

Fernanda Rosa Alves

*Interação de Micelas Aniônicas com Vesículas
Catiônicas*





1910001271





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Interação de Micelas Aniônicas com Vesículas Catiônicas

Fernanda Rosa Alves

Orientador: Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa



1.1.271/04

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de mestre em Biofísica Molecular.

São José do Rio Preto-SP
2004

Agradecimentos

- Especialmente ao Prof. Dr. Eloi Feitosa pela orientação, amizade e paciência.
- Ao Professor Björn Lindman pela oportunidade de pesquisar em seu departamento de Físico-Química 1, na Universidade de Lund, Suécia.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Andrès Fossey e Profa. Dra. Vera Tiera pelas críticas e correções sugeridas.
- Aos amigos do grupo Shirley, Marcos e Cecília.
- Meus irmãos Mauro César e Christiane pelo apoio e grande incentivo.
- À CAPES pela bolsa concedida.

Abreviaturas

DODAC – cloreto de dioctadecildimetilamônio

DODAB – brometo de dioctadecildimetilamônio

NaC – colato de sódio

NaDC – deoxicolato de sódio

NaGC – glicocolato de sódio

NaTDC – taurodeoxicolato de sódio

SDS – sulfato dodecil de sódio

CMC – concentração micelar crítica

LMV – vesícula multilamelar grande

LUV – vesícula unilamelar grande

SUV – vesícula unilamelar pequena

T_c – temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina

N_{ag} – número de agregação

P – parâmetro de empacotamento

v – volume das cadeias de hidrocarboneto

l_c – comprimento crítico das cadeias de hidrocarboneto

a_o – área efetiva do grupo de cabeça polar

DSC – calorimetria diferencial de varredura



Índice

Resumo **1**

Abstract **2**

1. Introdução **3**

1.1. Colóides de associação **6**

1.2. Vesículas de DODAX **8**

1.3. Micelas de sais biliares **11**

1.4. Micelas de sulfato dodecil de sódio (SDS) **14**

1.5. Interação vesícula-micela **16**

1.6. Objetivos **20**

2. Materiais e Métodos **20**

2.1. Materiais **20**

2.2. Preparo das Amostras **21**

2.3. Medidas de Turbidez **21**

2.4. Medidas de DSC **23**

2.5. Medidas de Espalhamento de Luz **25**

3. Resultados e Discussão **26**

3.1. Sistema NaC/DODAC/água **26**

3.1.1. Cinética de Interação **26**

3.1.2. Turbidez vs. NaC/DODAC **28**

3.1.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) **30**

3.1.4. Espalhamento de Luz **32**

3.2. Sistemas Sal Biliar/DODAX/água **35**

3.3. Sistema SDS/DODAC/água **37**

3.3.1. Cinética de Interação **37**

3.3.2. Turbidez vs. SDS/DODAC **38**

3.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) **39**

4. Conclusões **41**

5. Referências Bibliográficas **44**



Resumo

Investigamos, por medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC), turbidez e espalhamento de luz, o efeito de sais biliares colato de sódio, NaC, deoxicolato de sódio, NaDC, glicocolato de sódio, NaGC e taurodeoxicolato de sódio, NaTDC, e de sulfato dodecil de sódio, SDS, nas propriedades das vesículas de brometo e cloreto de dioctadecildimetilamonio, DODAX ($X=Cl^-$ e Br^-), em água.

A adição de NaC às vesículas de DODAC causa uma diminuição inicial na turbidez até a razão molar $R=NaC/DODAC \approx 0,5$ permanecendo constante entre $R \approx 0,5$ e 1,0. Em torno de $R=1,0$, a turbidez aumenta abruptamente até um segundo patamar, com valor maior do que o das vesículas de DODAC. Resultados de DSC mostram que a temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina, T_c , inicialmente diminui até desaparecer para $R \approx 0,6$, e o pico de transição se alarga com R . Para $R > 1$ novos picos aparecem indicando temperaturas de transição menores e a conseqüente formação de diferentes estruturas. Esses resultados sugerem a formação das seguintes estruturas na mistura NaC/DODAC/água: vesicular, micelar e lamelar complexa, para $R < 0,5$; $0,5 < R < 1,0$ e $R > 1,0$, respectivamente. A adição de NaC à dispersão de DODAC preserva a polidispersidade e o tamanho das estruturas formadas tende a diminuir com o aumento de R . Para todos os sais biliares aqui investigados, ocorre floculação conforme a seqüência $NaTDC < NaDC < NaC < NaGC$ nas razões molares $R \approx 0,3$, 0,6, 0,9 e 1,1, respectivamente; apenas NaC e NaGC solubilizam vesículas de DODAC em micelas mistas. Para a mistura de sais biliares com vesículas de DODAB, a floculação obedece a ordem $NaTDC \approx NaDC < NaC < NaGC$ nas razões molares $R \approx 0,2$, 0,4 e 0,9, respectivamente e apenas NaGC induz transição vesícula-micela.

O efeito de SDS nas vesículas de DODAC é diferente do efeito dos sais biliares. Até $R=SDS/DODAC \approx 6,0$, SDS não induz transição vesícula-micela. A intensidade de espalhamento aumenta com R , a T_c diminui de $49,0^\circ C$ para $46,9^\circ C$ e a altura do pico do termograma da transição diminui até desaparecer quando $R \approx 0,4$ e as vesículas floculam; entre $R=0,4$ e 0,7 novas estruturas de bicamadas são formadas com temperatura de transição maior. Acima de $R \approx 0,7$, agregados instáveis são formados com um comportamento de fase mais complicado. Ao contrário de NaC, o efeito de SDS nas vesículas de DODAC é lento e o equilíbrio da mistura é alcançado após um dia ou mais, dependendo da concentração dos componentes.



Abstract

Bile salts are anionic surfactants that in aqueous solution self-assemble as micelles with CMC and size not so well-defined. The anionic sodium dodecyl sulfate, SDS, self-assembles in water, at a well-defined CMC, as spherical micelles. Dioctadecyldimethylammonium halide, DODAX (X being Cl^- and Br^-), is a double chain cationic surfactant which self-assembles above its melting temperature ($T_c=49$ and 45°C , respectively) as large unilamellar vesicles. Aqueous mixtures of NaC or SDS with DODAX yield a rich variety of aggregate structures. We investigated, by differential scanning calorimetry (DSC), turbidity and light scattering, the effect of bile salts and SDS on the properties of DODAX vesicles. Owing to the markedly difference in chemical structure of these surfactants, they affect differently the structure of DODAX vesicles indicating that they interact with different sites of the vesicle structure. When NaC is added, the scattering intensity decreases to a lower value at the molar NaC/DODAC ratio $R=0.5$, and remains constant between $R=0.5$ and 1.0 . Around the equimolar ratio R , the scattering intensity increases steeply to a plateau. Dynamic light scattering indicates that both DODAC 1.0 mM and DODAC/NaC aqueous dispersions are very polydisperse and that the mean size of the aggregates tends to decrease with increasing R . All the bile salts here investigated yield flocculation according to the sequence $\text{NaTDC}<\text{NaDC}<\text{NaC}<\text{NaGC}$ at the molar bile salt/DODAC ratios $R\approx 0.3, 0.6, 0.9$ and 1.1 , respectively. Mixtures of bile salts with DODAB yield flocculation according to the sequence $\text{NaTDC}\approx\text{NaDC}<\text{NaC}<\text{NaGC}$ at the molar bile salt/DODAB ratios $R\approx 0.2, 0.4$ and 0.9 respectively. Vesicle-to-micelle transition was observed only for the addition of NaC or NaGC to DODAC vesicles and for NaGC to DODAB vesicles. At equilibrium, turbidity decreases with $R=\text{NaC/DODAC}$ and increases with $R=\text{SDS/DODAC}$. DSC results show that T_c initially decreases to vanish around $R=0.5$; the transition peak broadens as R increases. Above $R=1.0$ a new peak appear at a lower T_c indicating the formation of complex structures. The structures formed are: Vesicle, micelle and complex aggregates for $R<0.5$, $0.5<R<1.0$ and $R>1.0$, respectively. Up to $R=\text{SDS/DODAC}=6.0$, SDS does not yield vesicle-micelle transition. The scattering intensity increases with R and T_c decreases to 46.9°C ; the peak intensity decreases to disappear around $R=0.4$ when the vesicles flocculate; between $R=0.4$ and 0.7 new bilayer structures are formed with higher T_c . Above $R=0.7$ rather unstable aggregates with a more complicated phase behavior are formed. In aqueous solution, the kinetics of interaction between NaC and DODAC is much faster than between SDS and DODAC.



1. Introdução

Surfactantes, ou *moléculas tensoativas*, são *anfifílicos* (do grego *amphi*, que significa *ambos*) que atuam na interface entre duas fases de uma mistura e no interior de uma das fases líquidas, formando *agregados supramoleculares*, como *micelas* e *vesículas*. O tipo de estrutura formada depende de fatores como a composição química do surfactante, do solvente, da temperatura, de aditivos etc. Dentre as características do surfactante destacam-se o potencial de diminuir a tensão interfacial (ou superficial) entre as fases líquido/ar e a formação de uma variedade de estruturas supramoleculares, que depende, para um dado sistema, da composição do surfactante na mistura e da temperatura. A transição estrutural é possível variando-se a concentração de surfactante ou a temperatura, o que confere aos surfactantes um potencial de aplicação ilimitado. Nesta dissertação, investigamos misturas ternárias contendo dois surfactantes com características estruturais diferentes, sendo um catiônico e o outro aniônico, em solução aquosa. Brometo e cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAX, $X=Br^-$ ou Cl^-), diferentes sais biliares e sulfato dodecil de sódio (SDS), foram os surfactantes escolhidos para este estudo, cujas características principais são descritas a seguir.

DODAX são surfactantes catiônicos com duas cadeias hidrocarbônicas C_{18} , e região da cabeça polar formada por um haleto de amônia quaternária (Figura 1). Sais biliares são surfactantes aniônicos, do tipo esteróide, com uma estrutura planar rígida formada por quatro anéis aromáticos, nos quais se ligam três grupos metila e um número variável de hidroxila, além de cadeias laterais com comprimento e constituição química variadas (Figura 2). SDS é um



surfactante aniônico com uma única cadeia hidrocarbônica C_{12} e uma cabeça polar contendo um grupo sulfato (Figura 3). Em solução aquosa diluída, DODAX forma, acima da temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina ($T_c \approx 49,0$ e 45°C , respectivamente, para DODAC e DODAB), vesículas unilamelares grandes [FEITOSA & BROWN, 1997; BLANDAMER *et al.*, 1999; BENATTI *et al.*, 1999; FEITOSA *et al.*, 2000; BENATTI *et al.*, 2001].

Na região da concentração micelar crítica, CMC, sais biliares formam micelas aniônicas pequenas de tamanho crescente com a concentração do surfactante [MYSELS, 1984]; SDS forma micelas esféricas. Em concentrações maiores, as micelas de SDS adquirem forma alongada, e estruturas hexagonais e lamelares [MARQUES *et al.*, 1993]. Em solução aquosa, esses surfactantes interagem com outros surfactantes sofrendo mudanças estruturais com características diversas.

