou também por toda minha família que sempre estiveram na torcida de todos os fatos e acontecimentos, a minha esposa Lucimara que trás contigo minha alegria maior.

Agradeço a atenção de Návia Carvalho em sua valiosa correção ortográfica deste trabalho que quanto mais lia, menos entendia.

As bibliotecárias do IBILCE que sempre de forma agradável forneceram os objetos do saber; à FAPESP, de quem sou bolsista; ao CNPq que de forma indireta também contribuiu neste trabalho.

Finalizo agradecendo a UNESP, onde fiz minha graduação e agora a pós.



ÍNDICE

Símbolos e Abreviaturas

Símbolos e Abreviaturas.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
I. Introdução.....	1
I.1. Micelas <i>versus</i> Vesículas.....	4
I.2. Estabilidade coloidal e teoria DLVO.....	8
I.3. Equilíbrio de Donnan aplicado às vesículas de DODAB.....	12
I.4. Objetivos.....	14
II. Materiais e Métodos.....	16
II.1. Absortividade.....	17
II.2. Viscosidade.....	18
II.3. Condutividade molar.....	18
II.4. Cinética de agregação de vesículas.....	19
II.5. Equilíbrio de diálise.....	20
III. Resultados e Discussão.....	22
III.1. Caracterização de formação.....	22
III.2. Choque Osmótico Vesicular.....	33
III.3. Equilíbrio de diálise aplicado às vesículas de DODAB.....	51
III.3.1. Equilíbrio de Diálise.....	51
III.3.2. Equilíbrio Donnan.....	54
IV. Conclusão.....	57
V. Referências Bibliográficas.....	59

Símbolos e Abreviaturas

T_c	temperatura de transição do estado gel para o líquido-cristalino
R_h	raio hidrodinâmico (nm)
DODAC	Cloreto de Dioctadecildimetilamônio
DODAB	Brometo de Dioctadecildimetilamônio
DODAX	Brometo ou Cloreto de Dioctadecildimetilamônio ($X = Br^-$ ou Cl^-)
DHP	Dihexadecil Fosfato
ccc	concentração crítica de coagulação (M)
cmc	concentração micelar crítica (M)
v	volume (m^3)
l_c	comprimento da cadeia de hidrocarbonetos (m)
a_o	área (m^2)
N_s	parâmetro do anfifílico
k	constante de Boltzmann ($J K^{-1}$)
T	temperatura (K)
x	distância entre duas partículas (m)
$U(x)$	energia potencial total (J)
$U_A(x)$	energia potencial atrativa (J)
$U_R(x)$	energia potencial repulsiva (J)
R	raio da esfera ($\text{\AA}$)
A_H	constante de Hamaker (J)
C_o	concentração eletrolítica no “bulk” (M)
κ	comprimento de Debye (m)
z	valência
e	carga elementar (C)
Φ_o	potencial de superfície (V)



x_0	inverso da constante de Debye (m^{-1})
D	constante dielétrica do meio
ϵ_0	permissividade do vácuo ($C^2 J^{-1} m^{-1}$)
P_a	número de partículas
k_r	constante de velocidade de associação
η	viscosidade do solvente
k_s	constante de velocidade de coagulação lenta
W	fator de estabilidade
U_{max}	energia potencial máxima de interação (J)
C_s	concentração do sal (M)
λ	comprimento de onda (nm)
A_λ	turbidez num comprimento de onda λ fixo
V_0	velocidade inicial de floculação
C_a	concentração anfifílica (M)
A_0	turbidez no momento inicial da medida da variação temporal
A_f	turbidez no momento final da medida da variação temporal
A_i	turbidez antes da adição de eletrólitos
μ	potencial químico
μ^0	potencial químico padrão
P	pressão ($N m^{-2}$)
R	constante dos gases (mol^{-1})
a	atividade
C	concentração molar (mol)
Ψ_D	potencial de Donnan (V)
β	grau de ionização
α	grau de dissociação
τ_D	razão de Donnan
X	concentração de anfifílicos em contato com a solução (M)



F	constante de Faraday (C mol ⁻¹)	
q	carga elétrica (C)	
I	intensidade de luz transmitida	
I ₀	intensidade de luz incidente	
ε	absortividade (M m)	06
l	caminho ótico (nm)	
η ₀	viscosidade do solvente puro	06
η _r	viscosidade relativa	
η _s	viscosidade do soluto	09
η _{esp}	viscosidade específica	17
Λ	condutividade molar (S)	
σ	condutividade da solução (S)	21
σ ₀	condutividade do solvente (S)	23
Λ ^o	condutividade equivalente (S)	24
C _{eq}	concentração equivalente (M)	

Constantes Físicas

Constante de Boltzmann	$k = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$	26
Temperatura absoluta	$T = 298 \text{ K}$	27
Constante de Hamaker	$A_H = 1,4 \times 10^{-20} \text{ J}$	28
Carga elementar	$e = 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$	
Constante dielétrica	$D = 78,54$	29
Permissividade do vácuo	$\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-1}$	
Constante dos Gases	$R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	29
Constante de Faraday	$F = 9,649 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$	30
Constante de Avogadro	$N_0 = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	

Índice de Figuras

Fig.	Título	Pág.
01	Apresentação de alguns modelos de estruturas formadas em soluções aquosas pelos anfifílicos	31
02	Desenho da superfície de uma vesícula anfifílica com um corte inferior e apresentação química de um anfifílico de DODAX	06
03	Representação gráfica da energia de interação entre duas partículas esféricas carregadas de mesmo raio	09
04	Esquema ilustrativo de sonicação a banho	17
05	Desenho ilustrativo da câmara cilíndrica utilizada para o equilíbrio Donnan	21
06	Variação da turbidez com o tempo de sonicação	23
07	(a) Espalhamento de luz da solução sonicada 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0mM de DODAB	24
17	(b) Variação da turbidez com λ^{-4} da solução sonicada de DODAB (1,0mM)	25
08	(a) Efeito da concentração de DODAB na turbidez (220nm)	26
19	Absortividade em função do tempo de sonicação, $p/\lambda = 220$ (b) e 350nm (c)	27
09	Variação temporal do escoamento hidrodinâmico das soluções de DODAB sonicadas e não-sonicadas	28
10	Efeito da concentração de DODAB na viscosidade relativa da solução antes e após sonicação	29
11	Viscosidade específica por unidade de concentração das soluções sonicada (a) e não-sonicada (b) em função da concentração de DODAB	29
22		30



Fig.	Título	Pág.
12	Efeito da concentração de DODAB na condutividade da solução não-sonicada e sonicada, para a região de concentração do anfifílico de 0 a 1mM	31
13	Efeito da concentração de DODAB na condutividade da solução não-sonicada e sonicada, para a região de concentração do anfifílico de 1 a 10mM	32
14	Variação temporal da turbidez das amostras de soluções de DODAB sonicadas (a) e não-sonicadas (b) após a adição em solução de diferentes solutos	35
15	Variação temporal da turbidez das amostras de soluções de DODAB sonicadas (a) e não-sonicadas (b), após adição em solução de NaCl à várias concentrações	37
16	Intensidade de contração das vesículas de DODAB preparadas em água em função do inverso do gradiente de concentração de NaCl	41
17	Gráfico de $\log V_0$ vs. $\log C_S$, para vesículas de DODAB preparadas em água pura	44
18	Gráfico de $\log V_0$ vs. $\log C_S$, para vesículas de DODAB preparadas em D-Glicose	45
19	Gráfico de $\log V_0$ vs. $\log C_S$, para vesículas de DODAB preparadas em Uréia	46
20	Gráfico de $\log V_0$ vs. $\log C_S$, para vesículas de DODAB preparadas em NaCl	47
21	Gráfico de $\log V_0$ vs. $\log C_S$, para vesículas de DODAB preparadas em CaCl_2	48
22	Gráficos de ccc vs. a concentração de anfifílicos, para vesículas de DODAB preparadas na presença de diferentes solutos	49

Tab.	Título	Pág.
01	Turbidez das soluções sonicadas e não-sonicadas de DODAB antes e após adição a diferentes solutos	38
02	Valores da turbidez imediatamente (A_0) e 29h após (A_f) a adição da solução sociada de DODAB (0,22mM) em soluções de NaCl a várias concentrações	39
03	Valores da turbidez de soluções de DODAB antes e imediatamente após a adição de diferentes eletrólitos	40
04	Tabela de parâmetros obtidos através dos gráficos de cinética de agregação e valores do potencial de superfície	50
05	Concentração de DODAB nos dois compartimentos após o tempo t de diálise	52
06	Valores da concentração de DODAB nos lados 1 e 2, após diálise da solução sonicada contra água pura	53
07	Valores da razão de Donnan medidos a diferentes tempos de diálise	55
08	Valores da razão r_D , do potencial de Donnan e do grau de dissociação para diferentes concentrações de NaCl.	56

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que as vesículas formadas pelos métodos de sonicação a banho e de sonda de TI são indistinguíveis em relação as suas propriedades físico-químicas. A solução de DODAB quando sonicada a banho consiste de estruturas vesiculares unilamelares pequenas e de fragmentos de bicamada que, se adicionadas a uma solução eletrolítica, podem sofrer floculação e até mesmo agregação. Antes da sonicação estas soluções estão provavelmente em estruturas de vesículas unilamelares grandes e quase esféricas.



PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE VESÍCULAS UNILAMELARES OBTIDAS POR SONICAÇÃO A BANHO. Dissertação apresentada por Carlos Roberto Benatti à UNESP, campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestrado em Física na área de Biofísica Molecular, 1996.

RESUMO

A estrutura de bicamada lipídica de membranas biológicas, pode ser obtida utilizando apenas moléculas anfifílicas naturais ou sintéticas, graças à natureza hidrofóbica e hidrofílica das mesmas. O agregado formado pela hidratação de anfifílicos (iônicos ou não-iônicos) com duas cadeias, em geral forma vesículas com característica que dependem do método de preparação. Vesículas unilamelares pequenas (SUV) são obtidas por sonicação da dispersão, e vesículas unilamelares grandes (LUV) por injeção de uma solução orgânica do anfifílico no solvente aquoso. Utilizamos sonicação a banho para o preparo das vesículas de Cloreto, Brometo de Dioctadecildimetilamônio (DODAX, X = haleto), as quais, após preparadas foram estudadas através da aplicação de várias técnicas como: condutividade, viscosidade, cinética de agregação, equilíbrio Donnan, etc., que puderam fornecer algumas propriedades físico-químicas dessas moléculas. Os estudos das vesículas sonicadas foram, na maioria das vezes, feitos em comparação com suas soluções não sonicadas.

A partir dos resultados obtidos pudemos concluir que as vesículas formadas pelos métodos de sonicação a banho e de sonda de Ti são indistinguíveis em relação as suas propriedades físico-químicas. A solução de DODAB quando sonicada a banho consiste de estruturas vesiculares unilamelares pequenas e de fragmentos de bicamada que, se adicionadas a uma solução eletrolítica, podem sofrer floculação e até mesmo agregação. Antes da sonicação estas soluções estão provavelmente em estruturas de vesículas unilamelares grandes e quase esféricas.



PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF UNILAMELLAR VESICLES OBTAINED BY MEANS OF BATH SONICATION. Master'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 Master's Degree in Physics (area of Molecular Biophysics), 1996.

ABSTRACT

The structure of lipidic bilayer, typical of biological membranes, can be obtained by only utilizing natural or synthetic amphiphile molecules, thanks to their hydrophobic and hydrophilic nature. The aggregate formed by the hydration of amphiphiles (ionic or nonionic) with two chains usually forms vesicles with characteristics which depend on the preparation method. Small unilamellar vesicles (SUV) are obtained by the sonication of dispersion, and large unilamellar vesicles (LUV) by the injection of an organic solution of amphiphile in the watery solvent. Bath sonication was used for the preparation of vesicles of Cholesterol, Bromide of Dioctadecyldimethylammonium (DODAB, X = halite), which, after being prepared were studied through the application of several techniques such as: conductivity, viscosity, aggregation kinetics, Donnan equilibrium, etc., which could provide some physico-chemical properties from these molecules. The studies of the sonicated vesicles were, most times, made in comparison with their nonsonicated solutions.

On the basis of the results obtained it was possible to conclude that the vesicles formed by the methods of bath and of Ti probe are undistinguishable in relation to their physico-chemical properties. The solution of DODAB submitted to bath sonication consists of small unilamellar vesicular structures and of bilayer fragments which, when added to an electrolytic solution, may undergo flocculation and even aggregation. Before sonication these solutions are probably in structures of large almost spheric unilamellar vesicles.



obtenção em laboratório de estruturas de bicamadas fechadas (vesículas) a partir de fosfolipídios simplesmente constitui um marco no estudo das biomembranas. Bangham et al.⁴ foram os pioneiros na obtenção dessas "membranas sintéticas". A partir de então um número de métodos de preparação de vesículas⁵ com diferentes tamanhos e características têm sido desenvolvidos, a fim de aprimorá-las como sistemas-modelo das membranas biológicas.

I. INTRODUÇÃO

Em 1976, a obtenção de sais de amônio quaternário com dupla cadeia de hidrocarbonetos⁶, não apenas estimulou novas sínteses⁷ como também possibilitou a formação de vesículas a partir de substâncias com estruturas químicas distintas dos fosfolipídios, visando comparar com o comportamento e estrutura membranas lipoproteicas, compostas basicamente por fosfolipídios e proteínas. Essas membranas exercem diversificadas funções incluindo o transporte ativo, a permeabilidade (comumente denominadas de lipossomos) foram utilizados com ou sem adaptação no altamente seletiva de compostos químicos e o controle de temperatura do meio celular. A organização molecular das membranas é de fundamental importância para a compreensão do papel fisiológico de sua estrutura e função.

Gorter e Grendel, em 1925, demonstraram que lipídios em solução aquosa instáveis, e o segundo, por dificuldades de ordem prática (em geral, a temperatura de organizam-se preferencialmente em estrutura de bicamada¹. Posteriormente, Danielli e Davison (1935)² propuseram o modelo da estrutura de bicamada, o que levou Singer e Nicolson (1972) a estabelecerem o modelo, aceito até hoje, do mosaico fluido³, no qual a bicamada lipídica contém proteínas incorporadas.

A estrutura intrincada e funções múltiplas das biomembranas apresentam uma enorme dificuldade na investigação da correlação estrutura-função. Por isso, a



obtenção em laboratório de estruturas de bicamadas fechadas (vesículas) a partir de fosfolipídios simplesmente constitui um marco no estudo das biomembranas. Bangham et al.⁴ foram os pioneiros na obtenção dessas “membranas sintéticas”. A partir de então um número de métodos de preparação de vesículas⁵ com diferentes tamanhos e características têm sido desenvolvidos, a fim de aprimorá-las como sistemas-modelo das membranas biológicas.

Em 1976, a obtenção de anfifílicos a partir de sais de amônio quaternário com dupla cadeia de hidrocarbonetos⁶, não apenas estimulou novas sínteses⁷ como também possibilitou a formação de vesículas a partir de substâncias com estruturas químicas distintas dos fosfolipídios, visando comparar com o comportamento e estrutura das membranas biológicas. Os métodos de preparação de vesículas de fosfolipídios (comumente denominadas de lipossomos) foram utilizados com ou sem adaptação no preparo das vesículas de anfifílicos sintéticos. Os métodos mais comumente utilizados são os de sonicação⁸ e de injeção clorofórmica⁹. Métodos como o de injeção etanólica¹⁰ ou de extrusão¹¹ não têm sido muito utilizados na prática; o primeiro por formar vesículas instáveis, e o segundo, por dificuldades de ordem prática (em geral, a temperatura de transição do estado gel para o líquido-cristalino, T_c , dos anfifílicos sintéticos costuma ser mais alta do que dos lipídios naturais, e a extrusão deve ser feita acima dessa temperatura). Além disso, na extrusão, o tamanho das vesículas nem sempre condiz com a dimensão dos poros das membranas de polycarbonato utilizadas. As vesículas preparadas por sonicação com ponta de titânio são contaminadas por resíduos do metal. No método



de sonicação a banho a amostra é selada, livre de contaminação e permite um melhor controle de temperatura durante o processo de irradiação. Talvez o tempo prolongado de sonicação seja o responsável pela pouca utilização desse método. Os dois métodos de sonicação (a banho e com ponta) formam vesículas com o mesmo raio hidrodinâmico ($R_H = 25\text{nm}$) desde que sonicadas até a solução tornar-se opticamente transparente¹². Neste trabalho utilizamos basicamente o método de sonicação a banho.

Investigamos soluções de cloreto e brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAC e DODAB) antes e após o processo de sonicação. Apesar desses sistemas serem muito investigados, questões importantes relacionadas à estrutura e propriedades dos agregados supramoleculares formados ainda permanecem sem resposta. Embora as vesículas de DODAX (X = halogênio) têm sido exploradas, por exemplo, como catalisadores de reações químicas¹³ e encapsuladores de moléculas hidrosolúveis¹⁴, a formação das vesículas pelo método tradicional de sonicação tem sido questionada. Segundo Pansu et al.¹⁵ as ondas de ultra-som utilizadas na preparação das vesículas destroem a estrutura de bicamada fechada (vesicular) e a dispersão consiste em cerca de 90% de fragmentos de bicamada e 10% de vesículas. Recentemente, Feitosa et al.¹² mediram o raio hidrodinâmico de duas populações da solução sonicada de DODAB que foram atribuídas às vesículas e fragmentos de bicamada. A outro anfifílico sintético amplamente usado em pesquisa, Dihexadecil Fosfato (DHP), também foi atribuído a formação de fragmentos pós-sonicação.¹⁶

I.1. Micelas *versus* Vesículas

Anfifílicos (detergentes, lipídios) são moléculas bipolares que contêm uma região hidrofóbica (cauda apolar) e outra hidrofílica (cabeça polar). A região hidrofóbica consiste, em geral, de uma (ou mais) cadeia de hidrocarbonetos saturada ou insaturada, e a região hidrofílica pode ser iônica, zwitteriônica ou dipolar.