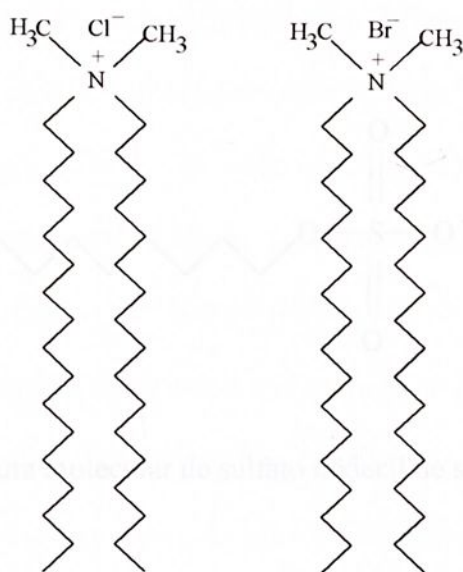
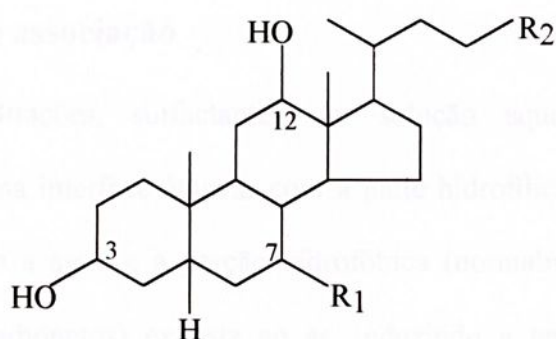


Figura 1 – Estrutura molecular de cloreto e brometo de dioctadecildimetilamônio, DODAC e DODAB.



Sal biliar	R ₁	R ₂
NaC	OH	COO ⁻ Na ⁺
NaDC	H	COO ⁻ Na ⁺
NaTDC	H	CONHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺
NaGC	OH	CONHCH ₂ COO ⁻ Na ⁺

Figura 2 – Estrutura molecular dos sais biliares colato de sódio (NaC), deoxicolato de sódio (NaDC), taurodeoxicolato de sódio (NaTDC) e glicocolato de sódio (NaGC).

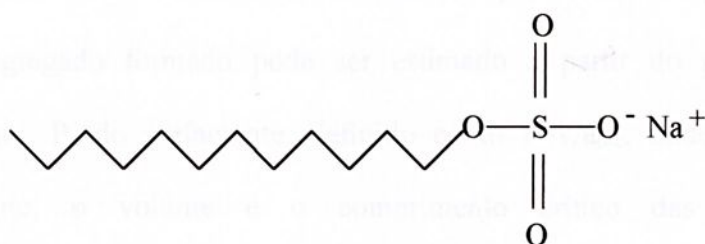


Figura 3 – Estrutura molecular de sulfato dodecil de sódio, SDS.

1.1. Colóides de associação

A baixas concentrações, surfactantes em solução aquosa particionam-se preferencialmente na interface água/ar com a parte hidrofílica (grupo de cabeça polar) voltada para a água e a porção hidrofóbica (normalmente uma ou duas cadeias de hidrocarbonetos) exposta ao ar, reduzindo a tensão superficial. A concentrações maiores, surfactantes livres em solução formam espontaneamente agregados micelares ou vesiculares, nos quais a cabeça polar dos monômeros fica voltada para a fase aquosa e a parte apolar imersa no interior do agregado, protegida, de modo a minimizar a interação, energeticamente desfavorável, entre as cadeias de hidrocarbonetos e as moléculas de água. As interações hidrofóbicas, que minimizam o contato entre as cadeias de hidrocarbonetos com moléculas de água, são as principais responsáveis pela formação desses agregados [TANFORD, 1991].

Surfactantes em solução podem formar uma variedade de agregados e fases dependendo de suas características, concentração e das condições do meio. O tipo de agregado formado pode ser estimado a partir do parâmetro de empacotamento, P , do surfactante, definido como $P=v/a_0l_c$, onde v e l_c são, respectivamente, o volume e o comprimento crítico das cadeias de hidrocarboneto, e a_0 é a área efetiva do grupo de cabeça polar [ISRAELACHVILI, 1992]. Verifica-se que, quando $P < 1/3$, micelas esféricas são formadas, enquanto que para micelas cilíndricas e bicamadas, $P \approx 1/2$ e 1 , respectivamente. $P > 1$ resulta na formação de estruturas reversas [EVANS & WENNERSTÖM, 1994; JÖNSSON *et al.*, 1998].



Micelas são formadas espontaneamente quando a concentração de surfactante é igual ou excede a CMC, que é tipicamente na faixa de alguns milimolares. Acima da CMC, a concentração de monômeros livres coexistindo com micelas é da ordem da CMC e a troca de monômeros entre micelas é rápida. O tempo típico de residência de um monômero numa micela de alquilsulfato de sódio é da ordem de 1 ms [ANIANSSON *et al.*, 1976].

A formação de vesículas, por sua vez, requer, em geral, o fornecimento de energia ao sistema. Surfactantes com duas caudas (dialquilados, $P \approx 1$) tendem a formar vesículas. Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) é um típico surfactante usado na formação de vesículas catiônicas, cujas propriedades são bem conhecidas [FEITOSA *et al.*, 2000]. Quando hidratados DODAB forma bicamadas estendidas e/ou vesículas uni ou multilamelares, dependendo da concentração e da natureza do solvente. A formação de vesículas unilamelares a partir de estruturas de bicamadas planas ou de vesículas multilamelares se dá pela quebra destas estruturas, usando, p. ex., ondas de ultrassom [CUCCOVIA *et al.*, 1990]. Os fragmentos de bicamada, resultantes da ruptura, se fundem de modo a reduzir a energia desfavorável devido ao contato da borda da bicamada com moléculas de água, formando vesículas unilamelares pequenas. Muito provavelmente este método produz, além de vesículas, fragmentos de bicamadas em solução [FEITOSA *et al.*, 1997]. Existem outros métodos de preparação de vesículas [LASIC, 1993; HAUSER, 1993], tais como injeção e extrusão. Este último consiste em forçar a passagem das vesículas grandes através de uma membrana com um determinado tamanho de poro e acima da T_c do surfactante; o



outro método consiste na injeção de uma solução orgânica (eg., clorofórmio) do surfactante na solução aquosa, seguido de evaporação do solvente orgânico. O método (menos usado) de remoção de detergente consiste em usar detergente como solubilizador de lipídio e, após a remoção do detergente, vesículas do lipídio são formadas, ou seja, através do processo de transição micela-vesícula.

O mecanismo de formação de vesículas a partir de estruturas lamelares grandes, difere de um método para outro e, portanto, o tamanho das vesículas [LASIC, 1993]. Isto se deve ao fato das vesículas não serem estruturas estáveis, mas agregados que reverterem com o tempo para a estrutura lamelar original. A energia necessária para romper as lamelas leva à formação de estruturas intermediárias, a partir das quais as vesículas são formadas por mecanismos cinéticos e não termodinâmicos. Conseqüentemente, a natureza das estruturas intermediárias e as características das vesículas resultantes dependem do método de preparação. Embora não sejam termodinamicamente estáveis, as vesículas são, na prática, estáveis o suficiente para que sejam estudadas ou usadas por meses ou anos, dependendo das condições de estocagem. São muitos os aditivos usados na estabilização de vesículas, e na mudança de suas propriedades eletrostáticas e geométricas. Polímeros e surfactantes são comumente usados para esse fim.

1.2. Vesículas de DODAX

As membranas biológicas consistem principalmente de proteínas e lipídios. Estes formam a arquitetura da membrana, e as proteínas medeiam as várias funções da membrana celular. Um grande avanço no entendimento das membranas naturais



se deve à formação de estruturas fechadas de bicamada lipídica, semelhante à das membranas celulares [BANGHAM, 1964], denominadas *lipossomos*, e, posteriormente, pela formação de estruturas vesiculares por anfífilos sintéticos [KUNITAKE & OKAHATA, 1977]. Essas estruturas são importantes, pois mimetizam membranas naturais.

Vesículas de surfactantes sintéticos exibem muitas das propriedades das vesículas lipídicas (*lipossomos*), e.g., transição termotrópica de fase, permeabilidade a solutos etc. Surfactantes com dupla cadeia hidrocarbônica geralmente formam vesículas uni ou multilamelares (Figura 4) [LASIC, 1996], acima de uma determinada concentração crítica (concentração vesicular crítica, CVC), que geralmente é muito baixa, e acima da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina (T_c) [FENDLER, 1987].

A concentração e a constituição química do lipídio, além do método de preparação das vesículas, determinam a estrutura vesicular que são formadas, preferencialmente a baixas concentrações lipídicas; em concentrações maiores, bicamadas estendidas são preferencialmente formadas, havendo uma contínua transformação de uma para a outra estrutura. A hidratação simples de filmes lipídicos tende a formar vesículas multilamelares com pequena curvatura, que são convertidas em estruturas unilamelares quando a dispersão é sonicada ou extrudada [FENDLER, 1987]. Sonicação e extrusão são muito usadas na formação de vesículas unilamelares pequenas e médias, com tamanho variado (dependendo, p.ex., do diâmetro do poro da membrana de extrusão ou do tempo de sonicação).



Recentemente, o nosso grupo reportou que DODAB e DODAC formam espontaneamente vesículas unilamelares grandes em solução aquosa [FEITOSA & BROWN, 1997; BENATTI *et al.* 1999, FEITOSA *et al.* 2000, BENATTI *et al.*, 2001]. Estas vesículas são formadas acima da T_c do surfactante (45 e 49°C, respectivamente) e, preservam a estrutura unilamelar quando resfriadas à temperatura ambiente. Essas vesículas permanecem estáveis por meses, quando estocadas à temperatura ambiente, ou mesmo a 2°C (na geladeira). O tamanho, estabilidade e temperatura de transição de fase destas vesículas são encontrados na literatura [FEITOSA *et al.* 2000; FEITOSA *et al.* submetido]. Neste trabalho, pretendemos investigar a interação de sal biliar e SDS com vesículas unilamelares espontâneas de DODAC e DODAB, através de medidas de turbidez, espalhamento de luz e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Surfactantes que formam vesículas em solução aquosa podem agregar-se numa variedade de fases lamelares e não-lamelares (cúbicas, isotrópicas etc.) [CEVC & MARSH, 1987; LASIC, 1993]. Essas fases podem ser modificadas pela presença de co-solutos, e a mudança de fase pode ser monitorada por diferentes técnicas e métodos (raios-X, microscopia eletrônica de varredura, viscosidade etc.), e investigadas através da construção de diagramas de fases.



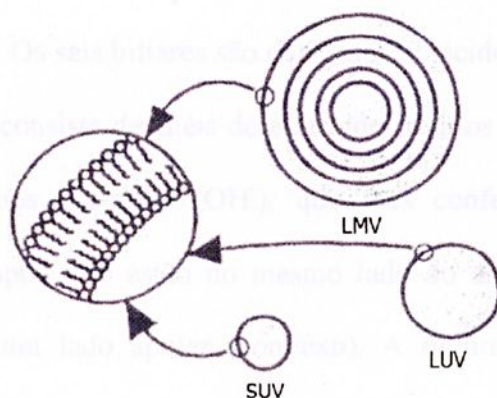


Figura 4 – Esquema de vesículas uni e multilamelares.

1.3. Micelas de sais biliares

A maioria dos surfactantes consiste de uma ou duas cadeias hidrofóbicas flexíveis, geralmente de hidrocarbonetos, ligadas quimicamente a um grupo de moléculas polares, que em solução se encontram em desordem conformacional. Existe uma clara separação, nestes surfactantes, entre a cauda apolar e o grupo de cabeça polar, que normalmente se encontra ligado a uma das extremidades da cauda (na outra extremidade tem-se um grupo metila). Estas características não estão presentes nos sais biliares, que são surfactantes naturais com estrutura tipo esteróide (vide Figura 2), com papel vital no corpo humano. Estas moléculas são fundamentais no processo de emulsificação de gordura no trato digestivo e auxiliam na eliminação de lecitina e colesterol do corpo [CAREY, 1970; SMALL, 1971; BORGSTRÖM, 1977].

A peculiaridade dos sais biliares, como agentes tensoativos, está na sua estrutura molecular. Os sais biliares são derivados do ácido cólico e, portanto, sua porção hidrofóbica consiste de anéis de esteróides rígidos não-planares, contendo dois ou mais grupos hidroxila (OH), que lhes conferem pequenos grupos hidrofílicos. Os grupos OH estão no mesmo lado do anel que possui um lado polar (côncavo) e um lado apolar (convexo). A Figura 2 mostra a estrutura molecular dos quatro sais biliares, NaC, NaDC, NaTDC e NaGC. Devido à rigidez do anel esteróide o empacotamento dos sais biliares em micelas não pode ser do modo convencional. Na região da CMC os sais biliares agregam-se através de interações hidrofóbicas em agregados mais ou menos esféricos com número de agregação (N_{ag}) muito menor do que os de surfactantes convencionais, tipicamente N_{ag} varia de 4 a 10 [CAREY & SMALL, 1970; SMALL, 1971; MAZER *et al.*, 1979; KRATOHVIL, 1986; LI & MCGOWN, 1994]. De acordo com o modelo de Small, estas pequenas micelas são denominadas *micelas primárias* [SMALL, 1971]. Com o aumento da concentração do sal biliar, os agregados primários associam-se em micelas maiores e mais complexas, as *micelas secundárias*, nas quais as pontes de hidrogênio entre os sítios hidrofílicos das várias moléculas desempenham importante papel (Figura 5) [MAZER *et al.*, 1982]. No entanto, é possível que a força de micelização seja de natureza essencialmente hidrofóbica. Estudos recentes de sais biliares [SUGIOKA & MOROI, 1998; MOROI & MOKABE, 2000; MATSUOKA & MOROI, 2002; MATSUOKA *et al.*, 2003] indicam a existência de duas CMCs (Tabela 1). A primeira CMC corresponde à formação de agregados menores e a segunda à



agregados maiores e mais estáveis, sendo que na região da segunda CMC o número de agregação varia de 7 a 16 (Tabela 1).

Outro aspecto peculiar do comportamento interfacial dos sais biliares é o modo como eles adsorvem em interfaces. Eles adsorvem preferencialmente na posição paralela à superfície água-ar, com a parte côncava voltada para a água e parte convexa exposta para o ar [KRATOHVIL *et al.*, 1986], Figura 6. O mesmo tipo de orientação plana ocorre nas monocamadas planas de lecitina-sal biliar e na mistura de sal biliar com bicamada de lecitina [ULMIUS, 1982] e com micelas catiônicas [NICHOLS, 1990; HJELM, 1992], com a porção apolar convexa voltada para o caroço hidrofóbico dos agregados.

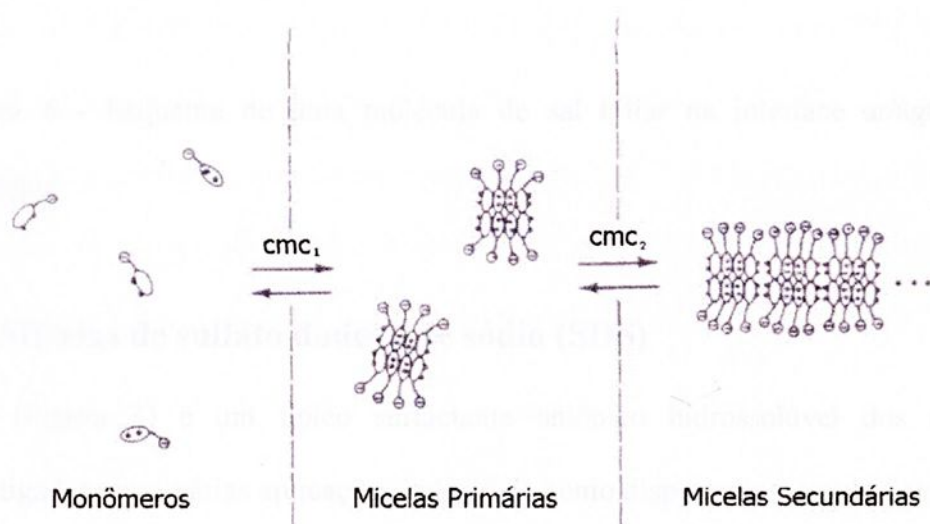


Figura 5 – Esquema de formação de micelas primárias e secundárias de sais biliares.

Tabela 1 – Valores da primeira e segunda CMC e número de agregação das micelas de alguns sais biliares.

Sal biliar	1ª CMC (mM)	2ª CMC (mM)	Nº de Agregação
NaC	6,3	14,1	7
NaDC	3,4	6,9	10
NaTDC	2,9	5,3	15,9
NaGC	8,1	16	8,7

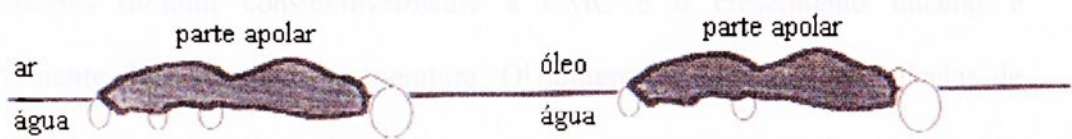


Figura 6 - Esquema de uma molécula de sal biliar na interface ar/água e óleo/água.

1.4. Micelas de sulfato dodecil de sódio (SDS)

SDS (Figura 3) é um típico surfactante aniônico hidrossolúvel dos mais investigados, com várias aplicações industriais como dispersantes, emulsificantes, etc. [KALYANASUNDARAM, 1987; EVANS & WENNERSTRÖM, 1999; JÖNSSON *et al.*, 1998]. O efeito hidrofóbico resulta na tendência das moléculas de SDS se posicionarem na superfície ar/água ou micelizarem no interior da solução. Na interface a cadeia apolar fica orientada para o ar e a cabeça polar imersa na água (Figura 7). Em água, a concentração micelar crítica (CMC) de SDS é bem definida e vale 8,1 mM. Na região da CMC, SDS forma micelas

esféricas em água com número de agregação $N_{ag} \approx 64$, e parâmetro de empacotamento crítico $P \approx 0,33$. Em concentrações maiores de SDS, uma série de estruturas e fases podem ser encontrada, seguindo um padrão (diagrama de Fontell) tais como pequenas micelas alongadas, normais e invertidas, e fases hexagonais, lamelares e cúbicas [MARQUES *et al.*, 1993] (Figura 8). Do diagrama de Fontell observa-se que a curvatura dos agregados varia de positiva para negativa, passando por curvatura nula para a estrutura lamelar. A adição de eletrólitos diminui consideravelmente a CMC e o crescimento micelar é fortemente dependente da temperatura. O número de agregação de micelas de SDS aumenta com a diminuição da temperatura e com o aumento da concentração de sal [JÖNSSON *et al.*, 1998]. O raio (R) das micelas de SDS é de aproximadamente $20\text{\AA}$, a área do grupo de cabeça polar a é $60\text{\AA}^2$ e a área da secção transversal do grupo sulfato é por volta de $27\text{\AA}^2$. A temperatura de Krafft T_{Kr} , ponto no qual a solubilidade do surfactante é igual a CMC, varia de 20 a 25°C dependendo da concentração de surfactante [EVANS *et al.*, 1999].

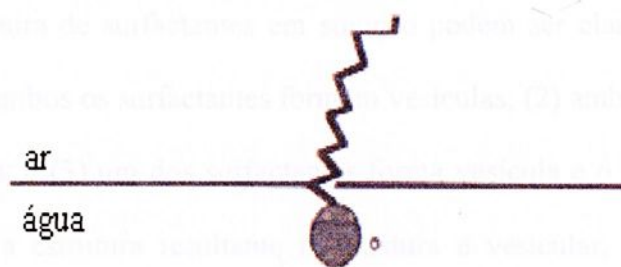


Figura 7 - Esquema de uma molécula de SDS na interface ar/água.

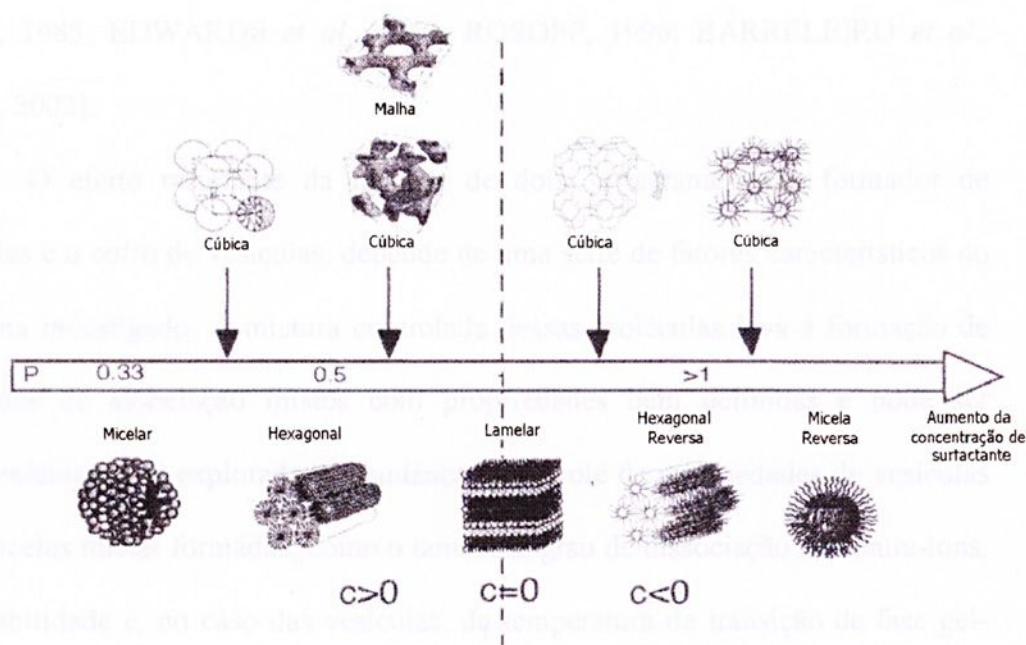


Figura 8 – Diagrama de Fontell: Estruturas supramoleculares formadas com o aumento da concentração de surfactante. Na Figura, c é a curvatura do agregado e P é o parâmetro de empacotamento do surfactante.

1.5. Interação vesícula-micela

Estudos da mistura de surfactantes em solução podem ser classificados em três categorias: (1) ambos os surfactantes formam vesículas; (2) ambos os surfactantes formam micelas; e (3) um dos surfactantes forma vesícula e o outro, micela. No primeiro caso, a estrutura resultante na mistura é vesicular, enquanto que no segundo caso é micelar ou vesicular. No terceiro caso, que é assunto deste trabalho, a estrutura formada na mistura pode ser micelar ou vesicular, além de estruturas intermediárias pouco conhecidas na literatura. A transição entre essas estruturas ou fases tem sido objeto de intenso estudo [LICHTENBERG *et al.*,

1983, 1985; EDWARDS *et al.*, 1989; ROSOFF, 1996; BARRELEIRO *et al.*, 2000, 2002].

O efeito resultante da mistura de dois surfactantes, um formador de micelas e o outro de vesículas, depende de uma série de fatores característicos do sistema investigado. A mistura controlada dessas moléculas leva à formação de colóides de associação mistos com propriedades bem definidas e pode ser convenientemente explorada na mudança e controle de propriedades de vesículas ou micelas mistas formadas, como o tamanho, grau de dissociação de contra-íons, a estabilidade e, no caso das vesículas, da temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina, T_c . Turbidimetria e DSC são métodos adequados ao estudo da mistura, especialmente na determinação das concentrações críticas de transição estrutural e da temperatura crítica T_c . Estes métodos combinados são fundamentais no estudo de transição vesícula-micela nesses sistemas [BARRELEIRO *et al.*, 2002].