O caráter bipolar dos anfifílicos faz com que, em presença de água, eles se rearranquem de modo a minimizar o contato da cauda apolar com a água (meio polar). Essa característica marcante é a principal responsável pelo processo de agregação espontâneo dos anfifílicos em estruturas macromoleculares organizadas. Essa formação ocorre acima de uma certa concentração de anfifílicos, denominada concentração micelar crítica (**cmc**), e de uma certa temperatura (ponto de Krafft ou T_C)¹⁷, abaixo da qual os anfifílicos estão na forma monomérica (o ponto de Krafft é a temperatura na qual a solubilidade da solução é igual à **cmc**), podendo ser do tipo micelas ou bicamadas.

Na região da **cmc** ocorre saturação da interface e o excesso de anfifílico ocupa o volume aquoso na forma de agregados supramoleculares (micelas, bicamadas etc.). Acima da **cmc** esse quadro persiste, porém com um número maior de agregados no volume aquoso, permanecendo constante (igual à **cmc**) a concentração de anfifílicos livres em solução. O aumento da concentração de anfifílicos pode induzir mudanças na geometria ou na estrutura dos agregados. A temperatura e a força iônica também são determinantes dessa estrutura.



A estrutura do agregado formado depende de parâmetros moleculares do anfifílico (volume (v) e comprimento da cadeia (l_c) e a área (a_o) da região da cabeça polar) e de variáveis intensivas (temperatura, força iônica etc.). Para um dado conjunto de parâmetros moleculares e variáveis intensivas, a estrutura do agregado é determinado pela condição de mínima energia livre, bem como por fatores geométricos de acordo com valores assumidos pelo *parâmetro do anfifílico* $N_s = v/a_o l_c$, conforme os valores deste parâmetro adimensional, conheceremos a estrutura formada pelo anfifílico, ou seja:¹⁸

N_s :	Estrutura:
<0,33	micelas esféricas
0,5	micelas cilíndricas
1	bicamadas planas
>1	micelas reversas

A figura 1 esquematiza algumas das estruturas de agregados anfifílicos mais comuns e a figura 2 tenta dar uma noção tridimensional de uma vesícula.

Fig. 1: Anfifílicos tal como surfactantes e lipídios podem associar-se em estruturas variadas em soluções aquosas. Aqui-se apresentamos algumas das mais comuns e estudadas estruturas formadas em soluções aquosas pelos anfifílicos.

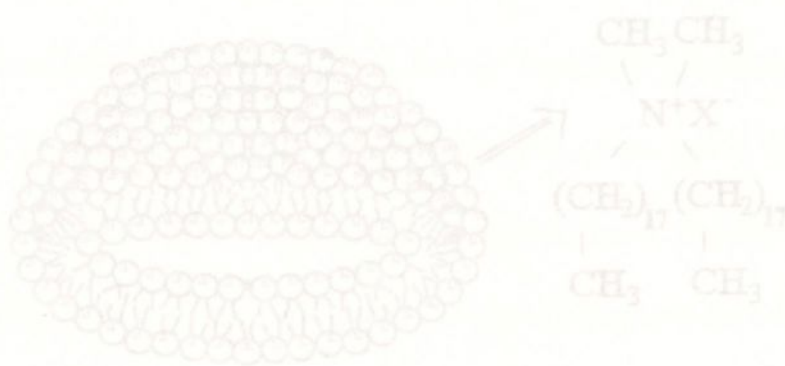


Fig. 2: Desenho da superfície de uma vesícula com um corte inferior; em destaque, a apresentação química de um anfifílico de DODAX, onde $X = Cl^-$ ou Br^- .

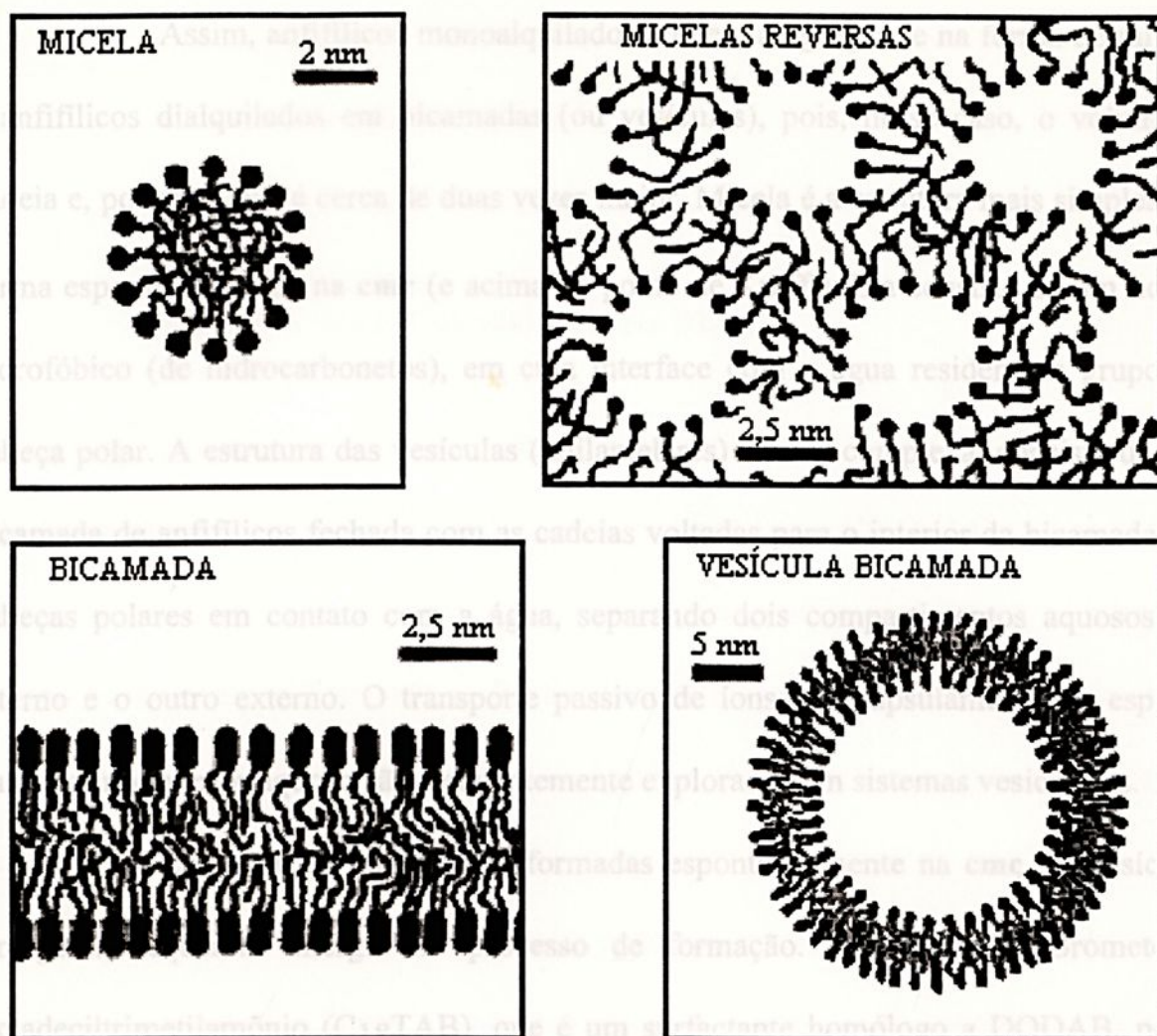


Fig. 1: Anfífilos tal como surfactantes e lipídios podem associar-se em estruturas variadas em soluções aquosas. Acima apresentamos algumas das mais comuns e estudadas estruturas formadas em soluções aquosas pelos anfífilos.

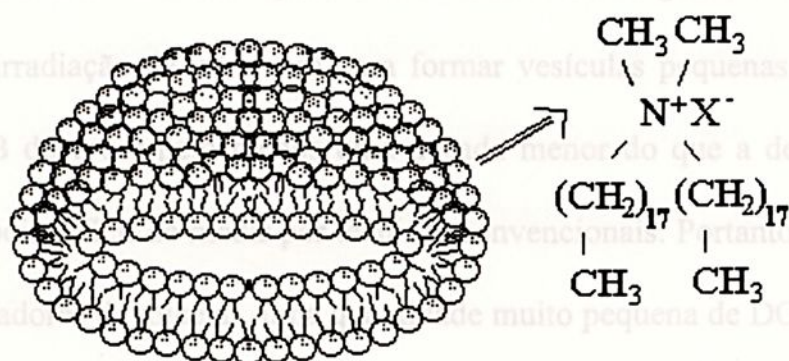


Fig. 2: Desenho da superfície de uma vesícula com um corte inferior; em destaque, a apresentação química de um anfílico de DODAX, onde $\text{X} = \text{Cl}^-$ ou Br^- .

Assim, anfífilos monoalquilados tendem a agregar-se na forma de micelas e anfífilos dialquilados em bicamadas (ou vesículas), pois, nesse caso, o volume da cadeia e, portanto, N_s , é cerca de duas vezes maior. Micela é a estrutura mais simples e se forma espontaneamente na **cmc** (e acima do ponto de Krafft). Ela consiste de um núcleo hidrofóbico (de hidrocarbonetos), em cuja interface com a água residem os grupos de cabeça polar. A estrutura das vesículas (unilamelares) é mais complexa, consiste de uma bicamada de anfífilos fechada com as cadeias voltadas para o interior da bicamada e as cabeças polares em contato com a água, separando dois compartimentos aquosos, um interno e o outro externo. O transporte passivo de íons e encapsulamento de espécies químicas no interior aquoso são frequentemente explorados em sistemas vesiculares.

Enquanto as micelas são formadas espontaneamente na **cmc**, as vesículas, em geral, requerem energia no processo de formação. Por exemplo, Brometo de Octadeciltrimetilamônio ($C_{18}TAB$), que é um surfactante homólogo a DODAB, porém com uma única cadeia, agrega-se espontaneamente em micelas acima da **cmc** = 0,35mM e acima do ponto de Krafft (ca. 38°C na ausência de eletrólitos)¹⁹. Já DODAB, acima dessa temperatura é solúvel sob agitação mecânica e forma grandes estruturas que são quebradas por irradiação de ultra-som para formar vesículas pequenas. Estima-se que a **cac** de DODAB deva ser pelo menos uma década menor do que a de $C_{18}TAB$ (i.é, < 35µM), sendo pois difícil de medir por técnicas convencionais. Portanto, ao contrário dos anfífilos formadores de micelas, uma quantidade muito pequena de DODAB em solução



aquosa migra para o volume, fazendo com que DODAB não altere significativamente (como C₁₈TAB, p.ex.) a tensão superficial da solução²⁰.

I.2. Estabilidade Coloidal e Teoria DLVO

Quando duas partículas coloidais, em movimento browniano, aproximam-se, elas interagem entre si e com as moléculas do solvente em volta. O balanço entre essas interações determina a estabilidade do sistema. Consideramos aqui apenas as interações do tipo estática, especificamente as forças eletrostáticas e de van der Waals, de acordo com a teoria DLVO (Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey e Theo Overbeek)²¹, descrita mais adiante.

A interação entre as partículas pode apresentar o perfil da curva da energia potencial de interação (figura 3) que determina se a associação entre duas partículas coloidais de um sistema é reversível (floculação) ou irreversível (coagulação). No primeiro caso, numa associação rápida, o mínimo primário não é tão profundo quanto no segundo caso. Na associação lenta, a floculação ocorre no mínimo secundário e existe uma barreira de potencial dada pela diferença do máximo primário e do mínimo secundário. Se a barreira de potencial for muito maior do que kT (onde k é a constante de Boltzmann e T a temperatura), então o mínimo primário se torna inacessível e o sistema é cineticamente estável.

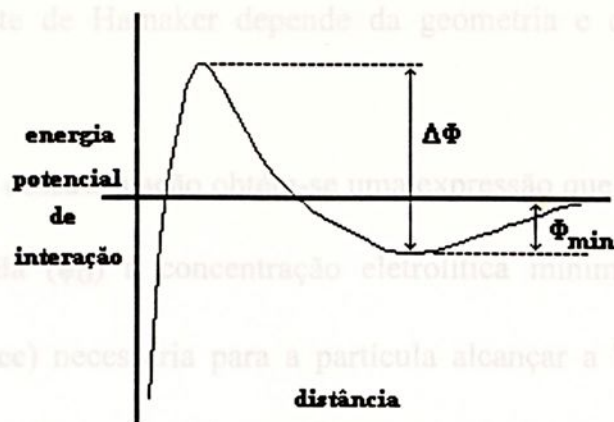


Fig. 3: Representação gráfica da energia de interação entre duas partículas esféricas carregadas de um mesmo raio segundo a teoria DLVO.

Na teoria DLVO as duas principais interações de longo alcance (em água $\approx 50\text{\AA}$) que controlam a estabilidade do sistema coloidal são: as forças de van der Waals e as forças eletrostáticas se as partículas possuem excesso de carga elétrica. Para partículas similares, as primeiras são sempre atrativas e as últimas repulsivas²¹. Ou seja,

$$U(x) = U_A(x) + U_R(x) \quad (1)$$

A relação de $U_A(x)$ e $U_R(x)$ com a distância (x) entre as partículas depende, entre outras coisas, da geometria das partículas. Uma expressão semi-quantitativa para o potencial de interação entre duas esferas idênticas de raio R , para $x \ll R$, é:²²

$$U(x) = \pi R [-(A_H/12\pi x) + (64kTC_0\Gamma_0^2/\kappa^2)\exp(-\kappa x)] \quad (2)$$

sendo $\Gamma_0 = \tanh(ze\phi_0/4kT)$, κ é a constante de Debye, C_0 a concentração de eletrólitos no “bulk” (cujo o potencial elétrico é nulo), k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, e é a carga do próton, z é a valência do contra-íon, e A_H é a constante de

Hamaker. A constante de Hamaker depende da geometria e composição química da molécula.

A partir dessa equação obtém-se uma expressão que relaciona o potencial de superfície da partícula (ϕ_0) à concentração eletrolítica mínima, ou concentração de coagulação crítica (ccc) necessária para a partícula alcançar a barreira de potencial²², fazendo $x_0 = 1/\kappa$ na eq. 2 e resolvendo para C_0 :

$$ccc \cong 1 \times 10^5 [(D\epsilon_0)^3 (kT)^5 / z^6 e^6 A_H^2] \Gamma_0^4 \quad (3)$$

onde D é a constante dielétrica do meio e ϵ_0 é a permissividade do vácuo. A unidade de todas as grandezas nessa equação estão no Sistema Internacional (S.I.) e, portanto, a ccc é dada em moléculas por m^3 . Observamos (Eq.3) que a ccc depende fortemente da carga do contra-íon (regra de Schulze-Hardy).

No processo de agregação rápida, no qual a barreira de potencial inexistente, a taxa de coagulação que envolve a associação bimolecular entre duas partículas coloidais idênticas para formar um dímero, é descrita pela equação

$$d[P_a]/dt = -k_r[P_a]^2 \quad (4)$$

onde P_a é o número de partículas e a constante de velocidade de associação (k_r) é dada por:²²

$$k_r = 4kT/3\eta \quad (5)$$

mostrando que k_r depende apenas da viscosidade do solvente (η), e não do tamanho da partícula. Quando a barreira de potencial é consideravelmente maior do que kT

(associação lenta), a constante de velocidade de coagulação lenta, k_s , torna-se menor por um fator W , ou seja,

$$W = k_r/k_s \quad (6)$$

onde $W = 2R \int_{2R}^{\infty} r^{-2} \exp(U/kT) dr$ (7)

(a integral vai de $2R$ a ∞) denomina-se *fator de estabilidade*. Na teoria DLVO, a Eq.7 deve ser resolvida numericamente. Verwey e Overbeek, no entanto, desenvolveram uma expressão aproximada para W que permite comparar diretamente com dados experimentais:²¹

$$W = (\pi^{0,5}/4\pi p) \exp(U_{max}/kT) \quad (8)$$

onde $p = -(\partial^2 V/\partial x^2)_{max} / kT$.

Reerink e Overbeek²³ mostraram que existe uma relação linear entre $\log W$ e $\log C_s$, a 25 °C em água, onde C_s é a concentração de eletrólitos:

$$d \log W / d \log C_s = -2,15 \times 10^7 R \Gamma_0^2 / z^2 \quad (9)$$

Em muitos casos, a taxa de coagulação é avaliada usando a variação temporal da turbidez (A_λ), medida num certo comprimento de onda λ ; então a taxa inicial de variação temporal da turbidez, $V_0 \equiv (dA_\lambda/dt)_0$, é inversamente proporcional a W e diretamente proporcional à concentração de anfífilos (C_a).²³ Desse modo, a medida de V_0 em função da concentração de eletrólitos adicionado (C_s) permite obter o potencial de superfície (ϕ_0) das partículas em solução. Para $C_s > ccc$, W não varia com C_s e a ccc pode, assim, ser determinada a partir da curva de $\log W$ vs. $\log C_s$.

Esse método empírico de determinar a ccc e ϕ_0 de sistemas coloidais tem sido aplicado satisfatoriamente para dispersões de vesículas (DODAC e DHP)^{24,25} e de lipossomos²⁶. Além desses, outros parâmetros têm sido obtidos a partir da curva da turbidez vs. tempo. A relação $A_0(1/A_0 - 1/A_f)$, onde A_0 e A_f são, respectivamente, a turbidez inicial e final após a adição do eletrólito, está relacionada à intensidade da floculação ou da contração das vesículas devido ao choque osmótico aplicado²⁷.