Uma interessante abordagem no estudo da mistura desses sistemas consiste na transição vesícula-micela que normalmente é observada quando se mistura uma solução de micelas a uma dispersão de vesículas. O mecanismo de transição vesícula-micela na mistura, em geral, obedece ao modelo de três estágios proposto por Lichtenberg [LICHTENBERG *et al.*, 1983, 1985]. De acordo com esse modelo, no primeiro estágio, após a adição das micelas às vesículas, as micelas são desfeitas e os seus monômeros solubilizados preferencialmente na bicamada vesicular até ocorrer saturação na concentração crítica de saturação do surfactante, C_{sat} . Acima desta concentração, os surfactantes adicionados tendem a formar



micelas e tem início o processo de degradação das vesículas, que se encerra na concentração crítica de solubilização do surfactante, C_{sol} , acima da qual apenas micelas mistas são formadas. Na região intermediária, existe provavelmente uma mistura de estruturas micelares e lamelares.

Sistemas mistos contendo fosfatidilcolina e sais biliares tem sido objeto de muito estudo [MAZER *et al.*, 1982; ALMOG *et al.*, 1986; SCHUBERT e SCHMIDT, 1988; MALLLOY e BINFORD, 1989; WALTER *et al.*, 1991; MEYUHAS *et al.*, 1997]. Em mistura de NaC com DPPC e DMPC pode ocorrer, sob aquecimento, transformação reversível de estruturas lamelares para micelares [POLOZOVA *et al.*, 1994]. Sais biliares solubilizam bicamadas de lecitina em micelas mistas [MAZER *et al.*, 1982], cujas estruturas e modelos são mostradas na Figura 9. A adição de DDAB às micelas de SDS provoca um aumento do tamanho e forma micelar. Moléculas de DDAB são incorporadas às micelas esféricas formando micelas e vesículas unilamelares maiores (Figuras 10 e 11) [MARQUES *et al.*, 1998]. A adição de SDS às dispersões de DDAB induz a formação de vesículas uni e multilamelares grandes e gigantes [MARQUES *et al.*, 1999]. Surfactantes não-iônicos e zwitteriônicos induzem a transição vesícula-micela na mistura com vesículas catiônicas de DODAB e DODAC [BARRELEIRO *et al.*, 2000, 2002; BONASSI, 2003]. O efeito de surfactantes aniônicos, SDS e sal biliar, na estrutura e fases de dispersões catiônicas de DDAB foi investigado por [MARQUES *et al.*, 1993, 1998, 1999, 2000], mas, não temos conhecimento da existência de estudos realizados do efeito desses surfactantes nas propriedades das vesículas de DODAC.



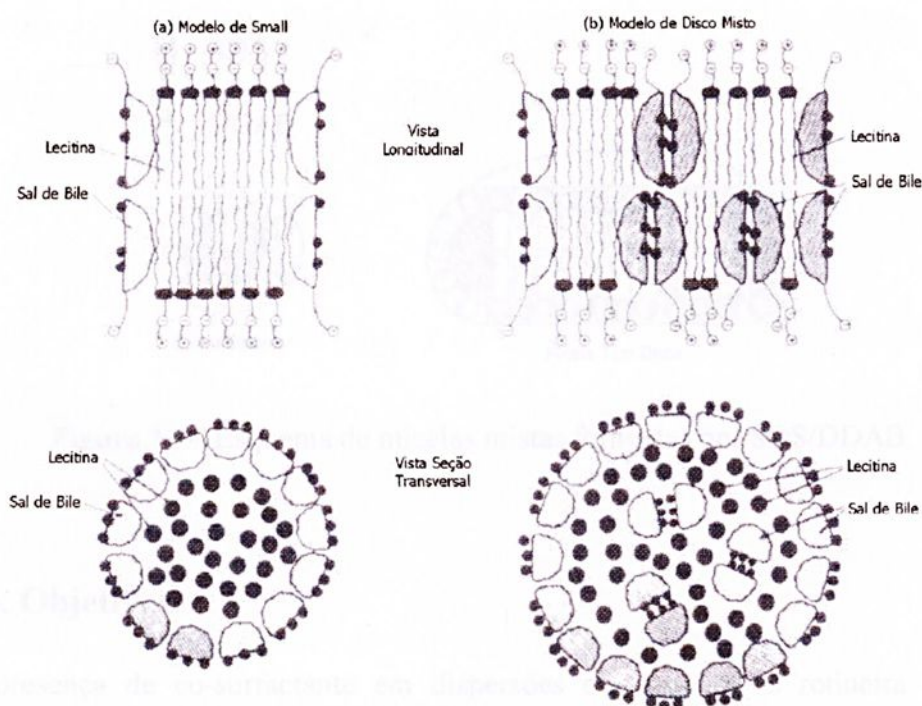


Figura 9 – Esquema de micela mista de sal biliar/lecitina, mostrada em seção longitudinal e transversal. (a) Modelo de Small e (b) modelo de disco misto.

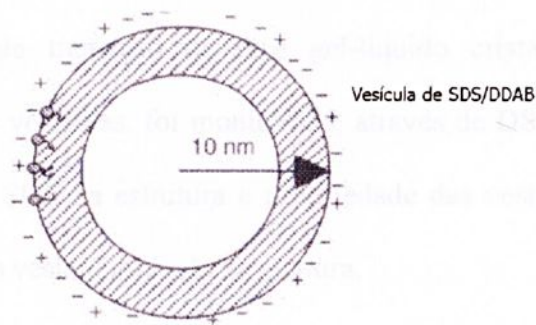


Figura 10 – Esquema de vesícula mista formada por SDS/DDAB.

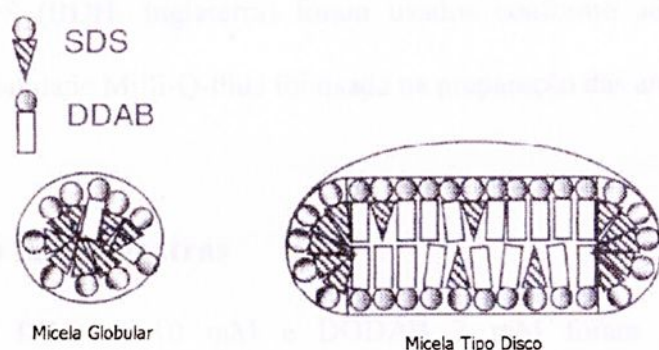


Figura 11 – Esquema de micelas mistas formadas por SDS/DDAB.

1.6. Objetivos

A presença de co-surfactante em dispersões de vesículas é rotineira e visa estabilizar o sistema ou buscar estruturas alternativas de agregados supramoleculares. Neste trabalho são investigadas as estruturas de agregados formados nas misturas DODAX/sal biliar/água e DODAC/SDS/água, usando turbidimetria, espalhamento de luz e calorimetria diferencial de varredura (DSC). A temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina, T_c , que é uma característica das vesículas, foi monitorada, através de DSC, a fim de verificar o efeito de NaC e SDS na estrutura e propriedade das vesículas de DODAX, e a possível transição vesícula-micela na mistura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

DODAC recristalizado foi obtido de DODAB (Sigma) por troca iônica, conforme descrito na literatura [CUCCOVIA *et al.*, 1997]. NaC, NaDC, NaTDC e NaGC

(Sigma) e SDS (BDH, Inglaterra) foram usados conforme adquiridos. Água ultrapura de qualidade Milli-Q-Plus foi usada na preparação das amostras.

2.2. Preparo das Amostras

Vesículas de DODAC 10 mM e DODAB 2 mM foram preparadas por aquecimento da amostra a 60°C (acima, portanto, da $T_c=49$ e 45°C respectivamente), até obter uma dispersão homogênea por agitação manual e suave e, em seguida, resfriadas à temperatura ambiente. As vesículas, assim preparadas, mantêm-se estáveis por meses. Soluções micelares de NaC, NaDC, NaTDC e NaGC 20 mM e SDS 40 mM foram preparadas, à temperatura ambiente, por mistura simples desses surfactantes em água. As dispersões de DODAC e DODAB foram diluídas a 1,0 mM, às quais foram adicionadas alíquotas de soluções de surfactantes de sal biliar ou de SDS, em concentrações desejadas, para as medidas das propriedades interessadas.

2.3. Medidas de Turbidez

Um feixe de luz incidente absorvido por uma solução, num dado comprimento de onda, está relacionado ao caminho ótico e a concentração das amostras, através da lei de Beer-Lambert (Eq.1)

$$\ln I_o/I_t = \epsilon cl \quad (1)$$



onde I_o é a intensidade de luz incidente, I_t é a intensidade de luz transmitida, ε é o coeficiente de absorção molar, c a concentração das espécies absorventes e l o caminho ótico da amostra. A expressão $\ln I_o/I_t$ é chamada absorbância. Quando um feixe de luz incide sobre uma molécula que não absorve radiação, a luz incidente é totalmente transmitida e espalhada. Neste caso, a intensidade de luz transmitida é igual à intensidade de luz incidente menos a intensidade de luz espalhada, I_e , ou seja,

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

Portanto,

$$\ln(I_o/I_t) = \ln(I_o/I_o - I_e) = -\ln(I_o - I_e/I_o) = -\ln(1 - I_e/I_o) = \ln(I_e/I_o) = -\ln(I_o/I_e) \quad (3)$$

onde o termo $\ln(I_o/I_e)$ é denominado *turbidez*, ou, às vezes, *absorbância derivada de espalhamento*. Em termos de I_t , a Eq. 1 fica:

$$\ln I_o/I_e = -\varepsilon c l \quad (4)$$

Qualitativamente, a turbidez é proporcional ao tamanho da partícula espalhadora de luz.

A turbidez em função da razão R das soluções de DODAX/sal biliar/água e DODAC/SDS/água foi medida usando um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2001, e um espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS, modelo Lambda 14 com cubetas de quartzo de 1,0 e 0,2cm de comprimento ótico, respectivamente. As medidas foram feitas 5 minutos após cada adição de sal biliar, e, para o sistema DODAC/SDS/água, 48 horas após a adição de SDS, nas razões desejadas. A



turbidez em função do tempo das soluções de DODAC/NaC/água e DODAC/SDS/água foi medida usando o espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS. As medidas foram feitas logo após a adição de NaC e SDS às vesículas de DODAC.

2.4. Medidas de DSC

As medidas de DSC foram feitas usando um calorímetro MicroCal MC-2 (MicroCal, Northampton, MA) equipado com duas celas de 1,2 ml para a referência e solução das amostras de DODAC/NaC/H₂O, e um calorímetro Microcal Microcalorimeter, modelo VP-DSC, equipado com duas celas de 0,5 ml, para referência e solução das amostras de DODAC/SDS/H₂O. Para o sistema contendo SDS/DODAC, as medidas de DSC foram feitas aproximadamente 24 horas depois da adição de SDS a DODAC, pois o equilíbrio deste sistema não é imediato.

DSC é muito usado para estudar processos físicos que dependem da temperatura, como a desnaturação de proteínas, a transição de fases em solução de surfactantes na fase líquido-cristalina ou na transição de estado gel-líquido cristalino da cadeia de surfactantes em dispersões de vesículas. Quando a amostra e a referência são aquecidas, no interior do calorímetro, a uma taxa constante (1°C/min neste trabalho), o computador registra a capacidade calorífica (C_p) em função da temperatura, com a amostra e referência mantidas à mesma temperatura e pressão. O fluxo de calor (Q) é dado pelo calor fornecido para a (ou retirado da)



amostra, por unidade de tempo (t), e a taxa de aquecimento é o aumento da temperatura (ΔT), por unidade de tempo. Então

$$Q/t = \text{fluxo de calor}$$

$$\Delta T/t = \text{taxa de aquecimento.}$$

Dividindo o fluxo de calor pela taxa de aquecimento, temos:

$$Q/t / \Delta T/t = Q/\Delta T = Q/T - T_0 = C_p \quad (5)$$

A temperatura média de transição da fase gel para a líquido-cristalina (T_c), corresponde à posição máxima do pico de transição no termograma. Acima da T_c (fase líquido cristalina), as caudas das estruturas de bicamada se encontram altamente móveis, enquanto que abaixo da T_c (fase gel), se encontram no estado rígido e ordenado (Figura 11) [VAN HAL *et al.*, 1996]. A área sob o pico dá a variação da entalpia (ΔH) associada a essa transição, e a forma da curva dá informação sobre a transição e a largura do pico ($\Delta T_{1/2}$), medida da meia altura do pico, é inversamente proporcional a cooperatividade da transição. O sistema pode apresentar mais de uma transição, e esses parâmetros podem ser determinados para cada uma.