I.3. Equilíbrio de Donnan Aplicado às Vesículas de DODAB

O fenômeno de equilíbrio de diálise pode ser utilizado na medida direta da ligação de íons a uma macromolécula, ou do grau de dissociação da macromolécula, ao contrário de outras técnicas que permitem obter esses parâmetros indiretamente, por exemplo, via eletroforese de fluxo livre.²⁷ O princípio termodinâmico fundamental que governa as partículas difusíveis através da membrana, estabelece que o potencial químico dessas partículas seja o mesmo em ambos os lados da membrana. A presença de macromoléculas (partículas não difusíveis) em um dos lados da membrana permite obter o número de partículas a ela ligada, utilizando o princípio acima que em outras palavras, diz que a concentração de partículas difusíveis livres nos dois lados da membrana é a mesma.²⁸ O potencial químico da partícula difusível é dado pela equação,

$$\mu = \mu^0(T, P) + RT \ln a, \quad (10)$$



onde μ^0 é o potencial químico padrão, a é a atividade, R a constante dos gases e T a temperatura absoluta. Assumimos que o coeficiente de atividade é unitário e, portanto, $a = C$, onde C é a concentração molar.

Quando as partículas difusíveis são íons, na presença ou ausência de macro-íons (não-difusíveis), tem origem uma diferença de potencial entre as regiões separadas pela membrana. Este potencial, o potencial de Donnan (Ψ_D), depende da razão entre os íons livres difusíveis nos dois compartimentos. O número total de íons dialisados menos o número de íons no compartimento livre de macromoléculas, medido após o equilíbrio, possibilita medir o número de íons ligados, a partir do qual se pode obter o grau de ionização (β) ou de dissociação (α) da macromolécula. O potencial de Donnan pode ser medido utilizando eletrodos apropriados, ou estimados a partir da razão entre os íons difusíveis nos dois lados da membrana (razão de Donnan, r_D).

O potencial químico do NaCl é dado por:

$$\begin{aligned}\mu_{\text{NaCl}} &= \mu_{\text{Na}^+} + \mu_{\text{Cl}^-} = \mu^0_{\text{NaCl}} + RT \ln [\text{NaCl}] \\ &= \mu^0_{\text{Na}^+} + \mu^0_{\text{Cl}^-} + RT \ln ([\text{Na}^+][\text{Cl}^-])\end{aligned}\quad (11)$$

que deve ser o mesmo nos dois lados da membrana (lado 1 e lado 2), de onde concluímos que $[\text{Na}^+]_1/[\text{Na}^+]_2 = [\text{Cl}^-]_2/[\text{Cl}^-]_1 = r_D$, onde r_D é a razão de Donnan. Havendo a presença da macromolécula carregada M , esta razão pode desviar significativamente de 1, este desvio é uma consequência da condição de eletroneutralidade.²⁸ As equações que relacionam a r_D com o potencial Ψ_D , são,



$$r_D = \frac{z \cdot X}{2 \cdot [Na^+]_2} + \left[\left(\frac{z \cdot X}{2 \cdot [Na^+]_2} \right)^2 + 1 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

onde z é a valência da macromolécula e X a concentração de anfífilicos em contato com a solução ($\cong 50\%$ da concentração total), e

$$r_D = \left(\frac{RT}{z \cdot F} \right) \cdot \ln r_D \quad (13)$$

onde F é a constante de Faraday²⁹.

Para a aplicação destas equações ao sistema de vesículas sintéticas assumiremos que o compartimento interno das vesícula apresenta um potencial nulo. Através do potencial Donnan, pode ser estimado o grau de dissociação da superfície externa das vesículas, α . Outras técnicas para medir-se α podem ser através da obtenção do número de cargas q na camada de Stern, por espalhamento de luz^{30,31} ou por eletroforese³², entre outras técnicas.

I.4. Objetivos

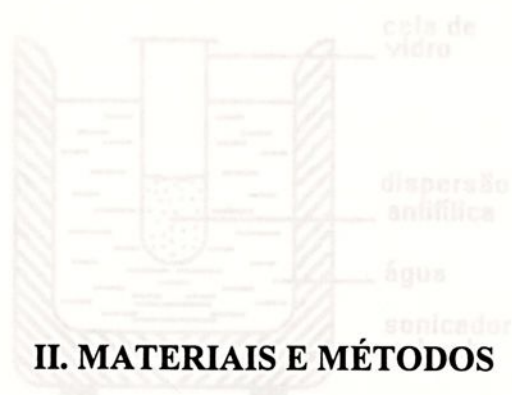
Para tais estudos usamos basicamente vesículas unilamelares de Brometo de Dioctadecildimetilamônio, preparadas em sonicação a banho. A formação destas vesículas ainda causa contradições na teoria. Ainda que Pansu et al.¹⁵, utilizando encapsulamento de sondas no interior aquoso de vesículas de DODAC, concluíram que as moléculas de

DODAC em solução, apenas 10% estão organizadas em estrutura de vesículas esféricas, e o resto (90%) na forma de fragmentos de bicamadas (ou estruturas abertas). A porcentagem exata dessas estruturas (abertas ou fechadas), depende do tipo de sonicação (com sonda no caso). Pansu afirma que quanto maior o tempo de sonicação, mais opticamente transparente é a amostra e menor é a fração de vesículas¹⁵.

Comparamos algumas propriedades físicas, tais como viscosidade, condutividade, turbidez e absorvividade de soluções de DODAB antes e após o processo de sonicação a banho, com o objetivo de estabelecer melhor as propriedades dos agregados, bem como o efeito da sonicação nessas estruturas, as quais são atribuídas estruturas lamelares e vesiculares, respectivamente, antes e após a sonicação. Em seguida, utilizamos duas técnicas distintas que permitem estimar o grau de dissociação e o potencial de superfície das vesículas: cinética de agregação e equilíbrio de diálise. No primeiro caso obtivemos a concentração crítica de coagulação (ccc) a partir da taxa de variação temporal da turbidez, e então o potencial de superfície foi estimado. No outro caso, o grau de dissociação das vesículas foi obtido a partir do equilíbrio de diálise e equilíbrio de Donnan da amostra vesicular contra uma dada solução eletrolítica. Através da diálise da solução sonicada detectamos apenas uma pequena concentração de fragmentos de vesículas, mas pelos dados obtidos até então, esta concentração ainda é baixa, reforçando a hipótese da formação de vesículas. O que desejamos neste trabalho é apresentarmos as principais propriedades das vesículas formadas pelo método de sonicação a banho e a diferenciação com o sistema de dispersão não sonicada.



A seguir descrevemos os métodos e técnicas utilizados na obtenção de algumas propriedades das dispersões de DODAB.



II. MATERIAIS E MÉTODOS

Fig. 4: Esquema ilustrativo de sonicação a banho

Brometo de Dioctadecildimetilamônio (DODAB) (Kodak), foi utilizado como adquirido. Após diluirmos o anfifílico, sob agitação mecânica constante (tipo vórtex), no solvente aquoso à temperatura de ca. 58°C, a dispersão foi exposta a ondas de ultra-som num sonicador tipo banho (Microsonic, mod. SX-10). Durante o processo de sonicação, a temperatura do banho foi mantida acima da T_c do anfifílico, i.é, a 55°C. Após a sonicação, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente na qual era estocada. A figura 4 esquematiza o sistema utilizado no processo de sonicação da dispersão. Utilizamos água ultra pura tipo Mili-Q. Os solutos iônicos e não-iônicos foram utilizados como fornecido pelo fabricante (Merck). As medidas de turbidez foram realizadas num espectrofotômetro tipo Cary-1E, e em cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,99cm.

A concentração de anfifílicos foi obtida através da dosagem do contra-íon, via método de Schales e Schales³³.

A seguir descrevemos os métodos e técnicas utilizados na obtenção de algumas propriedades das dispersões de DODAB.

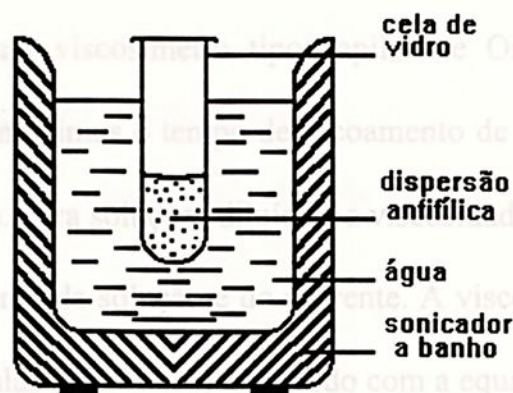


Fig. 4: Esquema ilustrativo de sonicação a banho

II.1. Absortividade (ϵ)

Utilizamos um procedimento padrão na medida de ϵ em função do tempo de sonicação, no qual o volume (5ml) e a concentração (5mM) da amostra foram mantidos constantes. A turbidez (220 e 350nm) foi medida, para diferentes concentrações de DODAB, a partir da maior concentração (1mM) por diluição da amostra.

Pela lei de Beer-Lambert, temos

$$\log(I/I_0) = -\epsilon C_a l \quad (14)$$

onde I_0 é a intensidade de luz incidente, I é a intensidade de luz transmitida, l é o caminho ótico da amostra, C_a é a concentração molar de anfifílicos, e ϵ é a absortividade,³⁴ de onde obtemos ϵ do coeficiente angular da curva da turbidez vs. concentração de anfifílicos.

II.2. Viscosidade (η)

Utilizamos um viscosímetro tipo capilar de Ostwald, imerso em banho termostatizável (25°C), e medimos o tempo de escoamento de um dado volume (fixo) de solução e do solvente puro. Para soluções diluídas, a viscosidade (η) é dada pela razão t/t_0 entre o tempo de escoamento da solução e do solvente. A viscosidade intrínseca depende da concentração de partículas (anfifílicos) de acordo com a equação:

$$\eta = \eta_0(1 + [\eta]C_a + \dots) \quad (15)$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, e η_0 é a viscosidade do solvente puro. Outro termo para a viscosidade, pode ser a viscosidade relativa (η_r) dada pela equação:

$$\eta_r = \eta_s / \eta_0 \quad (16)$$

onde η_s é a viscosidade do soluto. Para nossos dados, η_r foi obtida através do tempo de escoamento (t) pelo capilar, sendo $\eta_r = t/t_0$. Se subtrairmos a unidade desta equação, obteremos a viscosidade específica, que é uma medida da variação fracionária e viscosidade produzida pela adição do soluto:

$$\eta_{\text{esp}} = \eta_r - 1 = (\eta_s - \eta_0) / \eta_0 \quad (17)$$

II.3. Condutividade Molar (Λ)

As medidas de condutividade foram realizadas num condutivímetro da Micronal, mod. B330. A condutividade molar é definida como sendo a condutividade da



solução menos a do solvente por unidade de concentração molar, $\Lambda = (\sigma - \sigma_0)/C$. Neste estudo limitamo-nos a uma análise qualitativa do efeito da concentração na condutividade do sistema DODAB/água, antes e após a sonicação, e obter a condutividade equivalente em diluição infinita (Λ^0), para a concentração tendendo a zero. A extrapolação da condutividade equivalente para diluição infinita pode ser medida com a ajuda da equação

$$\Lambda = (\sigma - \sigma_0)/C_{eq} = \Lambda^0 + \phi(C_{eq}) \quad (18)$$

onde σ é a condutividade eletrolítica da solução, σ_0 é a condutividade eletrolítica do solvente, C_{eq} é a concentração equivalente. A função $\phi(C_{eq})$ representa o efeito de interação interiônica na condutividade. Desta equação, obtemos a equação:

$$\sigma = \sigma_0 + \Lambda^0 C_{eq} + C_{eq} \phi(C_{eq}) \quad (19)$$

e Λ^0 pode ser determinado pela inclinação do gráfico de σ por C_{eq} .

Essa técnica, no entanto, pode ser utilizada na determinação do grau de dissociação das vesículas. Esta tarefa deve ficar para um trabalho posterior.

II.4. Cinética de Agregação de Vesículas

Medimos a turbidez (400nm) em função do tempo imediatamente após adicionarmos ao sistema DODAB/água uma certa quantidade de eletrólitos, de onde obtivemos o valor da taxa inicial de variação temporal da turbidez, entre outros parâmetros (vide Introdução). Para uma dada concentração final de anfifílicos e



eletrólitos, a adição de sal ao sistema DODAB/água foi efetuado de duas maneiras: (a) adição de alíquota de solução eletrolítica, e (b) adição de alíquota da dispersão na solução eletrolítica. Observamos que, nos dois casos, a cinética de agregação difere. Optamos pela alternativa (b), pois neste caso, as vesículas têm menor possibilidade de rompimento. As curvas de cinética foram obtidas para um valor de concentração de DODAB, de onde obtivemos valores da *ccc* e estimamos o potencial de superfície das vesículas.

Fig. 5: Desenho ilustrativo da câmara cilíndrica utilizada para o Equilíbrio de Diálise.

IV.5. Equilíbrio de Diálise

Para o experimento de diálise, preparamos uma solução estoque de vesículas (10mM, 10ml), que ficou em repouso por 18 horas em média. A diálise foi feita numa câmara giratória de volume total aproximadamente 10 ml, dividida ao meio por uma membrana de diálise (“cut-off” = 3,5k), Fig. 5. Em cada lado da câmara colocamos 2,5 ml de dispersão vesicular (lado 1) e solução salina (NaCl, lado 2). A concentração de anfifílicos foi fixada em 10 mM. O sistema foi posto em movimento rotatório para agitar a amostra por 5 horas no mínimo; tempo suficiente para o sistema atingir o equilíbrio. A titulação dos ânions e cátions foram feitas, respectivamente, pelo método de Schales e Schales²⁸ e por fotometria de chama (mod.B262). Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (cerca de 25°C).



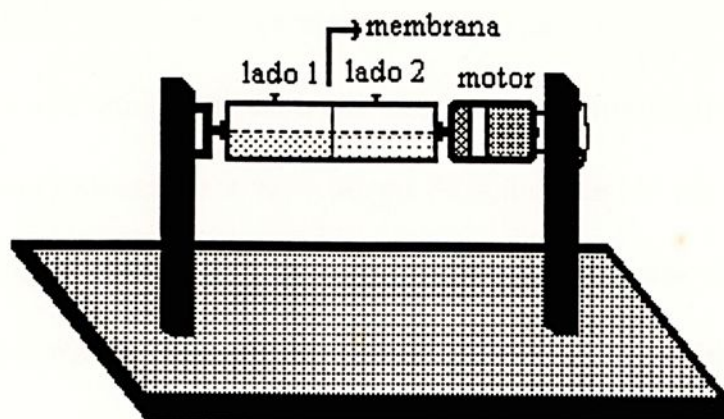


Fig. 5: Desenho ilustrativo da câmara cilíndrica utilizada para o Equilíbrio de Diálise.

III.1. Caracterização e Formação de Vesículas

Neste trabalho referimos-nos as soluções heterogêneas sonicada e não-sonicada, cujos agregados têm, respectivamente, estrutura do tipo vesicular, ou bicamada unilamelar fechada.

Apesar das vesículas em geral serem muito exploradas como sistema mimético, algumas de suas propriedades básicas ainda são pouco conhecidas. Apresentamos resultados de medidas de algumas propriedades das vesículas de DODAX preparadas por sonicação a banho na presença de diferentes solutos iônicos e não-iônicos. O conhecimento destas propriedades é de grande importância para quaisquer estudos de aplicação das vesículas, p. ex. como sistema-modelo de membrana biológica.

O tempo ideal de sonicação da solução foi obtido através da medida da turbidez em função do tempo de exposição às ondas de ultra-som da solução de DODAX.

Em intervalos de 10 a 15 minutos de sonicação retiramos alíquotas da amostra para as medidas de turbidez (220nm) de modo a não alterar significativamente o volume total. A turbidez diminui assintoticamente com o tempo de sonicação até um patamar a cerca de 60 minutos (figura 6). Padronizamos então o tempo de 90 minutos de sonicação, após o qual a solução é opticamente transparente. Um tempo dessa ordem foi obtido por medida de espalhamento de luz.³⁶ O tipo de anfifílico,³⁷ a potência do ultra-som, a temperatura de sonicação ou mesmo o tempo de sonicação a

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1. Caracterização e Formação de Vesículas e a estrutura nas soluções sonificada e não-sonificada diferem apenas no tamanho e geometria.

Neste trabalho referimos-nos as soluções heterogêneas sonificada e não-sonificada, cujos agregados têm, respectivamente, estrutura do tipo vesicular, ou bicamada unilamelar fechada.

Apesar das vesículas em geral serem muito exploradas como sistema mimético, algumas de suas propriedades básicas ainda são pouco conhecidas. Apresentamos resultados de medidas de algumas propriedades das vesículas de DODAX preparadas por sonicação a banho na presença de diferentes solutos iônicos e não-iônicos. O conhecimento destas propriedades é de grande importância para quaisquer estudos de aplicação das vesículas, p. ex. como sistema-modelo de membrana biológica.

O tempo ideal de sonicação da solução foi obtido através da medida da turbidez em função do tempo de exposição às ondas de ultra-som da solução de DODAX.



Em intervalos de 10 a 15 minutos de sonicação retiramos alíquotas da amostra para as medidas de turbidez (220nm) de modo a não alterar significativamente o volume total. A turbidez diminui assintoticamente com o tempo de sonicação até um patamar a cerca de 60 minutos (figura 6). Padronizamos então o tempo de 90 minutos de sonicação, após o qual a solução é oticamente transparente. Um tempo dessa ordem foi obtido por medida de espalhamento de luz.³⁶ O tipo de anfifílico,³⁷ a potência do ultra-som, a temperatura de sonicação ou mesmo a geometria do frasco influenciam no tempo de sonicação a banho. Cerca de 15 minutos apenas são necessários para obter vesículas sonicadas com sonda.³⁸ A variação assintótica da turbidez na figura 6 sugere que nenhuma variação abrupta de estrutura ocorre durante o processo de sonicação e a estrutura nas soluções sonicada e não-sonicada diferem apenas no tamanho e geometria.

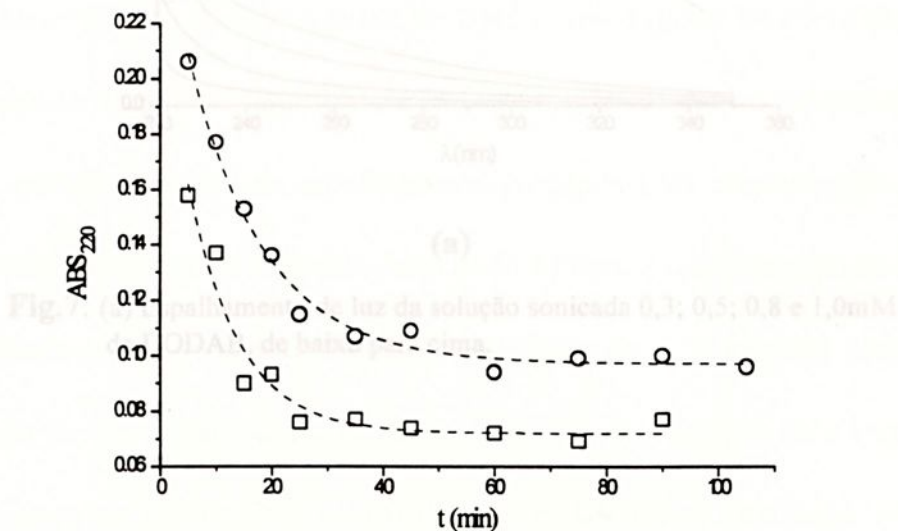


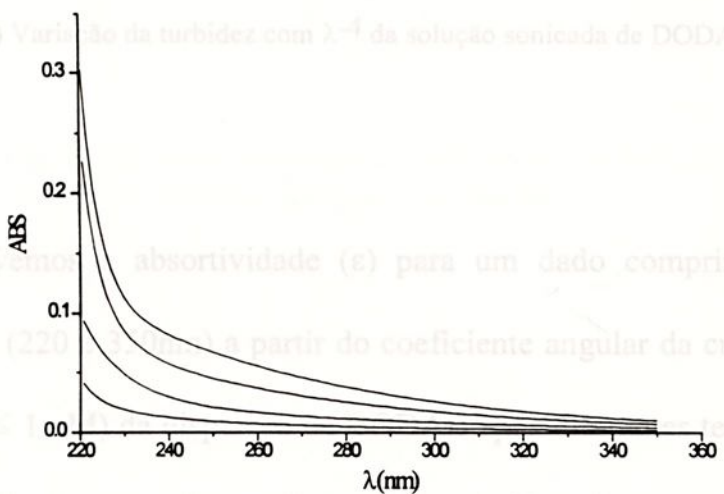
Fig. 6: Variação da turbidez com o tempo de sonicação das soluções de DODAC (□) e DODAB (○) em água.

O espalhamento de luz da dispersão de DODAX sonicada a banho tem o aspecto característico mostrado na figura 7a para diferentes concentrações do surfactante. Na figura 7b vemos que para uma dada concentração de DODAB, a turbidez aumenta linearmente com λ^{-4} , numa certa faixa de comprimento de onda; comportamento este, típico de espalhamento de luz por partículas pequenas em solução (espalhamento Rayleigh).



(b)

Fig.7: (b) Variação da turbidez com λ^{-4} da solução sonicada de DODAB 1,0mM.



(a)

Fig.7: (a) Espalhamento de luz da solução sonicada 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0mM de DODAB, de baixo para cima.

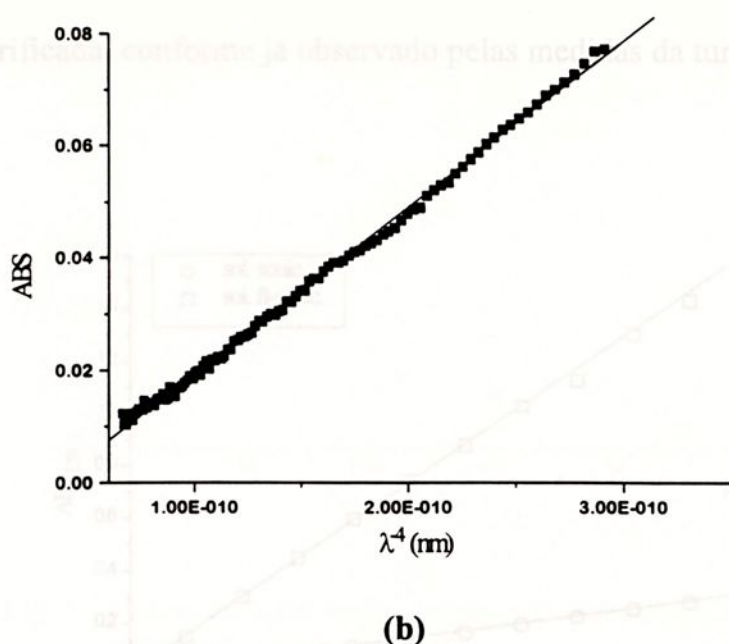


Fig.7: (b) Variação da turbidez com λ^{-4} da solução sonicada de DODAB 1,0mM.

Obtivemos a absorvidade (ϵ) para um dado comprimento de onda da radiação incidente (220 e 350nm) a partir do coeficiente angular da curva de absorvância vs. concentração ($\leq 1\text{mM}$) da dispersão de DODAB após diferentes tempos de sonicação, sendo ϵ uma medida da curva de espalhamento corrigida pela concentração. A figura 8a ilustra a dependência linear da turbidez (num dado λ) com a concentração de DODAB nas soluções sonicada e não-sonicada. Independentemente de λ , ϵ diminui assintoticamente com o aumento do tempo de sonicação (figura 8b e 8c). A variação de ϵ com o tempo de sonicação se deve ao rearranjo dos anfifílicos em diferentes estruturas sob efeito das

ondas de ultra-som, sendo que nenhuma variação ou transição brusca de uma estrutura para outra é verificada, conforme já observado pelas medidas da turbidez (figura 6).³⁹

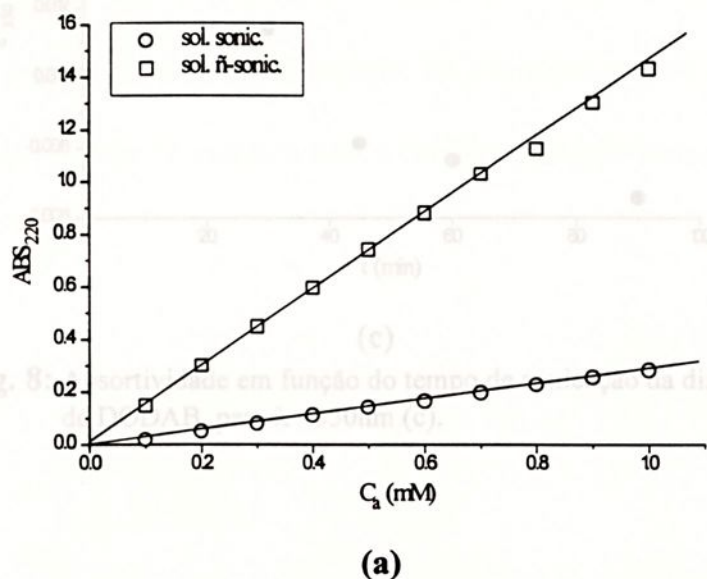


Fig. 8: Efeito da concentração de DODAB na turbidez (220nm) das soluções sonicada e não sonicada (a).

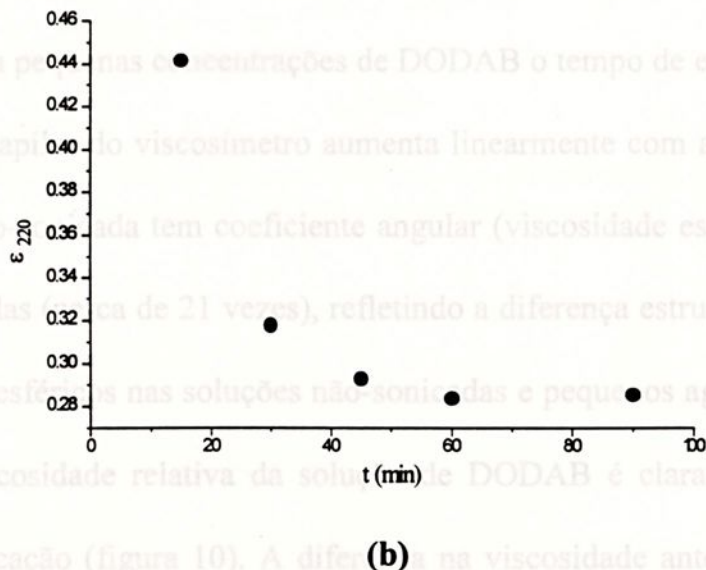
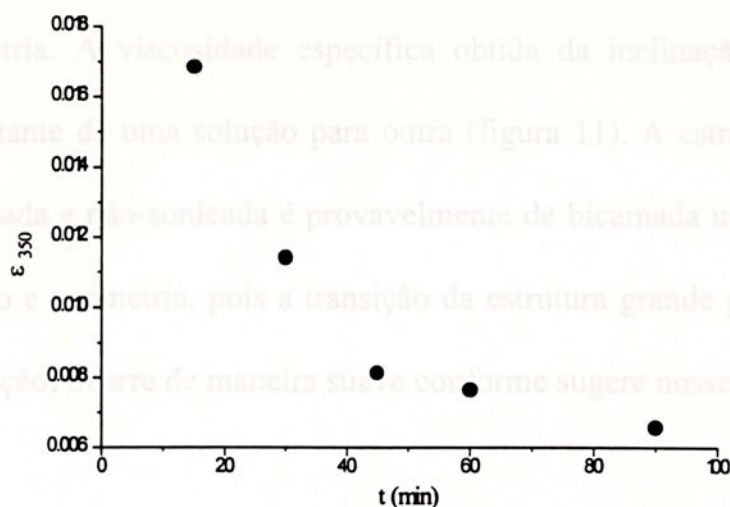


Fig. 8: Absortividade em função do tempo de sonicação da dispersão de DODAB, para $\lambda=220$ (b)



(c)

Fig. 8: Absortividade em função do tempo de sonicação da dispersão de DODAB, para $\lambda = 350\text{nm}$ (c).

Medidas de turbidez e da absortividade sozinhas não fornecem detalhes da estrutura das vesículas; a fim de comentá-las medimos a viscosidade e a condutividade da solução antes e após 90 minutos de sonicação.

Para pequenas concentrações de DODAB o tempo de escoamento da solução através do tubo capilar do viscosímetro aumenta linearmente com a concentração (figura 9). A solução não-sonicada tem coeficiente angular (viscosidade específica) muito maior do que as sonicadas (cerca de 21 vezes), refletindo a diferença estrutural, ou seja, grandes agregados quase esféricos nas soluções não-sonicadas e pequenos agregados esféricos nas sonicadas. A viscosidade relativa da solução de DODAB é claramente dependente do processo de sonicação (figura 10). A diferença na viscosidade antes e após a sonicação

também sugere que os agregados nessas soluções têm estruturas diferenciadas em tamanho e geometria. A viscosidade específica obtida da inclinação da curva média (Eq.15) difere bastante de uma solução para outra (figura 11). A estrutura das vesículas nas soluções sonicada e não-sonicada é provavelmente de bicamada unilamelar diferindo apenas no tamanho e geometria, pois a transição da estrutura grande para a pequena (no processo de sonicação) ocorre de maneira suave conforme sugere nossos resultados.

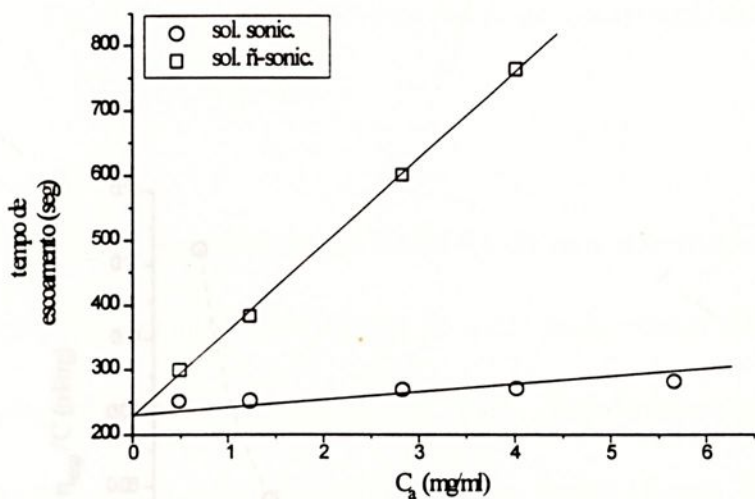


Fig. 9: Variação temporal do escoamento hidrodinâmico das soluções de DODAB sonicadas e não-sonicadas.

Fig. 11: Viscosidade específica por unidade de concentração das soluções sonicada (a)

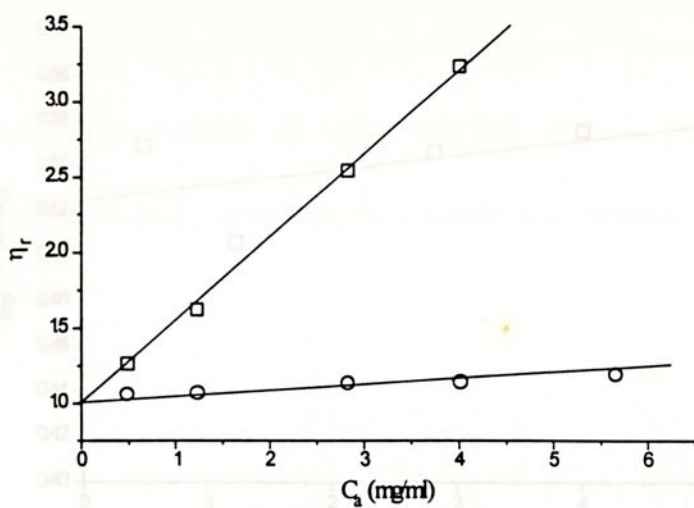
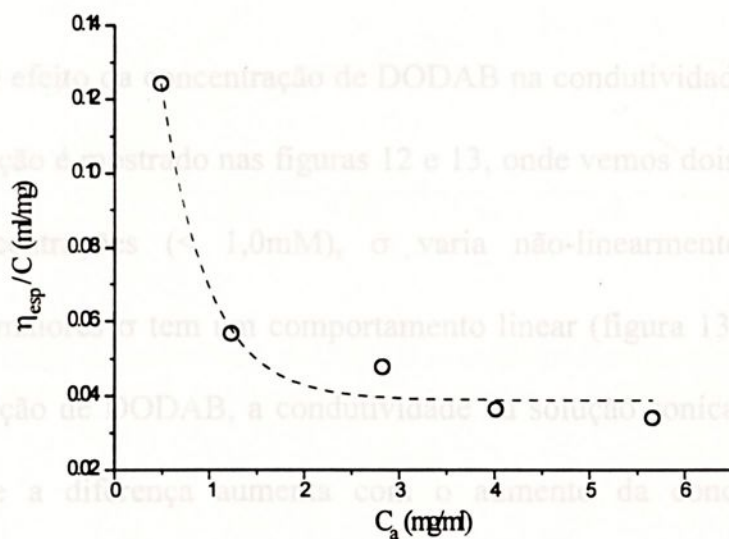


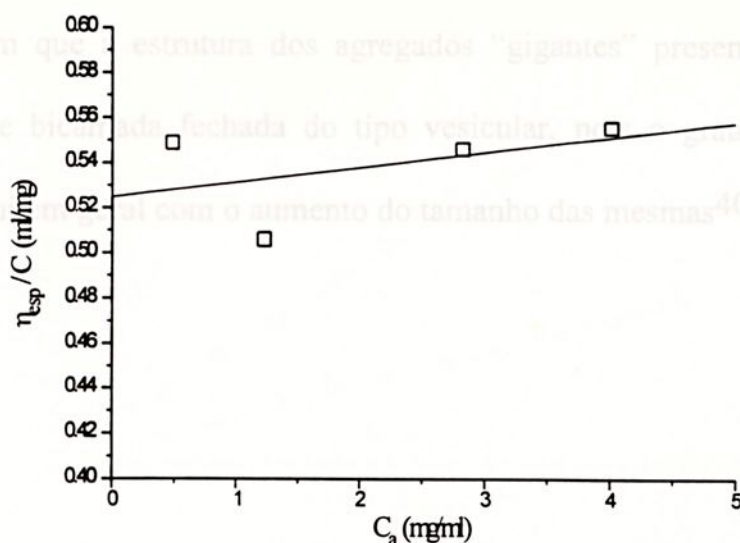
Fig. 10: Efeito da concentração de DODAB na viscosidade relativa da solução antes (□) e após sonicação (○).

Fig. 11: η_{esp}/C não-sonicada (b) em função da concentração de DODAB.



(a)

Fig. 11: Viscosidade específica por unidade de concentração das soluções sonicada (a)



(b)

Fig. 11: e não-sonicada (b) em função da concentração de DODAB.