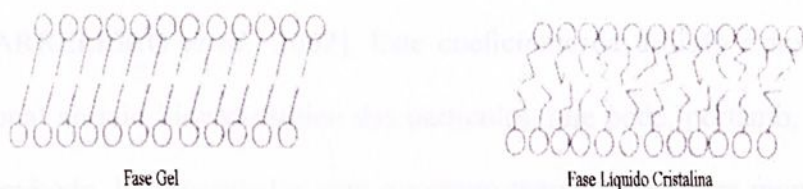


Figura 11 – Bicamadas de surfactantes na fase gel e líquido cristalina.

2.5. Medidas de Espalhamento de Luz

Medidas de espalhamento estático e dinâmico de luz dão informações sobre o peso molecular, raio de giro e raio hidrodinâmico. Neste trabalho realizamos medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) do sistema DODAC/NaC/água, a fim de investigar o efeito da adição de NaC na variação do tamanho e polidispersidade das vesículas de DODAC em água.

As medidas de espalhamento de luz (LS) foram feitas na Universidade de Lund, Suécia, usando um sistema ALV5000.¹ Para este sistema, as medidas de LS foram realizadas aproximadamente 24 horas depois da adição de NaC a DODAC, ou seja, com a amostra em equilíbrio. Os experimentos foram realizados no ângulo de espalhamento $\theta=90^\circ$ e 25°C .

A técnica de LS consiste, basicamente, em se explorar o efeito do movimento térmico das partículas em suspensão na intensidade de luz espalhada em diferentes ângulos de espalhamento, e a função de autocorrelação da intensidade da luz espalhada determinada pelo autocorrelador do aparelho. A medida desta função depende desse movimento caótico das partículas e dá informação sobre o coeficiente de difusão dessas partículas [FEITOSA *et al.*, 1996; BARRELEIRO *et al.*, 2002]. Este coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico das partículas, que pode, portanto, ser obtido por esse método. Para partículas com o mesmo tamanho (amostra monodispersa) em suspensão, a função de autocorrelação é uma exponencial simples, fornecendo

¹ Contamos com a colaboração de Jörgen Jonsson na realização das medidas de LS. Estas e algumas medidas de DSC foram realizadas em Lund durante minha visita de três meses àquela universidade (dez/2002 a fev/2003).



um único valor de tempo de relaxação. Para amostra polidispersa, a função de autocorrelação é dada por uma soma de exponenciais com uma distribuição de tempos de relaxação. A função distribuição do tempo de relaxação pode ser caracterizada por um ou mais picos, estando cada pico associado a um valor médio do coeficiente de difusão das partículas em uma dada população. Neste trabalho usamos LS apenas qualitativamente, a fim de verificar o efeito da adição de NaC na função distribuição do sistema DODAC/NaC/água.

3. Resultados e Discussão

Foram realizadas medidas de turbidez em função da concentração de surfactante e do tempo, de espalhamento dinâmico de luz e de DSC dos sistemas DODAX/sal biliar/água e DODAC/SDS/água, a fim de observar mudanças estruturais nas vesículas de DODAX devido à adição de micelas aniônicas de sais biliares e SDS.

A seguir, são discutidos resultados experimentais de cada um desses sistemas e, na conclusão, estes resultados serão comparados entre si.

3.1. Sistema NaC/DODAC/água

3.1.1. Cinética de Interação

O estudo de propriedades de sistemas mistos de surfactantes em solução requer que o sistema esteja em equilíbrio. A condição de equilíbrio pode ser obtida por medida de turbidez no tempo. A Figura 12 mostra a turbidez do sistema DODAC/NaC/água, em função do tempo medido a partir da adição de NaC às vesículas de DODAC. Nas razões estudadas, observamos que, no equilíbrio, a



turbidez diminui com o aumento da razão de concentração molar $R = \text{NaC}/\text{DODAC}$, indicando que estruturas menores estão sendo formadas. Para $R=0,1$ a turbidez aumenta até aproximadamente 200 minutos, quando atinge um patamar, indicando que as estruturas permanecem estáveis. Para $R=0,2$ ocorre uma diminuição inicial da turbidez, seguido de um aumento até aproximadamente 750 minutos, atingindo um valor máximo, para então diminuir até um patamar de equilíbrio em torno de 2000 min. Nesta razão, as estruturas levam um tempo relativamente longo para atingir o equilíbrio. Nas razões $R=0,3$, $0,4$ e $0,7$ há um comportamento semelhante entre si, ocorrendo uma queda inicial acentuada da turbidez, que se mantém constante num patamar, indicando que as estruturas formadas nestas razões atingem a estabilidade muito rapidamente. Observa-se que o valor do patamar diminui com R , permanecendo constante para $R>0,4$. Além disso, a diminuição inicial da turbidez é maior quanto maior for R , e que, para valores maiores de R , a turbidez apenas diminui (não aumenta como ocorre para valores menores de R), com o tempo até atingir o patamar. Desse modo, os resultados indicam que a solubilização das vesículas é diretamente proporcional à quantidade de NaC adicionado e o mecanismo da transição vesícula-micela depende da quantidade relativa de NaC e DODAC na solução.



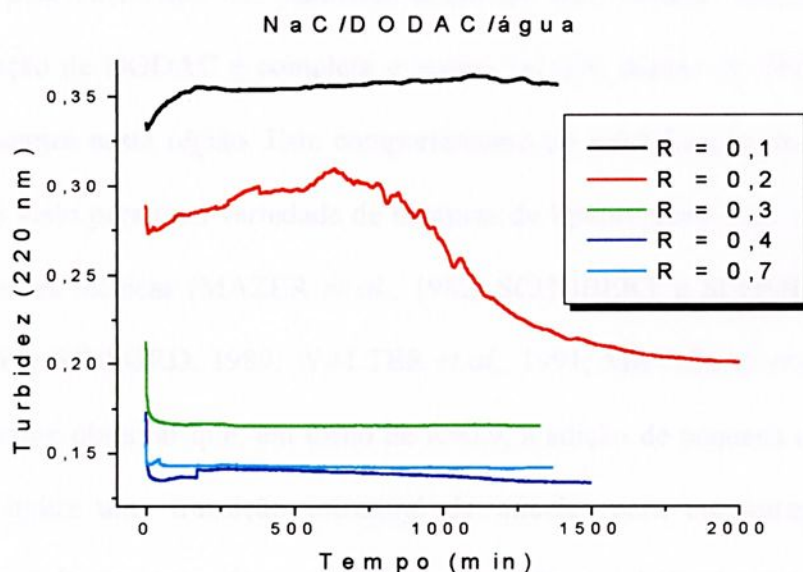


Figura 12 – Efeito do tempo na turbidez para $R = \text{NaC}/\text{DODAC} = 0,1, 0,2, 0,3, 0,4$ e $0,7$. O tempo $t=0$ corresponde ao instante inicial da mistura dos surfactantes (25°C).

3.1.2. Turbidez vs. NaC/DODAC

A turbidez do sistema ternário NaC/DODAC/água foi medida pela adição de alíquotas de uma solução micelar concentrada ($20,0 \text{ mM}$) de NaC à dispersão de vesículas de DODAC $1,0 \text{ mM}$. A Figura 13 mostra a turbidez em função da razão molar $R = \text{NaC}/\text{DODAC}$. As medidas foram feitas 5 minutos após cada adição do sal biliar. Durante esse tempo as amostras permaneciam sob agitação magnética no interior da cubeta. Devido a mudanças estruturais na dispersão, a turbidez diminui progressivamente até $R=0,5$, indicando que agregados menores são formados na mistura DODAC/NaC/água, provavelmente micelas mistas e estruturas de bicamadas coexistem nesta região. Entre $R=0,5$ e $0,9$ a turbidez não

é afetada pela adição de NaC, mantendo-se em seu valor mínimo, indicando que a solubilização de DODAC é completa e apenas micelas mistas de DODAC/NaC estão presentes nesta região. Este comportamento de solubilização das vesículas também é visto para uma variedade de misturas de lipídios com NaC, observadas por diferentes técnicas [MAZER *et al.*, 1982; SCHUBERT e SCHMIDT, 1988; MALLOY e BINFORD, 1989; WALTER *et al.*, 1991; MEYUHAS *et al.*, 1997]. É interessante observar que, em torno de $R=0,9$, a adição de pequena quantidade de NaC induz uma transição estrutural de micelas para estruturas grandes, (sugeridas pela presença de um pico de transição nos termogramas de DSC, mostrados a seguir), onde a turbidez aumenta bruscamente até um patamar cerca de 3,5 vezes acima do valor inicial da turbidez (ca 1,2) para as vesículas de DODAC (sem NaC).

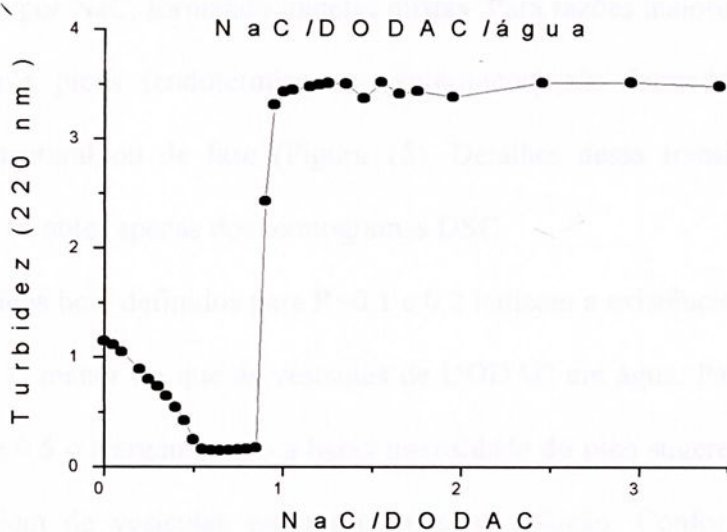


Figura 13 – Turbidez de DODAC/NaC/água, em função da razão molar $R=\text{NaC}/\text{DODAC}$ (25°C). Medidas realizadas 5 minutos após a adição de NaC às vesículas.

3.1.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Figura 14 mostra o efeito da adição de NaC às vesículas de DODAC nos termogramas DSC obtidos por aquecimento da amostra à taxa de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. O primeiro termograma ($R=0$) corresponde a DODAC 1,0 mM em água. Foi obtido um pico bem definido correspondente à transição da fase gel para a líquido cristalina, $T_c=48,4^{\circ}\text{C}$; em bom acordo com valores já publicados [FEITOSA *et al.*, 2000; BARRELEIRO *et al.*, 2002]. Com a adição de NaC, observa-se uma queda da T_c , um alargamento do pico correspondente a esta transição e uma diminuição da intensidade (altura) do pico da transição até desaparecer para $R\approx 0,6$. Comportamento semelhante foi obtido pela adição de surfactantes não-iônicos às vesículas de DODAX [BARRELEIRO *et al.*, 2002]. Estes resultados, juntamente com os de turbidez, indicam que vesículas de DODAC são totalmente solubilizadas por NaC, formando micelas mistas. Para razões maiores ($R=1,3$, $1,5$ e $2,0$), outros picos (endotérmicos e exotérmicos) são formados, indicando transição estrutural ou de fase (Figura 15). Detalhes dessa transição não são possíveis de se obter apenas dos termogramas DSC.