O efeito da concentração de DODAB na condutividade (σ) da solução antes e após a sonicação é mostrado nas figuras 12 e 13, onde vemos dois comportamentos. Em pequenas concentrações ($< 1,0\text{mM}$), σ varia não-linearmente (figura 12) e em concentrações maiores σ tem um comportamento linear (figura 13). Em geral, para uma dada concentração de DODAB, a condutividade da solução sonicada é maior do que da não-sonicada e a diferença aumenta com o aumento da concentração (figura 13), refletindo novamente a diferença estrutural dos agregados nas duas soluções. Quando a concentração de DODAB tende a zero, os valores da condutividade tendem ao valor limite da água pura ($1,0\mu\text{S}$). O coeficiente angular da porção linear é 2,4 vezes maior para a solução sonicada, sugerindo que os agregados da solução não-sonicada tenha grau de

dissociação (α) menor do que a estrutura (vesicular) na solução sonicada. Estes resultados também sugerem que a estrutura dos agregados “gigantes” presentes na solução não-sonicada seja de bicamada fechada do tipo vesicular, pois o grau de dissociação das vesículas diminui em geral com o aumento do tamanho das mesmas⁴⁰.

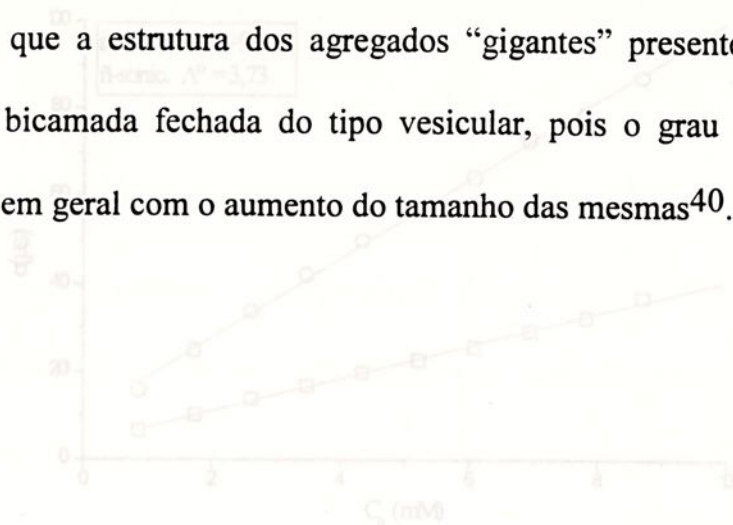


Fig. 13: Efeito da concentração de DODAB na condutividade da solução não-sonicada (□) e sonicada (○), para a região de concentração do anfífilico de 1 a 10mM.

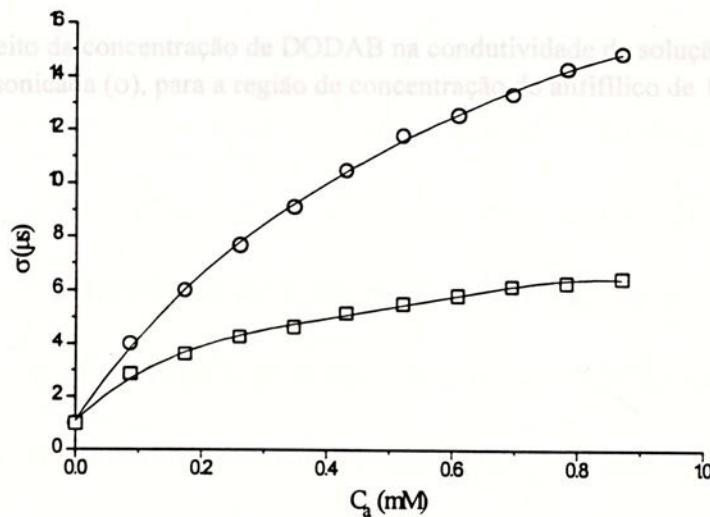


Fig. 12: Efeito da concentração de DODAB na condutividade da solução não-sonicada (□) e sonicada (○), para a região de concentração do anfífilico de 0 a 1mM.

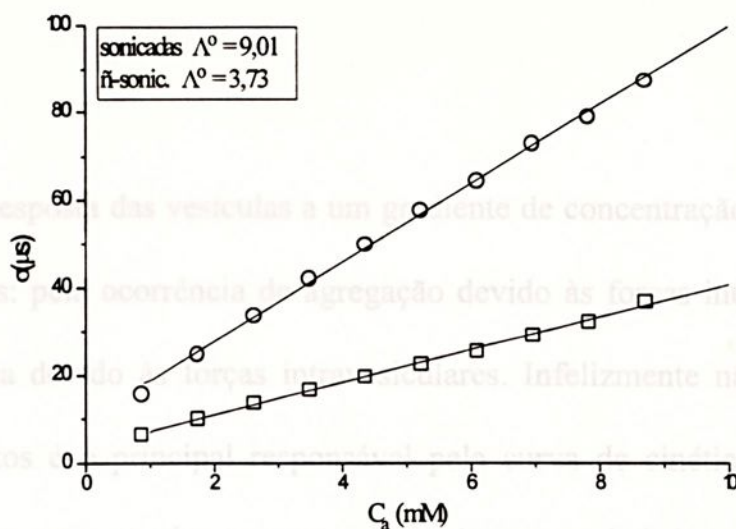


Fig. 13: Efeito da concentração de DODAB na condutividade da solução não-sonificada (□) e sonificada (○), para a região de concentração do anfifílico de 1 a 10mM.

solutos iônicos (NaCl, NaBr, etc.) e não-iônicos (uréia e D-glicose) para monitorar a resposta osmótica e cinética de agregação de vesículas unilamelares de DODAB através de medidas de turbidez (absorvância derivada de espalhamento de luz) em função do tempo pós-choque osmótico. Ao contrário de solutos iônicos, a adição de solutos não-iônicos não altera no tempo o valor da turbidez da dispersão sonificada. Essas vesículas, a exemplo das sonificadas com sonda de TI,³⁹ não respondem ao gradiente osmótico de solutos não-iônicos (figura 14a). Alternativamente, apenas solutos iônicos induzem agregação (floculação, coagulação ou fusão) de vesículas sonificadas.

Soluções de DODAB preparadas por evaporação do clorofórmio respondem tanto a solutos iônicos como a não-iônicos, e comportam-se como osmômetros ideais.³⁹ Neste trabalho, mostramos que soluções não-sonificadas de DODAB têm comportamento osmótico semelhante às clorofórmicas (figura 14b), mas são opticamente transparentes

III.2. Choque Osmótico e Cinética de Agregação em Sistemas Vesiculares

A resposta das vesículas a um gradiente de concentração de eletrólitos se dá de duas maneiras: pela ocorrência de agregação devido às forças intervesiculares e pela resposta osmótica devido às forças intravesiculares. Infelizmente não é fácil distinguir qual desses efeitos é o principal responsável pela curva de cinética de agregação. As vesículas são importantes sistemas para investigar propriedades osmóticas devido à capacidade de compartimentalizar solutos no volume aquoso interno. Utilizamos solutos iônicos (NaCl, NaBr, etc.) e não-iônicos (uréia e D-glicose) para monitorar a resposta osmótica e cinética de agregação de vesículas unilamelares de DODAB através de medidas de turbidez (absorbância derivada de espalhamento de luz) em função do tempo pós-choque osmótico. Ao contrário de solutos iônicos, a adição de solutos não-iônicos não altera no tempo o valor da turbidez da dispersão sonicada. Essas vesículas, a exemplo das sonicadas com sonda de Ti,³⁹ não respondem ao gradiente osmótico de solutos não-iônicos (figura 14a). Alternativamente, apenas solutos iônicos induzem agregação (floculação, coagulação ou fusão) de vesículas sonicadas.

Soluções de DODAB preparadas por evaporação do clorofórmio respondem tanto a solutos iônicos como a não-iônicos, e comportam-se como osmômetros ideais.³⁹ Neste trabalho, mostramos que soluções não-sonicadas de DODAB têm comportamento osmótico semelhante às clorofórmicas (figura 14b), mas são opticamente transparentes



somente as concentrações muito pequenas de surfactante ($< 0,1\text{mM}$). Esses dois tipos de solução têm também em comum o tamanho “gigante” das estruturas de vesículas unilamelares.

A cinética de agregação, geralmente medida pela variação temporal da turbidez da amostra, fornece algumas informações do comportamento osmótico e agregação das vesículas. O fato das vesículas sonicadas não se comportarem como osmômetros ideais tem sido atribuído ao pequeno volume de seu compartimento aquoso interno, e nesse caso, a variação temporal da turbidez se deve à agregação das vesículas. Assim, solutos iônicos, ao contrário de solutos não-iônicos, desestabilizam as vesículas sonicadas. Porém, uma quantidade mínima de eletrólitos é necessária para induzir agregação; essa quantidade depende do tipo de contra-íon (mas pouco ou nada do co-íon), da concentração de anfífilicos e, provavelmente, da temperatura. Na figura 14a vemos um efeito diferenciado de Br^- e Cl^- , mas não do co-íon, na cinética de agregação das dispersões sonicadas de DODAB. Na dispersão não-sonicada tanto o co-íon como o soluto não-iônico induzem reação ou interação no sistema (figura 14b).

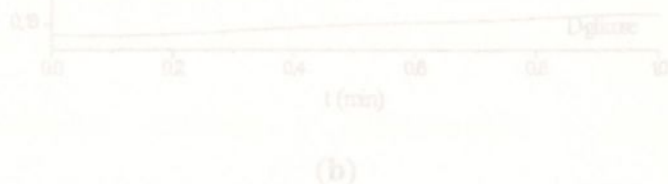
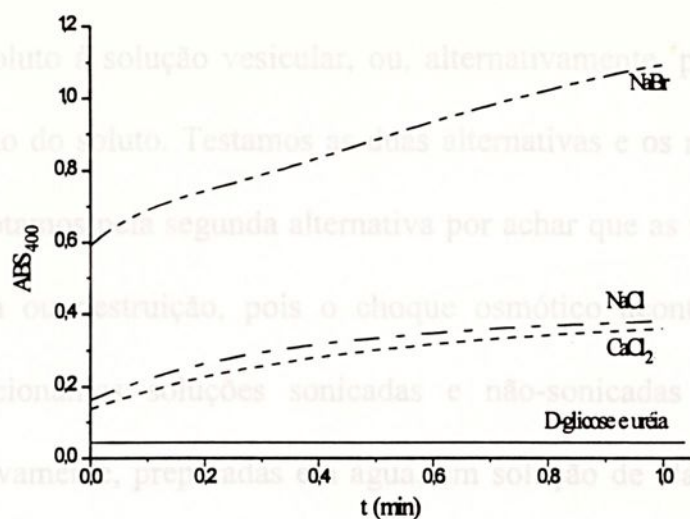
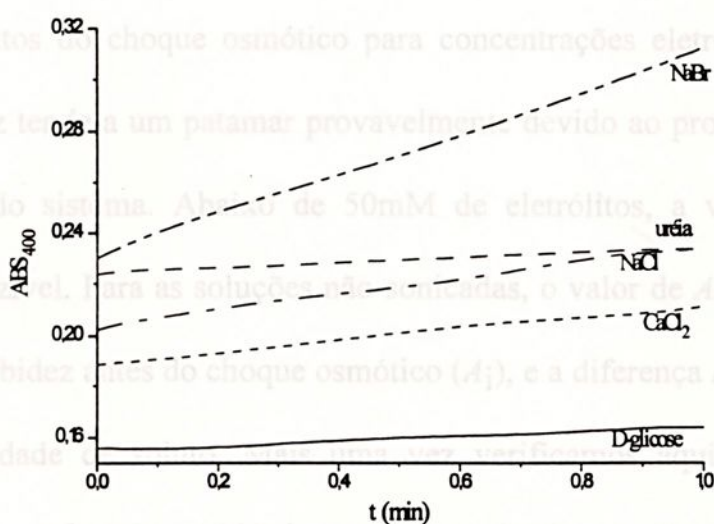


Fig. 14: Variação temporal da turbidez das amostras de soluções de DODAB sonicadas ($1,04\text{mM}$) (a) e não-sonicadas ($1,09\text{mM}$) (b) após adição em solução 100mM dos solutos mencionados.



(a)

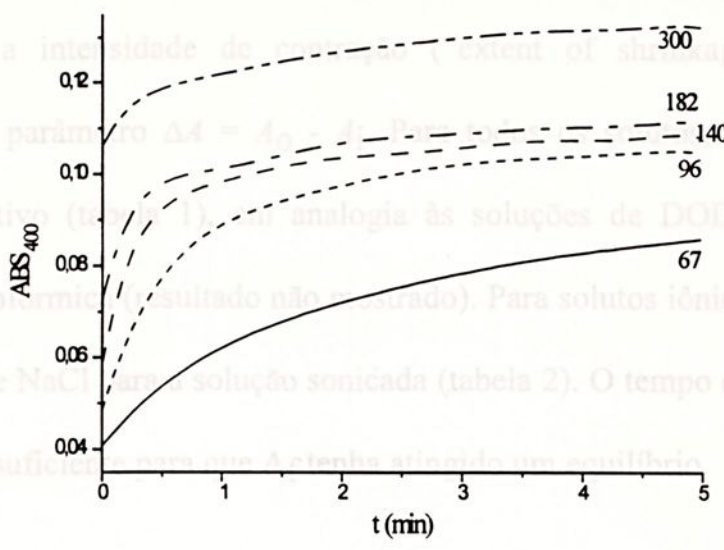


(b)

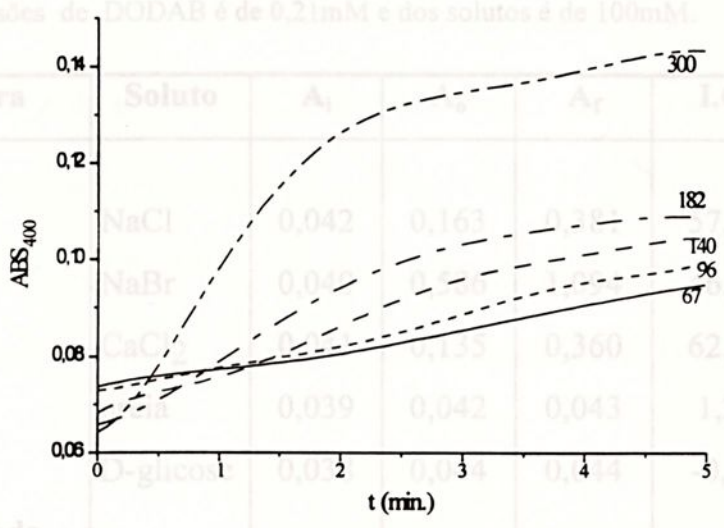
Fig. 14: Variação temporal da turbidez das amostras de soluções de DODAB sonificadas (1,04mM) (a) e não-sonificadas (1,09mM). (b) após adição em solução 100mM dos solutos mencionados.

O choque osmótico às vesículas pode ser aplicado pela adição de solução concentrada do soluto à solução vesicular, ou, alternativamente, pela adição da solução vesicular à solução do soluto. Testamos as duas alternativas e os resultados não diferem muito entre si. Optamos pela segunda alternativa por achar que as vesículas ficam menos sujeitas a ruptura ou destruição, pois o choque osmótico acontece de maneira mais homogênea. Adicionamos soluções sonicadas e não-sonicadas de DODAB 0,21 e 0,22mM, respectivamente, preparadas em água, em solução de NaCl 67, 96, 140, 182 e 300mM e monitoramos a variação temporal da turbidez (400nm) (figura 15a). Para a solução sonicada, a taxa inicial de variação da turbidez (V_0), assim como o valor da turbidez logo após o choque osmótico (A_0), aumenta com a concentração de eletrólitos. Após ca. 5 minutos do choque osmótico para concentrações eletrolíticas acima de ca. 90mM, a turbidez tende a um patamar provavelmente devido ao processo de agregação e re-estabilização do sistema. Abaixo de 50mM de eletrólitos, a variação temporal da turbidez é desprezível. Para as soluções não-sonicadas, o valor de A_0 é sempre menor do que o valor da turbidez antes do choque osmótico (A_i), e a diferença $\Delta A = A_0 - A_i$ depende do tipo e quantidade de soluto. Mais uma vez verificamos aqui um comportamento diferenciado das soluções sonicada e não-sonicada e alguma semelhança no comportamento das soluções não-sonicada e preparada por evaporação clorofórmica.

Fig. 15: Variação temporal da turbidez das amostras de soluções de DODAB sonicadas (0,21mM) (a) e não-sonicadas (0,22mM) (b), após adição em solução de NaCl nas concentrações citadas.



(a)



(b)

Fig. 15: Variação temporal da turbidez das amostras de soluções de DODAB sonicadas (0,21mM) (a) e não-sonicadas (0,22mM) (b), após adição em solução de NaCl nas concentrações citadas.

As tabelas 1 e 2 mostram alguns parâmetros obtidos da variação temporal da turbidez, como a intensidade de contração (“extent of shrinkage”)⁴¹ $I.C. \equiv (1 - A_0/A_f) \times 100$, e o parâmetro $\Delta A = A_0 - A_i$. Para todos os solutos, ΔA da solução não-sonicada é negativo (tabela 1), em analogia às soluções de DODAC preparadas por vaporização clorofórmica (resultado não mostrado). Para solutos iônicos I.C. diminui com a concentração de NaCl para a solução sonicada (tabela 2). O tempo de 29h foi observado como um tempo suficiente para que A_f tenha atingido um equilíbrio.

Tab. 1: Turbidez ($\lambda = 400\text{nm}$) das soluções sonicadas e não-sonicadas de DODAB antes e após adição a diferentes solutos. A_f foi medido após 1min. da adição. A concentração das dispersões de DODAB é de 0,21mM e dos solutos é de 100mM.