Os picos bem definidos para $R=0,1$ e $0,2$ indicam a existência de vesículas mistas com T_c menor do que as vesículas de DODAC em água. Para valores de $R=0,3$, $0,4$ e $0,5$ o alargamento e a baixa intensidade do pico sugerem que outras estruturas além de vesículas estão presentes na solução. Conforme discutido anteriormente, provavelmente mistura de estruturas de bicamadas e micelas mistas coexistem nesta região. O termograma sem o pico, para $R=0,6$, indica que apenas micelas mistas estão presentes, ou seja, que a transição vesícula-micela se



completou. Para valores de $R > 0,6$, outras estruturas mais complexas são formadas com temperatura de transição menores do que T_c (Figura 15). Esses picos, muito provavelmente, estão associados a mudanças estruturais ou de fases existentes na mistura. Cabe observar que os agregados formados pela mistura desses surfactantes floculam após algumas horas, e que a velocidade de floculação aumenta com R . A Tabela 2 resume os valores de T_c , $T_{1/2}$ e ΔH para diferentes valores de R , mostrando que $T_{1/2}$ aumenta e ΔH diminui com R , resultado do alargamento do pico e da diminuição da altura do pico.

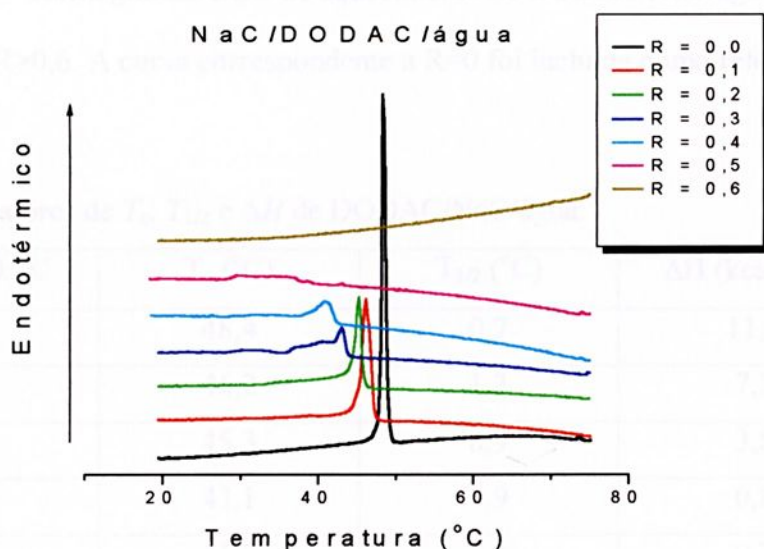


Figura 14 – Termogramas DSC de aquecimento de DODAC/NaC/água, para valores de $R < 0,6$.

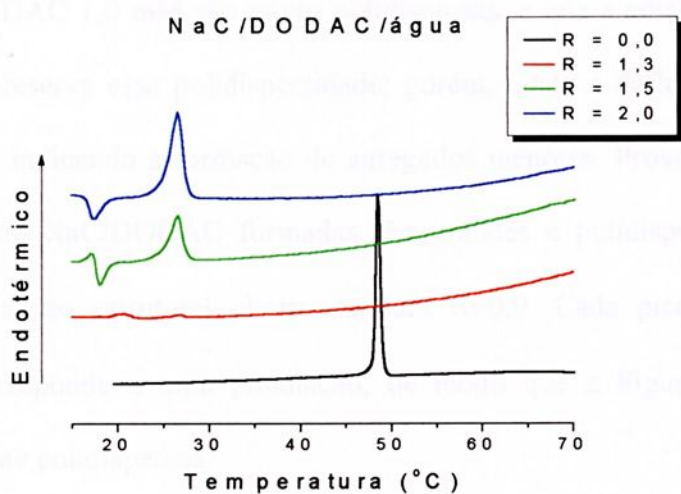


Figura 15 – Termogramas DSC de aquecimento de DODAC/NaC/água, para valores de $R > 0,6$. A curva correspondente a $R=0$ foi incluída como referência.

Tabela 2 – Valores de T_c , $T_{1/2}$ e ΔH de DODAC/NaC/água.

NaC/DODAC	T_c (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	ΔH (kcal/mol)
0,0	48,4	0,7	11,6
0,1	46,2	1,3	7,3
0,2	45,3	0,9	3,8
0,3	43,1	0,9	0,8
0,4	41,2	2,2	0,2

3.1.4. Espalhamento de Luz

A Figura 16 mostra que, no equilíbrio, a intensidade média de espalhamento de luz varia com a razão $R = \text{NaC/DODAC}$ seguindo o mesmo perfil da turbidez (Figura 13), confirmando, portanto, a transição vesícula-micela nesse sistema. A função distribuição do tempo de relaxação para diferentes frações R da mistura de

NaC/DODAC é mostrada na Figura 17. Essas curvas indicam que as dispersões de vesículas de DODAC 1,0 mM são muito polidispersas, e que a adição de NaC a essa dispersão preserva essa polidispersidade; porém, tende a deslocar os picos para a esquerda, indicando a formação de agregados menores. Provavelmente as micelas mistas de NaC/DODAC formadas são grandes e polidispersas, o que facilitaria a transição estrutural observada para $R \approx 0.9$. Cada pico da função distribuição corresponde a uma população, de modo que a Figura 17 indica sistemas altamente polidispersos.

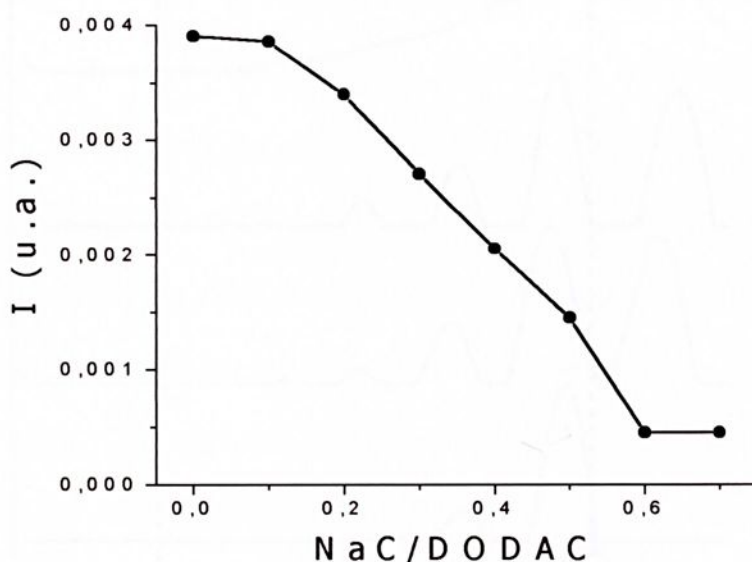


Figura 16 – Intensidade média de espalhamento de luz, em função de $R = \text{NaC/DODAC}$. Medidas realizadas a $\theta = 90^\circ$ e 25°C .

3.2. Sistemas Sal Biliar/DODAC/água

Distribuição do Tempo de Relaxação

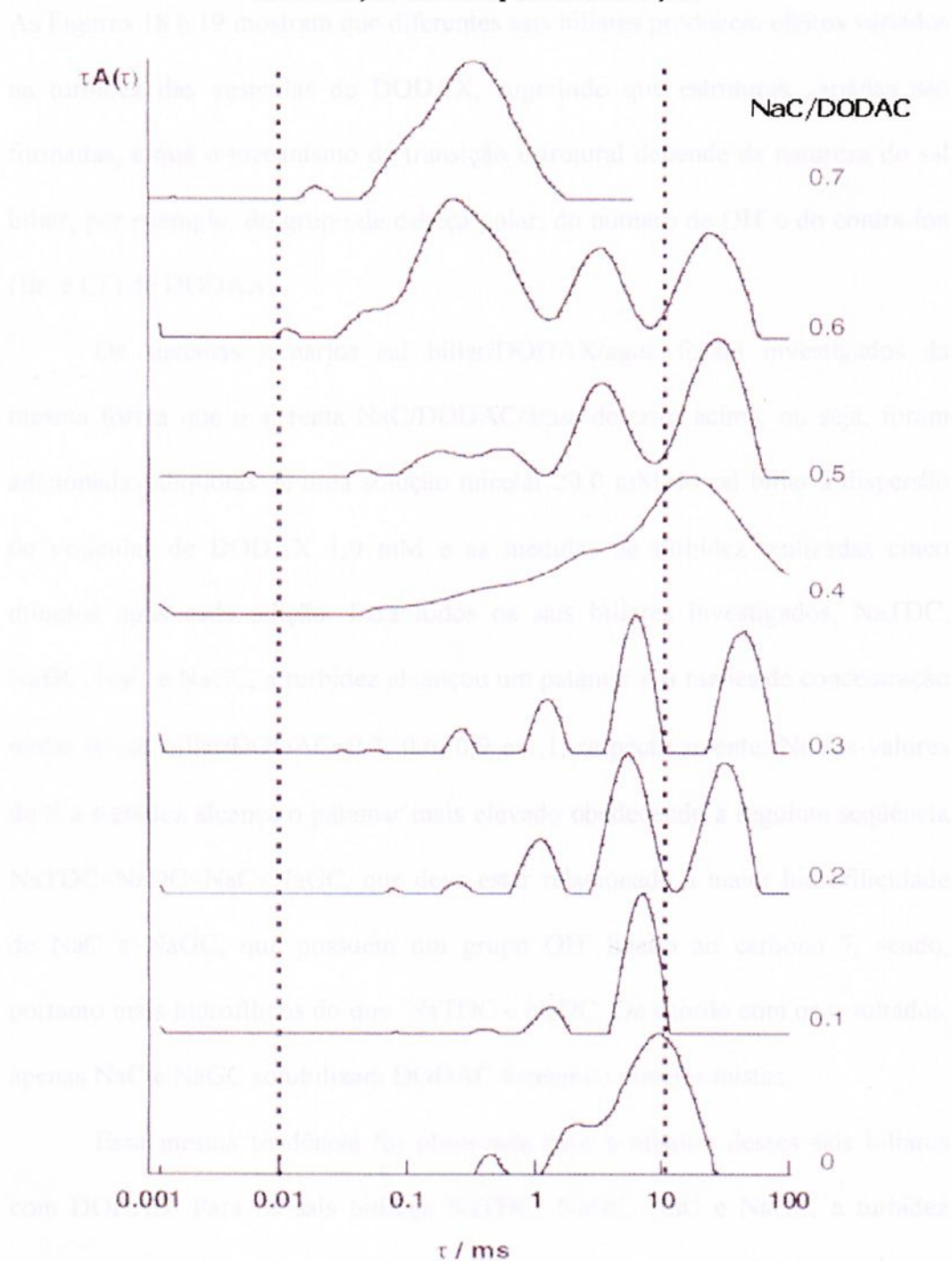


Figura 17 – Função distribuição do tempo de relaxação para diferentes razões

$R = \text{NaC/DODAC}$. Medidas realizadas a $\theta = 90^\circ$ e 25°C .

3.2. Sistemas Sal Biliar/DODAX/água

As Figuras 18 e 19 mostram que diferentes sais biliares produzem efeitos variados na turbidez das vesículas de DODAX, sugerindo que estruturas variadas são formadas, e que o mecanismo de transição estrutural depende da natureza do sal biliar, por exemplo, do grupo de cabeça polar, do número de OH^- e do contra-íon (Br^- e Cl^-) de DODAX.