Amostra	Soluto	A_i	A_0	A_f	I.C.	$A_0 - A_i$
Sonicada	NaCl	0,042	0,163	0,381	57,14	0,121
	NaBr	0,040	0,586	1,094	46,97	0,545
	CaCl ₂	0,041	0,135	0,360	62,40	0,094
	uréia	0,039	0,042	0,043	1,26	0,003
	D-glicose	0,038	0,044	0,044	-0,53	0,006
Não-sonicada	NaCl	0,287	0,204	0,234	12,67	-0,083
	NaBr	0,285	0,230	0,312	26,74	-0,055
	CaCl ₂	0,288	0,189	0,211	10,31	-0,099
	uréia	0,287	0,224	0,235	4,44	-0,062
	D-glicose	0,287	0,156	0,164	5,23	-0,132

Tab. 2: Valores da turbidez imediatamente (A_o) e 29h após (A_f) a adição da solução sonicada de DODAB (0,22mM) em soluções de NaCl (mM) a várias concentrações.

[NaCl]	A_i	A_o	A_f	I.C.	$A_o - A_i$
067	0,037	0,0456	0,1031	925,70	0,0086
096	0,035	0,0546	0,1165	811,50	0,0196
182	0,038	0,0843	0,1363	671,82	0,0463
300	0,036	0,0957	0,1937	466,86	0,0597

A tabela 3 ilustra o efeito da adição de pequena quantidade de diferentes eletrólitos na turbidez. NaCl e KCl apresentam valores de ΔA praticamente nulos. Valores maiores de ΔA foram obtidos com NaBr e KBr, enquanto que apenas 2mM de KI são necessários para destruir as vesículas. Para NaCl e KCl causar variação significativa na turbidez são necessárias concentrações acima de 50mM. O efeito da força iônica em ΔA cresce com a sequência $Cl^- < Br^- < I^-$ para os contra-íons, e $Na < K$ para os co-íons, embora o co-íon tenha efeito mínimo na cinética de agregação (tabela 3).

Tab. 3: Valores de turbidez de soluções de DODAB antes e imediatamente após a adição de diferentes eletrólitos.

Sal	[Sal]/mM	A_i	A_o	ΔA
NaBr	7,44	0,086	0,489	0,404
	3,49	0,086	0,202	0,116
	0,99	0,086	0,125	0,039
KBr	7,44	0,088	0,563	0,475
	3,49	0,088	0,340	0,252
	0,99	0,088	0,160	0,072
KI	0,50	0,088		> 2,0
NaCl	≤ 10	0,088		0,0
KCl	≤ 10			0,0

A figura 16 mostra que a intensidade de contração das vesículas de DODAB sonicadas a banho não é função linear do gradiente de concentração de NaCl, não obedecendo, portanto, a lei de Boyle-Van't Hoff.⁴¹ Assim, as vesículas sonicadas a banho, a exemplo das sonicadas com sonda, não comportam-se como osmômetro ideal, sugerindo que a estrutura das vesículas obtidas pelos dois métodos de sonicação é a mesma. O raio hidrodinâmico dessas vesículas também é da mesma ordem de grandeza.¹²

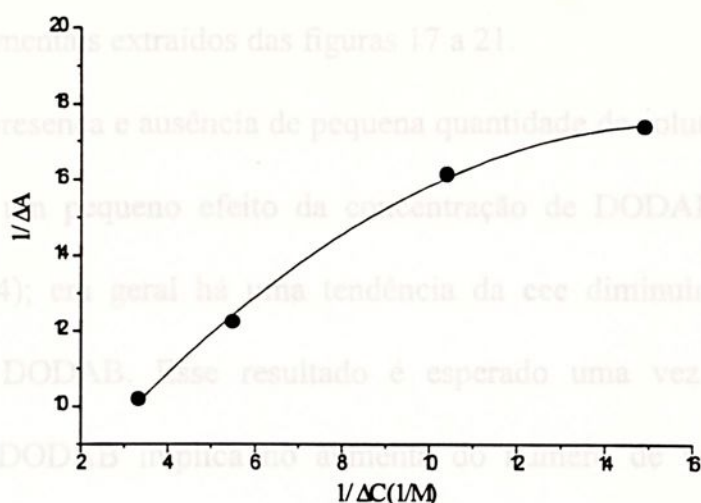


Fig.16: Intensidade de contração das vesículas de DODAB preparadas em água em função do inverso do gradiente de concentração de NaCl.

Quando adicionamos solução sonicada de DODAX em solução eletrolítica, a partir de uma determinada concentração de eletrólitos (**ccc**) ocorre coagulação. Obtivemos a concentração crítica de coagulação (**ccc**), ou menor concentração eletrolítica que provoca a coagulação de vesículas de DODAB preparadas em diferentes solutos iônicos e não-iônicos (D-glicose, uréia, NaCl e CaCl_2) através do gráfico de $\log V_0$ vs. $\log C_s$, onde V_0 é a taxa inicial de variação temporal da turbidez e C_s é a concentração de eletrólitos. As figuras 17-21 ilustram alguns desses gráficos. Investigamos o efeito da concentração de DODAB na **ccc** e, utilizando dois métodos diferentes (Eqs. 3 e 9), estimamos o potencial de superfície (ou potencial de Stern) das vesículas. Os dois métodos baseiam-se

na teoria DLVO, mas levam ao valor do potencial de superfície a partir de diferentes parâmetros experimentais extraídos das figuras 17 a 21.

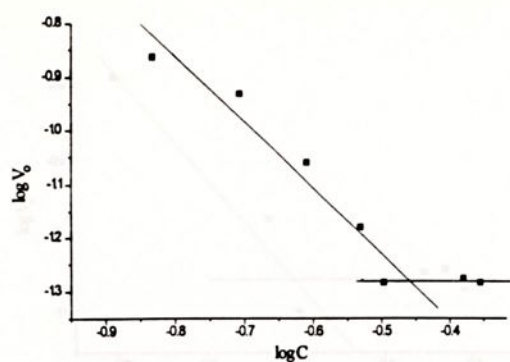
Na presença e ausência de pequena quantidade de soluto iônico e não-iônico (1mM), notamos um pequeno efeito da concentração de DODAB na *ccc* da solução sonicada (tabela 4); em geral há uma tendência da *ccc* diminuir com o aumento da concentração de DODAB. Esse resultado é esperado uma vez que o aumento da concentração de DODAB implica no aumento do número de vesículas, diminuindo, portanto, a distância média entre elas e aumentando a probabilidade de choque. A figura 22 ilustra essa tendência para a dispersão em água pura, uréia, D-glicose, NaCl e CaCl₂. Na presença de solutos iônicos e não-iônicos (1,0mM), os valores da *ccc* oscilam em torno da curva média para as vesículas em água pura (figura 22), de modo que dentro do erro experimental, a *ccc* depende pouco do soluto. No caso do soluto iônico (especialmente CaCl₂), provavelmente a variação no tamanho das vesículas influencia o valor da *ccc*, pois, devido ao efeito da blindagem eletrostática, esperaríamos uma diminuição na *ccc*; essa diminuição é, no entanto, observada para NaCl (figura 22). Solutos não-iônicos não alteram o tamanho das vesículas e causam pouco efeito na *ccc*. Para concentração de vesículas abaixo de 0,1mM e acima de 1,5mM não foi possível determinar V_0 , e portanto a *ccc*, devido ao comportamento desordenado das curvas. Em todos os casos analisados, a velocidade inicial de floculação (V_0) aumenta com a concentração de DODAB. O aumento de V_0 , significa uma queda no fator de estabilidade ($W \propto 1/V_0$). Abaixo do valor

satisfatoriamente para sistemas coloidais.²³

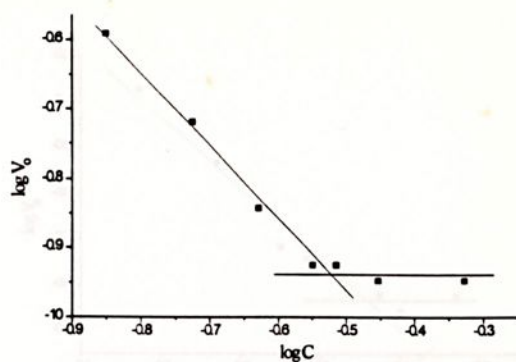
da ccc, V_0 aumenta consideravelmente, enquanto que acima da ccc V_0 é essencialmente constante (tabela 4).

Obtivemos o potencial de superfície das vesículas utilizando as duas aproximações à teoria DLVO, descritas pelas Eqs.3 e 9. O potencial de superfície, e a ccc, em geral diminuem com a concentração de anfifílico (tabela 4), resultado esperado de acordo com a teoria de Poisson-Boltzmann para vesículas esféricas carregadas em solução eletrolítica⁴², e por medidas do potencial zeta.⁴⁰ O aumento de C_a implica na diminuição do volume aquoso externo disponível para os contra-íons se acomodarem, tendendo a migrar para a superfície carregada e blindar o potencial eletrostático na região⁴². Com base nesta teoria propomos o método utilizado pela (Eq.3), dado que uma análise mais cuidadosa do valor do potencial de superfície obtido pelo método (Eq.9) mostra alguma inconsistência na aplicação do mesmo. Enquanto no primeiro método (Eq.3) o potencial de superfície (ϕ_0) diminui com o aumento da concentração de DODAB, no segundo método (Eq.9) ϕ_0 aumenta. Em ambos os casos ϕ_0 tende a diminuir na presença de eletrólitos suporte, porém essa diminuição é bem menor do que a prevista pela teoria de Poisson-Boltzmann.⁴² Nos dois casos ϕ_0 é sub-estimado, e é aproximadamente duas vezes maior quando obtido pela Eq.3. O potencial zeta dessas vesículas³⁹ é cerca de três vezes maior do que os aqui apresentados.

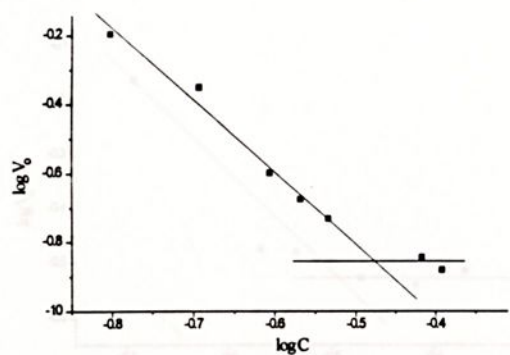
Apesar dessas discrepâncias, o método alternativo (Eq.3), em comparação ao usualmente utilizado (Eq.9), apresenta melhores resultados. Este último tem sido aplicado satisfatoriamente para sistemas coloidais.²³



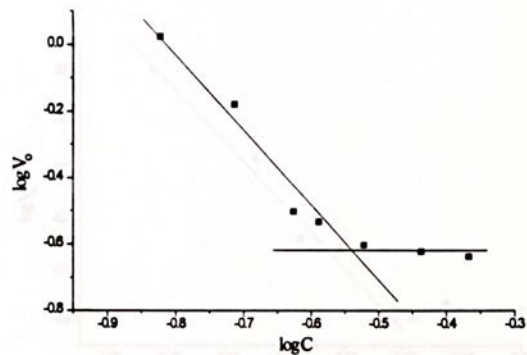
a)



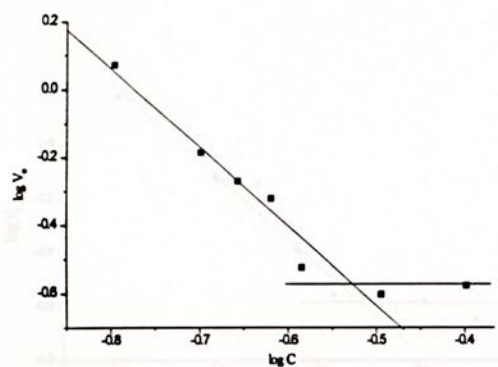
b)



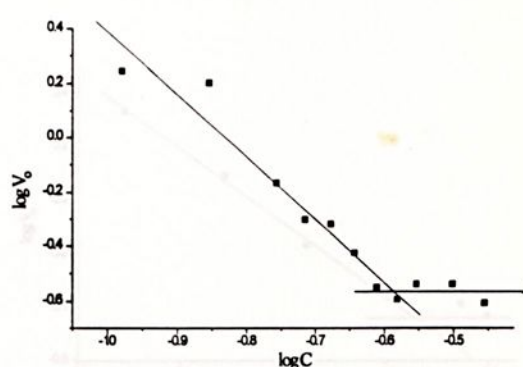
c)



d)

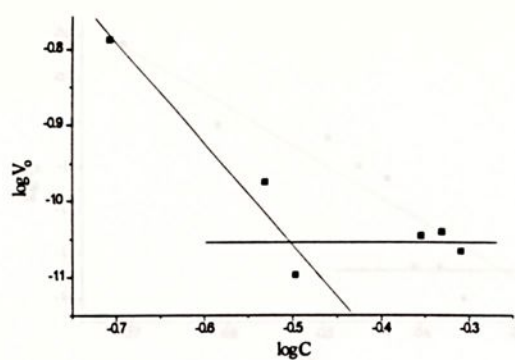


e)

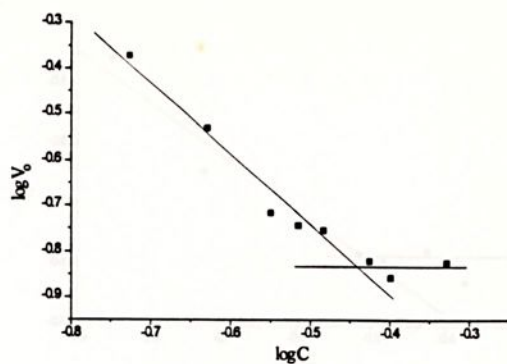


f)

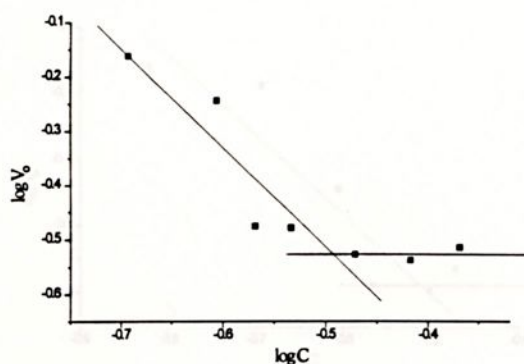
Fig. 17: Gráficos de $\log V_0$ vs. $\log C$, para vesículas de DODAB preparadas em água pura, os gráficos acima correspondem a 0,1 (a); 0,3 (b); 0,5 (c); 0,7 (d); 1,0 (e) e 1,5mM (f), de anfífilicos



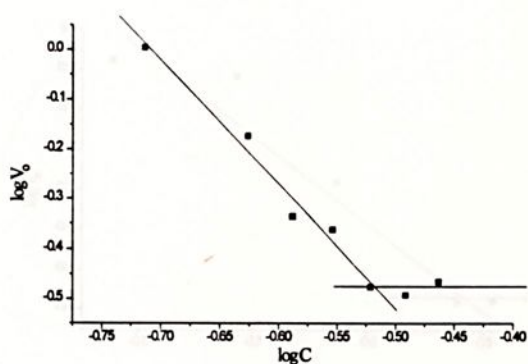
a)



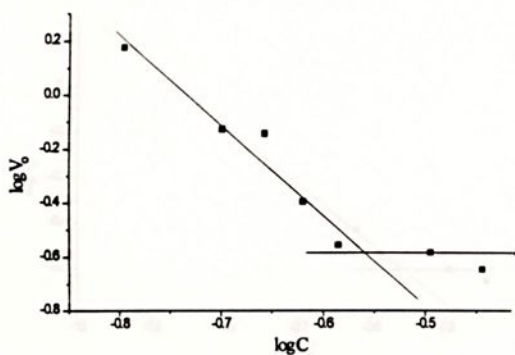
b)



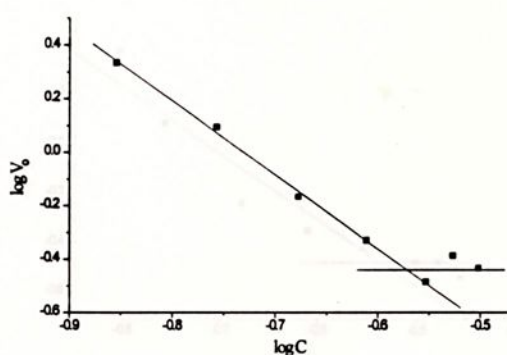
c)



d)

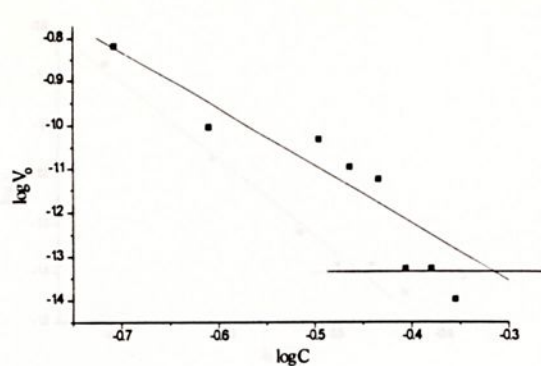


e)

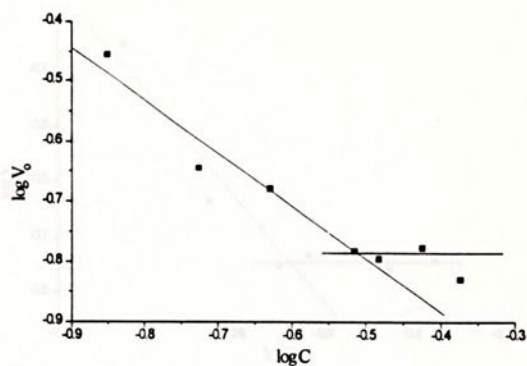


f)