Os sistemas ternários sal biliar/DODAX/água foram investigados da mesma forma que o sistema NaC/DODAC/água descrito acima, ou seja, foram adicionadas alíquotas de uma solução micelar 20,0 mM do sal biliar à dispersão de vesículas de DODAX 1,0 mM e as medidas de turbidez realizadas cinco minutos após cada adição. Para todos os sais biliares investigados, NaTDC, NaDC, NaC e NaGC, a turbidez alcançou um patamar nas razões de concentração molar $R = \text{sal biliar/DODAC} \approx 0,3, 0,6, 0,9$ e $1,1$, respectivamente. Nesses valores de R a turbidez alcança o patamar mais elevado obedecendo a seguinte seqüência $\text{NaTDC} < \text{NaDC} < \text{NaC} < \text{NaGC}$, que deve estar relacionado à maior hidrofilicidade de NaC e NaGC, que possuem um grupo OH^- ligado ao carbono 7, sendo, portanto mais hidrofílicos do que NaTDC e NaDC. De acordo com os resultados, apenas NaC e NaGC solubilizam DODAC formando micelas mistas.

Essa mesma tendência foi observada para a mistura desses sais biliares com DODAB. Para os sais biliares NaTDC, NaDC, NaC e NaGC, a turbidez alcança um patamar nas razões de concentração molar $R = \text{sal biliar/DODAB} \approx 0,2, 0,4$ e $0,9$ respectivamente, obedecendo a seguinte seqüência $\text{NaTDC} \approx \text{NaDC} < \text{NaC} < \text{NaGC}$. Nesses sistemas, todas as curvas alcançam um mesmo patamar e



apenas NaGC sugere transição vesícula-micela. As flutuações ou desvios observados nas curvas de turbidez dos sistemas sais biliares/DODAX/água se devem, possivelmente, a condição de “quase-equilíbrio” desses sistemas no momento das medidas, causada principalmente pela eficiência relativa da agitação mecânica da mistura feita no interior da cubeta do espectrofotômetro usando um agitador do tipo magnético. Os resultados deixam claro que o mecanismo de transição vesícula-estrutura complexa depende do sistema sal biliar/DODAX/água. Para alguns (NaTDC, por exemplo) essa transição é direta, e para outros, passa por um estágio micelar.

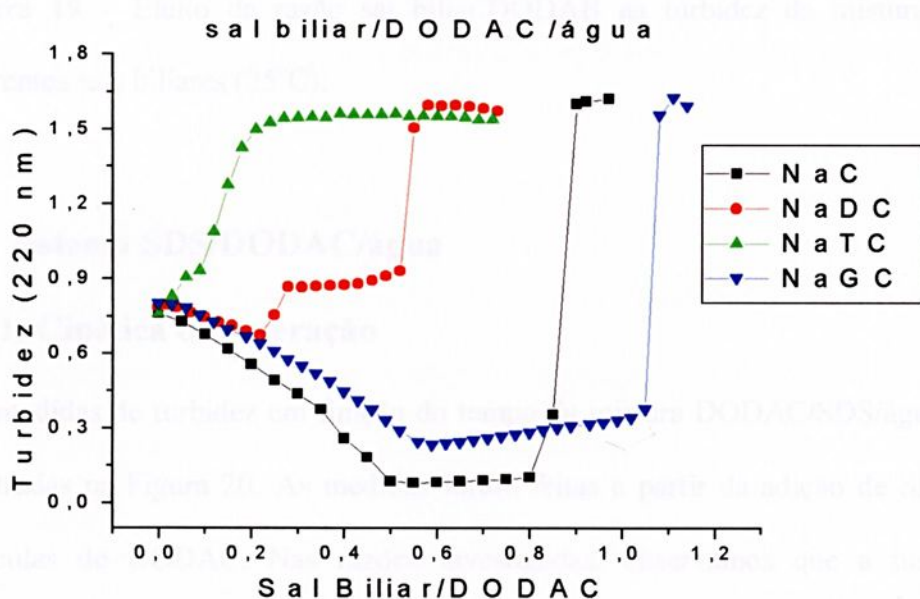


Figura 18 - Efeito da razão sal biliar/DODAC na turbidez da mistura para diferentes sais biliares (25°C).

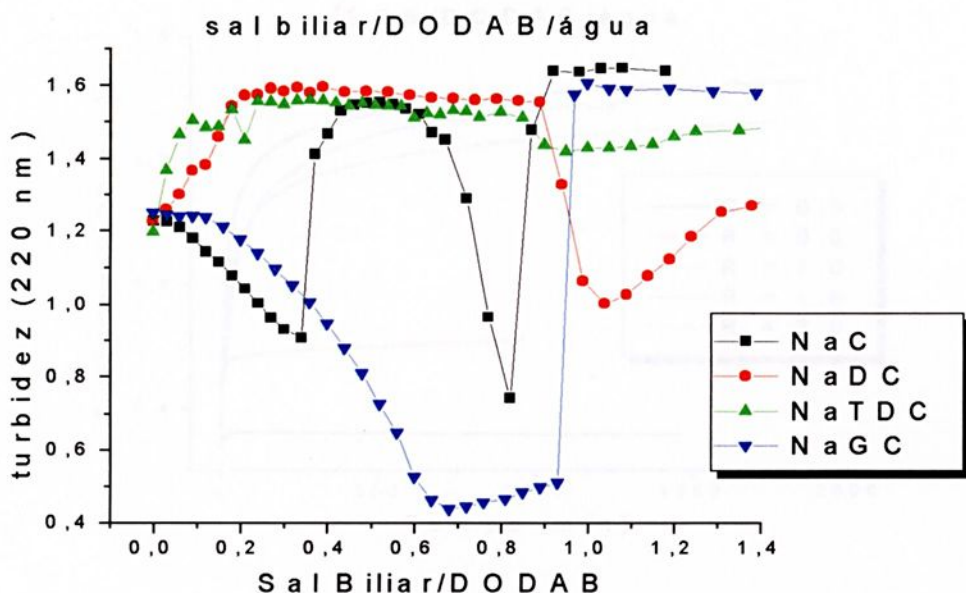


Figura 19 – Efeito da razão sal biliar/DODAB na turbidez da mistura para diferentes sais biliares (25°C).

3.3. Sistema SDS/DODAC/água

3.3.1. Cinética de Interação

As medidas de turbidez em função do tempo da mistura DODAC/SDS/água são mostradas na Figura 20. As medidas foram feitas a partir da adição de SDS às vesículas de DODAC. Nas razões investigadas, observamos que a turbidez aumenta com o tempo até um patamar de equilíbrio, e na região do patamar (região de estabilidade), a turbidez aumenta com R. Quanto maior R maior é o tempo necessário para o equilíbrio ser alcançado, ou seja, mais lenta é a cinética de interação.

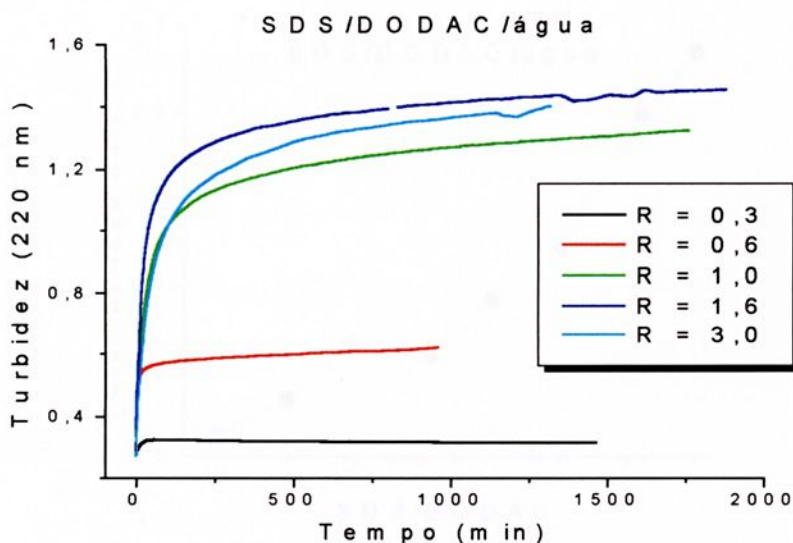


Figura 20 - Efeito do tempo na turbidez para $R = \text{SDS/DODAC} = 0,3, 0,6, 1,0, 1,6$ e $3,0$. O tempo $t=0$ corresponde ao instante da mistura dos surfactantes (25°C).

3.3.2. Turbidez vs. SDS/DODAC

A Figura 21 mostra a turbidez, em função da razão molar $R = \text{SDS/DODAC}$, para medidas realizadas 48 horas após a adição de alíquotas de solução concentrada de SDS na dispersão de DODAC. A turbidez aumenta com a adição de SDS até atingir um patamar entre $R=0,2$ e $0,3$, voltando a aumentar em seguida, indicando que o processo de agregação para formar agregados maiores se torna cada vez mais rápido e novas estruturas lamelares são formadas.

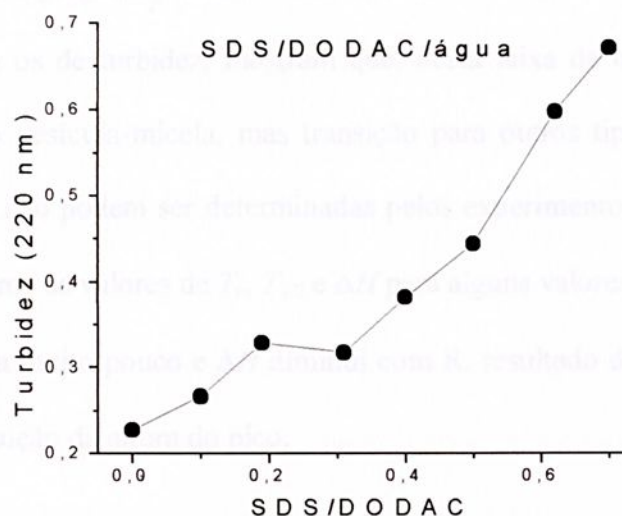


Figura 21 – Turbidez de DODAC/SDS/água em função da razão molar $R = \text{SDS/DODAC}$ (25°C).

3.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Termogramas DSC da mistura DODAC/SDS/água são mostrados na Figura 22. As medidas de DSC foram feitas aproximadamente 24 horas depois da adição de SDS às vesículas de DODAC. Para a dispersão de DODAC 1,0 mM em água ($R=0$), $T_c=49,0^{\circ}\text{C}$, em bom acordo com os trabalhos já publicados [FEITOSA *et al.*, 2000; BARRELEIRO *et al.*, 2001].

Com a adição de SDS a T_c diminui para $46,9^{\circ}\text{C}$, permanecendo praticamente constante até $R=0,3$ e a intensidade do pico de transição diminui até desaparecer em R entre 0,3 e 0,4, indicando que o processo de transição estrutural é gradativo. Entre $R = 0,3$ e 0,6 um novo pico aparece em temperaturas maiores do que a T_c devido à formação de novas estruturas supramoleculares. Para R maior do que 0,6,

outros tipos de agregados, menos estáveis, são formados. Estes resultados, juntamente com os de turbidez, mostram que, nesta faixa de concentração, não ocorre transição vesícula-micela, mas transição para outros tipos de agregados, cujas estruturas não podem ser determinadas pelos experimentos aqui realizados. A Tabela 3 resume os valores de T_c , $T_{1/2}$ e ΔH para alguns valores de R, mostrando que $T_{1/2}$ aumenta muito pouco e ΔH diminui com R, resultado do alargamento do pico e da diminuição da altura do pico.