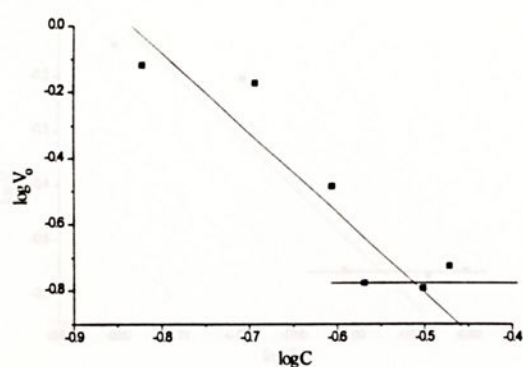
Fig. 18: Gráficos de $\log V_O$ vs. $\log C$, para vesículas de DODAB preparadas em D- Glicose (1mM), os gráficos acima correspondem a 0,1 (a); 0,3 (b); 0,5 (c); 0,7 (d); 1,0 (e) e 1,5mM (f), de anfífilicos



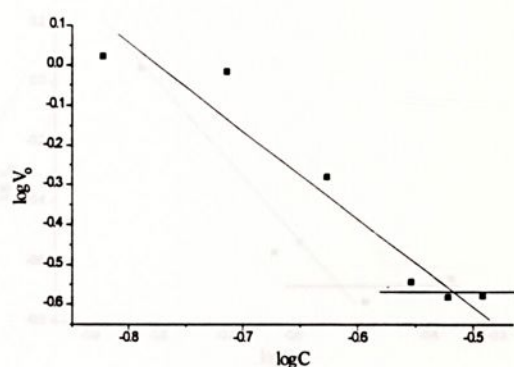
a)



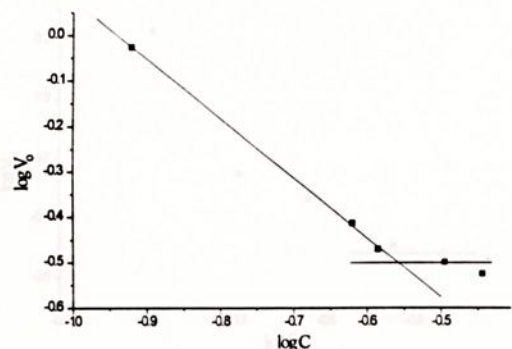
b)



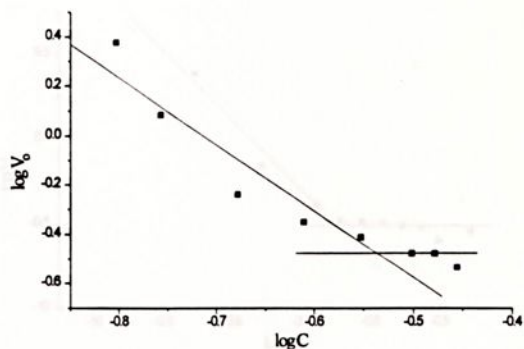
c)



d)

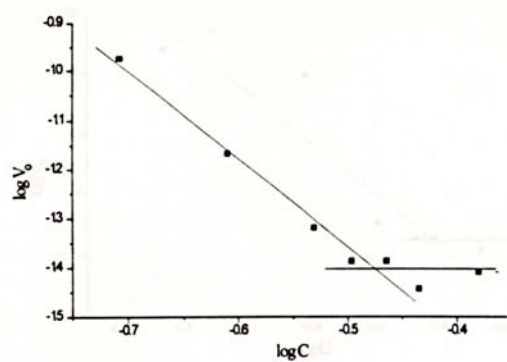


e)

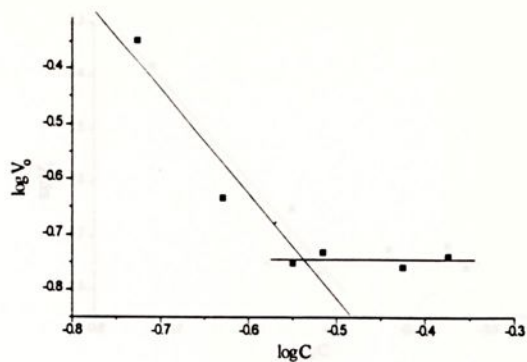


f)

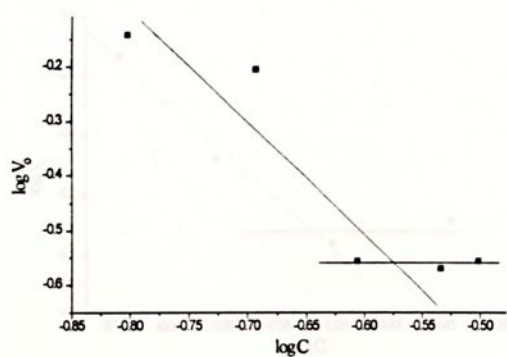
Fig. 19: Gráficos de $\log V_O$ vs. $\log C$, para vesículas de DODAB preparadas em Uréia (1mM), os gráficos acima correspondem a 0,1 (a); 0,3 (b); 0,5 (c); 0,7 (d); 1,0 (e) e 1,5mM (f), de anfífilicos



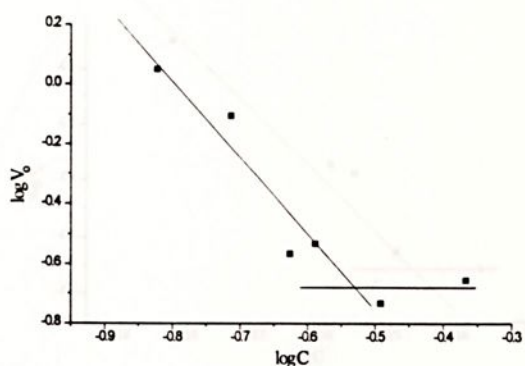
a)



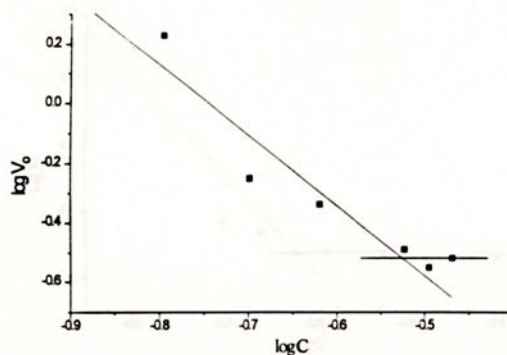
b)



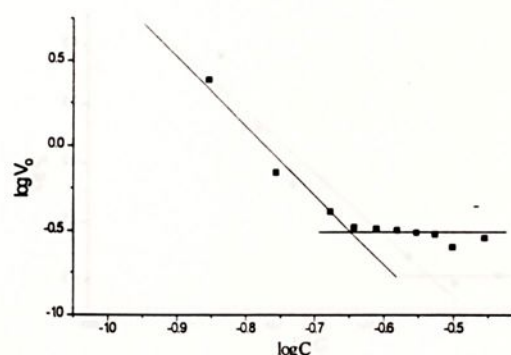
c)



d)

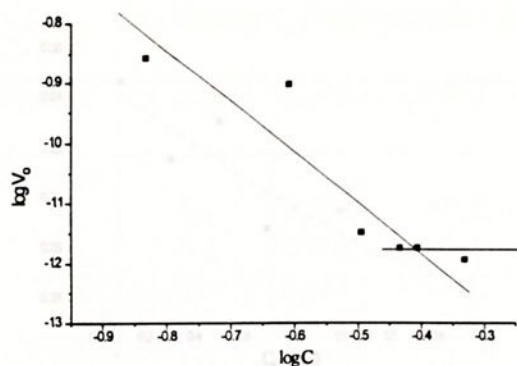


e)

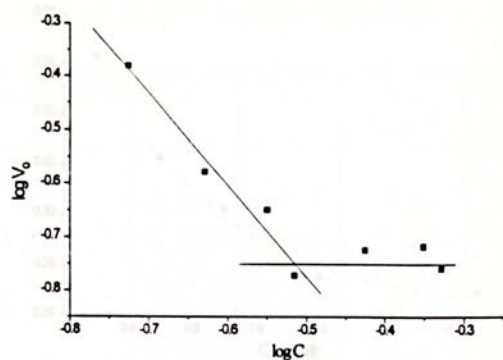


f)

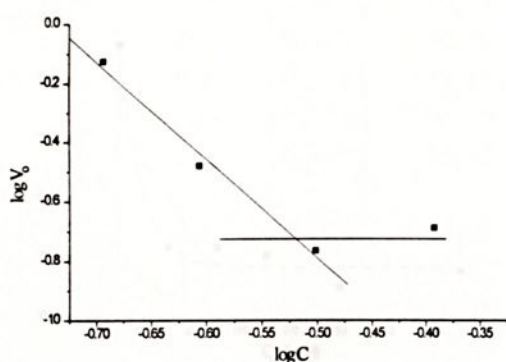
Fig. 20: Gráficos de $\log V_0$ vs. $\log C$, para vesículas de DODAB preparadas em NaCl (1mM), os gráficos acima correspondem a 0,1 (a); 0,3 (b); 0,5 (c); 0,7 (d); 1,0 (e) e 1,5mM (f), de anfífilos



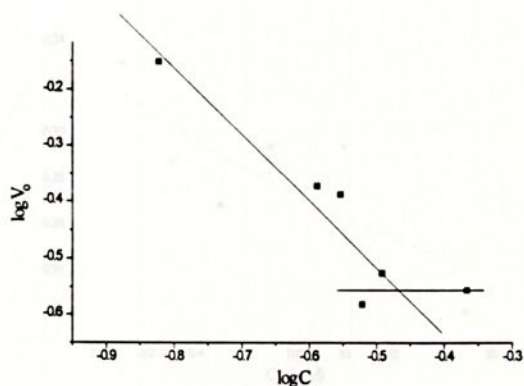
a)



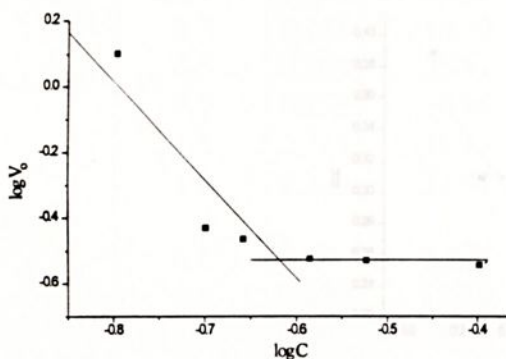
b)



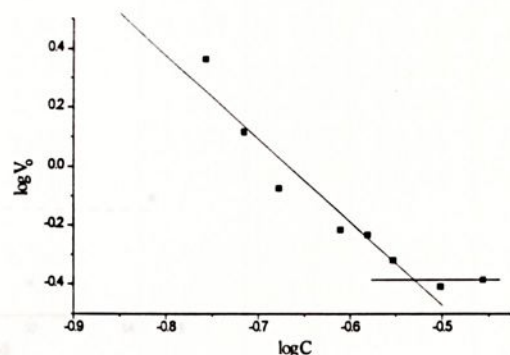
c)



d)



e)



f)

Fig. 21: Gráficos de $\log V_0$ vs. $\log C$, para vesículas de DODAB preparadas em CaCl_2 (1mM), os gráficos acima correspondem a 0,1 (a); 0,3 (b); 0,5 (c); 0,7 (d); 1,0 (e) e 1,5mM (f), de anfífilicos

17-21.

Tab. 4: Tabela obtida através de dados das figs. 17 e 21; C_a , concentração de anfífilicos; ccc, concentração crítica de coagulação; V_o^{max} , velocidade máxima de contração; $d \log V_o / d \log C_a$, inclinação da reta $\log V_o$ vs. $\log C_a$; e ψ_0 potencial de superfície.

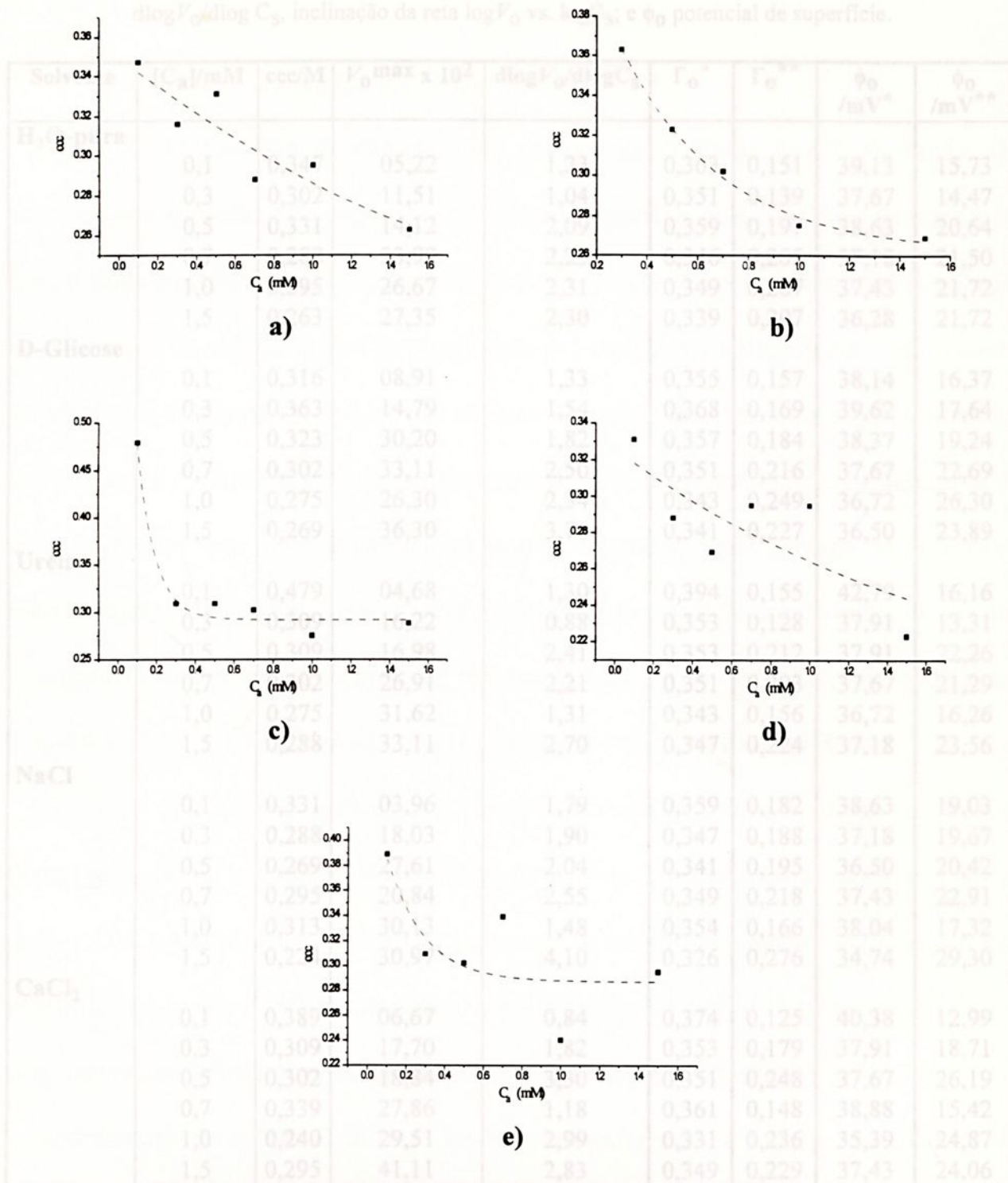


Fig. 22: Gráficos de ccc vs. a concentração de anfífilicos, para vesículas de DODAB preparadas na presença de diferentes eletrólitos e/ou macromoléculas, como: a) água pura, b) D-glicose (1mM), c) uréia (1mM), d) NaCl (1mM) e e) CaCl_2 (1mM). Estes gráficos correspondem as ccc_s obtidas nas figuras 17-21.

Tab. 4: Tabela obtida através de dados das figs. 17 a 21, C_a , concentração de anfílicos; ccc, concentração crítica de coagulação; $V_0^{\text{máx}}$, velocidade máxima de contração; $d\log V_0/d\log C_s$, inclinação da reta $\log V_0$ vs. $\log C_s$; e ϕ_0 potencial de superfície.

Solvente	$[C_a]/\text{mM}$	ccc/M	$V_0^{\text{máx}} \times 10^2$	$d\log V_0/d\log C_s$	Γ_0^*	Γ_0^{**}	ϕ_0 /mV*	ϕ_0 /mV**
H₂O-pura	0,1	0,347	05,22	1,23	0,363	0,151	39,13	15,73
	0,3	0,302	11,51	1,04	0,351	0,139	37,67	14,47
	0,5	0,331	14,12	2,09	0,359	0,197	38,63	20,64
	0,7	0,288	23,99	2,25	0,346	0,205	37,18	21,50
	1,0	0,295	26,67	2,31	0,349	0,207	37,43	21,72
	1,5	0,263	27,35	2,30	0,339	0,207	36,28	21,72
D-Glicose	0,1	0,316	08,91	1,33	0,355	0,157	38,14	16,37
	0,3	0,363	14,79	1,54	0,368	0,169	39,62	17,64
	0,5	0,323	30,20	1,82	0,357	0,184	38,37	19,24
	0,7	0,302	33,11	2,50	0,351	0,216	37,67	22,69
	1,0	0,275	26,30	2,34	0,343	0,249	36,72	26,30
	1,5	0,269	36,30	3,76	0,341	0,227	36,50	23,89
Uréia	0,1	0,479	04,68	1,30	0,394	0,155	42,79	16,16
	0,3	0,309	16,22	0,88	0,353	0,128	37,91	13,31
	0,5	0,309	16,98	2,41	0,353	0,212	37,91	22,26
	0,7	0,302	26,91	2,21	0,351	0,203	37,67	21,29
	1,0	0,275	31,62	1,31	0,343	0,156	36,72	16,26
	1,5	0,288	33,11	2,70	0,347	0,224	37,18	23,56
NaCl	0,1	0,331	03,96	1,79	0,359	0,182	38,63	19,03
	0,3	0,288	18,03	1,90	0,347	0,188	37,18	19,67
	0,5	0,269	27,61	2,04	0,341	0,195	36,50	20,42
	0,7	0,295	20,84	2,55	0,349	0,218	37,43	22,91
	1,0	0,313	30,13	1,48	0,354	0,166	38,04	17,32
	1,5	0,224	30,97	4,10	0,326	0,276	34,74	29,30
CaCl₂	0,1	0,389	06,67	0,84	0,374	0,125	40,38	12,99
	0,3	0,309	17,70	1,82	0,353	0,179	37,91	18,71
	0,5	0,302	18,84	3,30	0,351	0,248	37,67	26,19
	0,7	0,339	27,86	1,18	0,361	0,148	38,88	15,42
	1,0	0,240	29,51	2,99	0,331	0,236	35,39	24,87
	1,5	0,295	41,11	2,83	0,349	0,229	37,43	24,06

todos os solutos foram utilizados a 1mM

a é estimado em 250 Å

* valores do potencial obtido pela eq. (3)

** valores do potencial obtido pela eq. (9)



III.3. Equilíbrio de Diálise Aplicado às Vesículas Sonicadas de DODAB

Os lados 1 e 2 referem-se aos compartimentos contendo a solução e o solvente, respectivamente.

III.3.1. Equilíbrio de Diálise

O processo de sonicação da solução de DODAB leva à formação de estruturas de vesículas e de fragmentos. Utilizamos equilíbrio de diálise para determinar a quantidade de monômeros na forma de fragmentos, e de íons (co- e contra-íons) livres em solução a fim de estimar o grau de dissociação das vesículas e correlacionar com valores do potencial de superfície obtidos por cinética de agregação. Admitimos que o interior das vesículas é eletricamente neutro (potencial eletrostático constante), ou seja, que a carga total dos íons no compartimento aquoso interno é igual a carga da interface monocamada interna com a água. Essa aproximação é razoável de acordo com a teoria de Poisson-Boltzmann aplicada para esse sistema.⁴² Utilizamos membranas de diálise de “cut-off” 3,5 e 14k e verificamos que os resultados independem desse parâmetro.

Inicialmente dialisamos a solução sonicada de DODAB contra o solvente (água) para obter o tempo ideal de equilíbrio do sistema. Testamos vários tempos na faixa de 2 a 22h. Após a diálise, obtivemos a quantidade de anfifílico através da dosagem do contra-íon ou co-íon nos dois compartimentos da câmara de diálise. O sistema apresentou uma certa dependência com tempo de diálise, sendo que a concentração de anfifílicos no compartimento do solvente (lado 2) tende a aumentar com o tempo de diálise para concentração inicial de vesículas de DODAB (5mM) (tabela 5).

Tab. 5: Concentração de DODAB nos dois compartimentos após o tempo t de diálise. Os lados 1 e 2 referem-se aos compartimentos contendo a solução e o solvente, respectivamente.

t (h)	[lado 1]*	[lado 2]*
5	4,48	0,177
5,5	4,72	0,236
6	4,72	0,295
10	4,86	0,186
22	4,96	0,248

* concentração em mM

A quantidade de monômeros na forma de vesículas ou fragmentos nos lados 1 e 2 é mostrada na tabela 6 para diferentes concentrações de DODAB. Utilizamos um tempo de diálise nunca menor que 4h. A concentração final de monômeros no lado 2 aumenta com a concentração total de anfifílico dialisado, mas a percentagem no lado 2 diminui e a fração de monômeros livres na solução sonicada não é, portanto, superior a 12%. A concentração de anfifílicos no lado 2, em todos os casos, nunca é maior do que 0,25mM. Somando as concentrações do lado 1 e 2, e descontando da concentração total dialisada, verificamos que uma fração de até 12% de DODAB fica retida na membrana ou adsorbida na parede da câmara.

Tab. 6: Valores da concentração em mM de DODAB nos lados 1 e 2, após a diálise da solução sonicada contra água pura.

C_a (mM)	[lado 1]	[lado 2]	lado 1 (%)	lado 2 (%)	t (h)
1,12	0,992	0,124	88,89	11,11	22
	0,992	0,062	88,89	5,56	10
2,48	2,11	0,173	85,08	6,98	22
	2,23	0,124	89,91	5,00	10
5,21	4,86	0,186	93,28	3,57	10
	4,96	0,248	95,20	4,76	22
8,97	8,26	0,236	92,08	2,63	4,5
	8,26	0,224	92,08	2,50	6
9,92	9,42	0,217	94,96	2,19	14
	9,42	0,173	94,96	1,74	14
12,63	10,62	0,177	84,09	1,40	5
	10,62	0,206	84,09	1,63	6
15,34	14,40	0,236	93,87	1,54	4,5
	14,63	0,236	95,37	1,54	5

A existência de fragmentos nas solução sonicadas de DODAX foi verificada anteriormente por Pansu et al.¹⁵ e por Feitosa et al.¹² utilizando diferentes técnicas. Segundo Pansu et al., ca. 90% de DODAC estão na forma de fragmentos na solução sonicada a sonda. Utilizando espalhamento de luz, Feitosa et al. mediram o raio hidrodinâmico das vesículas e dos fragmentos na solução (DODAB) sonicada a banho e verificaram que a contribuição maior para a luz espalhada provém da população de

vesículas e não de fragmentos. Os nossos resultados indicam, portanto, a existência de duas populações em equilíbrio na solução sonicada, uma de vesículas e a outra de fragmentos, com uma fração significativamente maior de vesículas. A presença de fragmentos de agregados de bicamada parece ser, portanto, uma característica intrínseca das soluções sonicadas (a banho ou sonda) de DODAX. Detectamos fragmentos de bicamada mesmo após três sucessivas diálises. Em outras palavras, soluções de DODAX são polidispersas, e o grau de polidispersidade depende da temperatura e da concentração de anfifílico e de eletrólitos.¹²

III.3.2- Equilíbrio Donnan

Medimos a razão de íons Na^+ nos dois compartimentos da câmara (razão de Donnan). Inicialmente, no compartimento 1 tínhamos a solução sonicada de DODAB e no compartimento 2 solução de NaCl, ambas as concentrações e volumes conhecidos. Colocamos a câmara em rotação até o sistema atingir o equilíbrio no qual o potencial químico das partículas difusíveis nos dois lados são iguais. Antes do equilíbrio, a diferença de potencial químico das partículas difusíveis é a responsável pela migração das espécies. Através da razão de Donnan (r_D) obtemos o potencial de Donnan (Ψ_D) (Eq.13) e o grau de dissociação (α) (Eq.12) para uma dada concentração de DODAB (10mM).

A tabela 7 mostra o efeito do tempo de diálise na razão de Donnan para uma concentração inicial de DODAB e de NaCl iguais a 10mM e 2mM respectivamene. De acordo com esses resultados, um tempo mínimo de 4h é necessário para o sistema



Tab.8: Valores da razão r_D , do potencial de Donnan (Ψ_D) e do grau de dissociação (α), para diferentes concentrações de NaCl (mM).
A concentração total de DODAB é constante igual a 10mM.

[NaCl]	[Na ⁺] ₁	[Na ⁺] ₂	r_D	α	Ψ_D/mV
0,90	0,20	0,40	2,00	0,12	18,02
2,10	0,80	1,13	1,41	0,16	8,93
4,08	1,67	2,00	1,20	0,15	4,74
6,63	2,93	3,37	1,15	0,19	3,63
10,6	5,10	5,27	1,03	0,06	0,77

A tabela 8 mostra também valores da “valência”, ou grau de dissociação (α) das vesículas obtidos para diferentes concentrações de NaCl. Estes valores apresentam-se consistentes com a literatura⁴⁰ para as concentrações de sal menores que 7mM, e da ordem de até três vezes menor para a concentração salina em torno de 10mM.

condutividade molar relativamente às vesículas pequenas sonicadas, bem como no comportamento osmótico e/ou cinético análogas às soluções clorofórmicas.

5) O grau de dissociação e, portanto, o potencial de superfície das vesículas diminui com o aumento da concentração de DODAB, conforme previsto pela teoria de Poisson-Boltzmann. Ao contrário da Eq.9, a Eq.3 fornece valores consistentes do potencial de superfície das vesículas.

IV. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, enumeramos as seguintes conclusões:

- 1) As vesículas formadas pelos métodos de sonicação a banho e sonda de Ti são indistinguíveis em relação as propriedades apresentadas.
- 2) As dispersões sonicadas a banho ou sonda consistem de estruturas de vesículas unilamelares pequenas (com raio entre 25 a 50nm) e de fragmentos de bicamada, com a concentração de monômeros na forma de fragmentos não superior a 0,3mM.
- 3) O efeito do co-íon suporte (Na^+) e soluto não-iônico (uréia, D-glicose) na cinética de agregação e no comportamento osmótico das vesículas é desprezível nas soluções sonicadas mas não nas soluções não-sonicadas.
- 4) Antes da sonicação os anfifílicos agregam-se provavelmente em estruturas de vesículas unilamelares grandes e quase esféricas. Essa estrutura reflete nos valores de viscosidade e



condutividade molar relativamente às vesículas pequenas sonicadas, bem como no comportamento osmótico e/ou cinético análogas às soluções clorofórmicas.

5) O grau de dissociação e, portanto, o potencial de superfície das vesículas diminui com o aumento da concentração de DODAB, conforme previsto pela teoria de Poisson-Boltzmann. Ao contrário da Eq.9, a Eq.3 fornece valores consistentes do potencial de superfície das vesículas.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. E. Gorter e F. Grendel *On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood*. *P. exp. Med.* 41(1925)439.
2. J. F. Danielli e H. A. Davson *A contribution to the theory of permeability of thin films*. *P. cell. comp. Physiol.* 5(1935)495.
- 3.S. J. Singer e G. L. Nicolson *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, N. Y. 175(1972)720.
4. A. D. Bangham, M. M. Standish e J. C. Watkins *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238.
5. (a) F. Jr., Szoka e D. Papahadjopoulos *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 (1980) 467. (b) D.D. Lasic *La Recherche* 20 (1989) 904
6. T. Kunitake e Y. Okahata *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 3860.
7. T. Kunitake, Y. Okahata, K. Tamaki, F. Kumamaru e M. Takayanag *Chem. Lett.* (1977) 387.
8. R. A. Mortara, F. H. Quina e H. Chaimovich *Biochem. Biophys. Res. Commun* 81 (1978) 1080.
9. (a) A. M. Carmona-Ribeiro e H. Chaimovich *Biochim. Biophys. Acta* 733 (1983) 172. (b) A. M. Carmona-Ribeiro, L. S. Yoshida, A. Sesso e H. Chaimovich *J. Colloid Interface Sci.* 100 (1984) 433.
10. I. M. Cuccovia, R. M. V. Aleixo, R. A. Mortara, P. Berci Filho, J. B. S. Bonilha, F. H. Quina e H. Chaimovich *Tetrahedron* (1979) 3065.
11. L. D. Mayer, M. J. Hope e P. R. Cullis *Biochim. Biophys. Acta* 858 (1986) 161.
12. E. Feitosa e W. Brown (Pre-print).



13. I. M. Cuccovia, M. K. Kawamura, A. K. Srinivas e H. Chaimovich *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 365.
14. R. A. Morta, S. Swartz e H. Zhang *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 2014.
15. (a) R. B. Pansa, L. B. Loo, J. Faria e J. Rancin *New J. Chem.* **14** (1990) 105. (b) R. B. Pansa, B. Arico, J. Rancin e J. Pansa *J. Phys. Chem.* **94** (1990) 795.
16. L. Hammarström, J. Velliste, G. Karlsson e K. Edwards *Langmuir* **11** (1995) 408.
17. D. Anund e A. T. Florence *Surface Science*, Chapman and Hall, London, 1985.
18. J. Israelachvili *Intermolecular & Surface Forces*, Academic Press, London, 1992.
19. M. Swanson, E. F. **V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
20. E. Feitosa (comunicado pessoal).
21. E. J. W. Verwey e J. Th. G. Overbeek *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*.
1. E. Gorter e F. Grendel *On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. F. exp. Med.* **41**(1925)439.
2. J. F. Danielli e H. A. Davson *A contribution to the theory of permeability of thin films. F. cell. comp. Physiol.* **5**(1935)495. *Discuss. Faraday Soc.* **18** (1954) 74.
3. S. J. Singer e G. L. Nicolson *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, N. Y.* **175**(1972)720. *Midmore J. Phys. Chem.* **96** (1992) 3542.
4. A. D. Bangham, M. M. Standish e J. C. Watkins *J. Mol. Biol.* **13** (1965) 238.
5. (a) F. Jr., Szoka e D. Papahadjopoulos *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9** (1980) 467. (b) D.D. Lasic *La Recherche* **20** (1989) 904. *Biophysical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, Nova.
6. T. Kunitake e Y. Okahata *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 3860.
7. T. Kunitake, Y. Okahata, K. Tamaki, F. Kumamaru e M. Takayanag *Chem. Lett.* (1977) 387.
8. R. A. Mortara, F. H. Quina e H. Chaimovich *Biochem. Biophys. Res. Commun* **81** (1978) 1080.
9. (a) A. M. Carmona-Ribeiro e H. Chaimovich *Biochim. Biophys. Acta* **733** (1983) 172. (b) A. M. Carmona-Ribeiro, L. S. Yoshida, A. Sesso e H. Chaimovich *J. Colloid Interface Sci.* **100** (1984) 433. *J. Colloids J. Phys. Chem.* **89**(1985)5322.
10. I. M. Cuccovia, R. M. V. Aleixo, R. A. Mortara, P. Berci Filho, J. B. S. Bonilha, F. H. Quina e H. Chaimovich *Tetrahedron* (1979) 3065. *Third University Press Colloid*, 1980.
11. L. D. Mayer, M. J. Hope e P. R. Cullis *Biochim. Biophys. Acta* **858** (1986) 161.
12. E. Feitosa e W. Brown (Pre-print) *SP.* 1990 26.



13. I. M. Cuccovia, M. K. Kawamuro, A. K. Krutman e H. Chaimovich *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 365.
14. R. A. Moss, S. Swarup e H. Zhang *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 2914.
15. (a) R. B. Pansu, Liu Lan, J. Faure e J. Roncin *New J. Chem.* **14** (1990) 105. (b) R. B. Pansu, B. Arrio, J. Roncin e J. Faure *J. Phys. Chem.* **94** (1990) 796.
16. L. Hammarström; I. Velikian, G. Karlsson e K. Edwards *Langmuir* **11** (1995) 408.
17. D Attwood e A. T. Florence *Surfactant Systems*, Chapman and Hall, Londres, 1985.
18. J. Israelachvili *Intermolecular & Surface Forces*, Academic Press, Londres, 1992.
19. M. Swanson, E. Feitosa, M. Algren e W. Brown "Sphere-to-rod transition of the octadecyltrimethylammonium bromide micelles induced by NaBr" (Pre-print).
20. E. Feitosa (comunicado pessoal).
21. E. J. W. Verwey e J. Th. G. Overbeek *Theory of the Stability of Liophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam, 1948.
22. F. Evans, H. Wennerström *The Colloidal Domain: where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*, VCH Publishers, Nova Iorque, 1994.
23. H. Reerink e Th. J. Overbeek *Discuss. Faraday Soc.* **18** (1954) 74.
24. A. M. Carmona-Ribeiro *J. Colloid Interface Sci.* **139** (1990) 343.
25. A. M. Carmona-Ribeiro e B. R. Midmore *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 3542.
26. M. C. Block, L. L.M. van Deenen e J. De Gier *Biochim. Biophys. Acta* **433**(1976)1.
27. J. De Gier, J. G. Mandersloot e L. L. M. van Deenen *Biochim. Biophys. Acta* **150** (1968) 666.
28. C. R. Cantor e P. R. Chimmel *Biophysical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, Nova York.
29. S. G. Schultz *Basic Principles of Membrane Transport*, Cambridge University Press, 1980, Cambridge.
30. M. N. Jones e Piercy *J. C. S. Faraday Soc. Trans. I* **68**(1972)1839.
31. P. Mukerjee, K. J. Mysels e P. Kapauuan *J. Phys. Chem.* **71**(1967)4166.
32. L. Sepúlveda e J. Cortês *J. Phys. Chem.* **89**(1985)5322.
33. O. Schales e S. S. Schales *J. Biol. Chem.* **140**(1941)879.
34. P. W. Atkins *Physical Chemistry*, 3a. ed., Oxford University Press: Oxford, 1986.
35. Hans Vink *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, **77**(1981)2439.
36. E. Feitosa *Tese de Doutorado*, IQUSP, 1990. 26.



37. J. H. Fendler *Chemistry in Britain* (1984)1098.
38. K. Deguchi e J. Mino *J. Colloid Interface Sci.* **64**(1979)279.
39. A. M. Carmona-Ribeiro e H. Chaimovich *Biochim. Biophys. Acta* **733**(1983)172.
40. I. M. Cuccovia, E. Feitosa, H. Chaimovich, L. Sepulveda e W. Reed *J. Phys. Chem.* **94**(1990)3722.
41. M. C. Blok, L. L.M. van Deenen e J. De Gier *Biochim. Biophys. Acta* **433**(1976)1.
42. E. Feitosa, A. Agostinho-Neto e H. Chaimovich *Langmuir* **9**(1993)702.