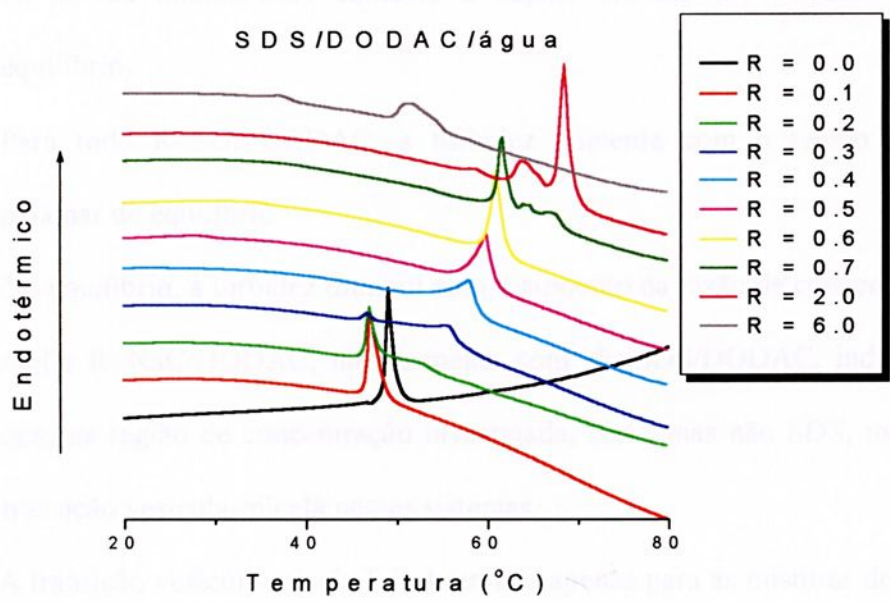


Figura 22 - Termogramas DSC de aquecimento de DODAC/SDS/água.

Tabela 3 – Valores de T_c , $T_{1/2}$ e ΔH de DODAC/SDS/água.

SDS/DODAC	T_c (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	ΔH (kcal/mol)
0,0	49,0	0,8	9,0
0,1	46,9	1,3	6,4
0,2	46,9	1,0	3,3
0,3	46,6	1,0	0,5



4. Conclusões

Com base nos resultados deste trabalho, enumeramos as seguintes conclusões:

1. Os agregados supramoleculares formados na mistura de sais biliares e SDS com vesículas de DODAX dependem da estrutura química e da concentração dos surfactantes.
2. Para pequenos valores de $R=\text{NaC}/\text{DODAC}$, a turbidez aumenta com o tempo; mas diminui para valores grandes de R ; para valores intermediários de R , ela inicialmente aumenta e depois diminui até o patamar de equilíbrio.
3. Para todo $R=\text{SDS}/\text{DODAC}$, a turbidez aumenta com o tempo até o patamar de equilíbrio.
4. No equilíbrio, a turbidez diminui com o aumento da razão de concentração molar $R=\text{NaC}/\text{DODAC}$, mas aumenta com $R=\text{SDS}/\text{DODAC}$, indicando que, na região de concentração investigada, NaC, mas não SDS, induz a transição vesícula-micela nesses sistemas.
5. A transição vesícula-micela foi observada apenas para as misturas de NaC e NaGC com DODAC e somente para a mistura de NaGC com DODAB. Os demais sais biliares investigados não apresentaram essa transição.
6. A T_c diminui continuamente com o aumento de $R=\text{NaC}/\text{DODAC}$ até desaparecer. O pico da transição se alarga continuamente com o aumento de R , indicando que a transição ocorre em intervalo de temperatura cada vez maior, ou seja, se torna menos cooperativa.



7. Micelas mistas de NaC/DODAC são formadas na faixa de $0,4 < R < 1,0$. Para R menor, tem-se, provavelmente, uma mistura de vesículas e micelas mistas em solução, e a transição vesícula-micela é suave. Para R maiores, a transição de micela para estruturas mais complexas (desconhecida, por enquanto) é pronunciada, ou seja, ocorre numa estreita faixa de R em torno de 0,9-1,0.
8. Os resultados de espalhamento dinâmico de luz mostram que a adição de NaC às vesículas de DODAC 1,0 mM em água levam à formação de estruturas menores. Nesta concentração a dispersão de DODAC e da mistura DODAC/NaC são bastante polidispersas; porém, os modos da distribuição do tempo de relaxação tendem a se deslocar na direção do modo mais rápido, indicando a formação de estruturas menores.
9. SDS diminui a T_c de DODAC, de 49 para 46,9°C, permanecendo constante nesse valor até a razão $R = \text{SDS}/\text{DODAC} \approx 0,3$, acima da qual aparece um novo pico acima da T_c , indicando a formação de agregados com estrutura diferente, maiores (maior turbidez) do que as vesículas de DODAC ou DODAC/SDS.
10. Na faixa de concentração investigada, a adição de SDS às vesículas de DODAC não induz a transição vesícula-micela, mas a outros tipos de estruturas supramoleculares mais complexas, cujos detalhes estruturais dependem de investigação mais detalhada, usando outros métodos experimentais, estando fora, portanto, do objetivo deste programa de mestrado.



Com base nessas conclusões, observamos que o efeito de sal biliar nas propriedades das vesículas catiônicas ainda é um campo em aberto, que requer maior atenção de pesquisadores no sentido de entender o efeito de diferentes sais biliares na estrutura e morfologia dessas vesículas, assim como o mecanismo de mudança estrutural na mistura. Este trabalho sugere, portanto, a continuidade da pesquisa para outros sais biliares e outros surfactantes derivados da amônia quaternária, como por exemplo, DODAB. Esse estudo pode ser útil no entendimento do efeito de sais biliares na solubilização de fosfolipídios e colesterol que se processam no organismo do ser humano.



11. Referências Bibliográficas

- Almog, S.; Kushnir, T.; Nir, S.; Lichtenberg, D. *Biochemistry* **1986**, 25, 2597.
- Aniansson, E. A., G.; Wall, S. N.; Almgren, M.; Hoffman, H.; Kielmann, I.; Ulbricht, W.; Zana, R.; Lang, J.; Tondre, C. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, 905.
- Bangham, A. D.; Morne, R. W. *J. Mol. Biol.* **1964**, 8, 660.
- Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G.; Brown, W.; Edwards, K.; Bonassi, N.; Feitosa, E. *Langmuir* **2002**, 18, 1024.
- Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G.; Feitosa, E. *Progr. Colloid Sci.* **2000**, 116, 33.
- Benatti, C. R. B.; Feitosa, E.; Fernandez, R. M.; Lamy-Freund, M. T. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, 111, 93.
- Benatti, C. R.; Tiera, M. J.; Feitosa, E.; Olofsson, G. *Thermochim. Acta* **1999**, 328, 137.
- Blandamer, M. J.; Briggs, B.; Cullis, P. M.; Last, P.; Engberts, J. B. F. N.; Kacperska, A. *J. Therm. Analysis Calorimetry* **1999**, 55, 29.
- Bonassi, N.; Tese de Doutorado, UNESP, São José do Rio Preto, 2003.
- Borgström, B. *Int. Rev. Physiol.* **1977**, 12, 305.
- Carey, M. C.; Small, D. M. *Amer. J. Med.* **1970**, 49, 590.
- Cevc, G.; Marsh, D. *Phospholipid bilayers*. Wiley: Nova Iorque, 1987.
- Cuccovia, I. M.; Feitosa, E.; Chaimovich, H.; Sepulveda, L.; Reed, W. *J. Phys Chem.* **1990**, 94, 3722.
- Cuccovia, I. M.; Sesso, A.; Abuin, E.; Okino, P. F.; Tavares, P. G.; Campos, J. F. S.; Florenzano, F. H.; Chaimovich, H. *J. Mol. Liquids* **1997**, 72, 323.



- Edwards, K.; Almgren, M.; Bellare, J.; Brown, W. *Langmuir*, **1989**, 5, 473.
- Evans, D. F.; Wennerstöm, H. *The Colloidal Domain, where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. VCH Publishers, Inc.: Nova Iorque 1999.
- Feitosa, E.; Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, 105, 201.
- Feitosa, E.; Brown, W.; Hansson, P. *Macromolecules* **1996**, 29, 2169.
- Feitosa, E.; Brown, W. *Langmuir* **1997**, 13, 4810.
- Feitosa, E.; Edwards, K.; Karlsson, G. (artigo submetido).
- Fendler, J. H. *Acc. Chem. Res.* **1987**, 13, 7.
- Hauser, H. In *Phospholipids Handbook*. Cevc, G. (Ed.); Marcel Dekker: Nova Iorque, 1993, p. 603.
- Hjelm, R. P.; Thiagarayan, P.; Alkan-Onyuksel, H. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 8653.
- Israelachvili, J. *Intramolecular and Surface Forces*, 2^a ed., Academic Press: Londres, 1992.
- Jönsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kromberg, B. *Surfactants and Polymers in aqueous Solution*. John Wiley: Nova Iorque, 1998.
- Kalyanasundaram, K. *Photochemistry Microheterogeneous Systems*, Academic Press: Londres, 1987.
- Kratohvil, J. P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, 26, 131.
- Kunitake, T.; Okahata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 99, 3860.



Lasic, D. D. *Liposomes: From Physics to Application*. Elsevier: Amdsterdam, 1993.

Lasic, D. In *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. Benita, S. (Ed.) Dekker, N.Y, 1996, p.297.

Lichtenberg, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 821, 470.

Lichtenberg, D.; Robson, R. J.; Dennis, E. A.; *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 737, 285.

Li, G.; McGown, L. B. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 13711.

Lindman, B.; Kamenka, N.; Brun, B. J. *Colloid Interface Sci.* **1976**, 56, 238.

Malloy R. C.; Binford Jr, J. S. *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 337.

Marques, E.F.; Khan, A.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 4729.

Marques, E.F.; Regev, O., Edlund, H. and Khan, A.; *Langmuir*, **2000**, 16, 8255.

Marques, E.F.; Regev, O., Khan, A.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 6746.

Marques, E.F.; Regev, O.; Khan, A.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *J. Phys. Chem.* **1999**, 103, 8353.

Matsuoka, K.; Maeda, M.; Moroi, Y. *Colloids and Surfaces B* **2003**, 32, 87.

Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Benedek, G. B. *Solution Behavior of Surfactants Theoretical and Apllied Aspects* V.1, Mittal, K. L.; Fendler E. J. (Eds.), 1982, p. 595.



- Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3064.
- Meyuhas, D.; Bor, A.; Pinchuk, I.; Kaplun, A.; Talmon, Y.; Kozlov, M. M.; Lichtenberg, D. J. *Colloid Interface Sci.* **1997**, *188*, 351.
- Mysels, K. J. *Hepatology* **1984**, *4*, 805.
- Nichols, J. W. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4600.
- Peres, P. Projeto de Iniciação Científica (concluído). FAPESP, Proc. 00/03809-5, 2001.
- Polozova, A. I.; Dubachev, G. E.; Simonova, T. N.; Barsukov, L. I. *FEBS Letters* **1995**, *358*, 17.
- Rosoff, M. *Vesicle*. 5^a Ed., Marcel Dekker, Nova Iorque, 1996, p.151.
- Schubert, R.; Schmidt, K. H. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8787.
- Small, D. M. *The Bile Acids*. Nair, P. P.; Kritchevsky, D. (Eds.), Plenum Press, Nova Iorque, 1971.
- Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of micelles and biological membranes*. 2^a ed., Wiley: Nova Iorque, 1991.
- Ulmius, J.; Lindblom, G.; Wenneström, H.; Johansson, L. B. Å; Fontell, K.; Söderman, O.; Arvidson, G. *Biochemistry* **1982**, *29*, 1553.
- van Hal, D. A.; Bouwstra, J. A.; Junginger, H. E. In *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. Benita, S. (Ed.) Dekker, N.Y, 1996, p.329.
- Walter, A.; Vinson, P. K.; Kaplun, A.; Talmon, Y. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1315.



