



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Monique Lemos

Transição vesícula-micela em mistura aquosa de sais dialquilados de amônio
quaternário com Pluronic® F127

São José do Rio Preto
2015

Monique Lemos

Transição vesícula-micela em mistura aquosa de sais dialquilados de amônio
quaternário com Pluronic® F127

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa

São José do Rio Preto
2015

Lemos, Monique.

Transição vesícula-micela em mistura aquosa de sais dialquilados de amônio quaternário com Pluronic® F127 / Monique Lemos. -- São José do Rio Preto, 2015
64 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Eloi da Silva Feitosa

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Sistemas de entrega de drogas. 4. Lipídios. 5. Polieletrólitos. 6. Potencial zeta. I. Feitosa, Eloi da Silva. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Monique Lemos

Transição vesícula-micela em mistura aquosa de sais dialquilados de amônio
quaternário com Pluronic® F127

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dra. Renata Danielle Adati
UNESP – São José do Rio Preto
Co-orientadora

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino
UNESP – Presidente Prudente

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de Fevereiro de 2015

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

Dedico este Trabalho a minha família e ao meu namorado Thiago pelo amor, carinho e incentivo, a UNESP, aos meus professores e, acima de tudo, a Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Eloi da Silva Feitosa por toda disposição em ensinar, ajudar nas mais diversas situações e pela excelente orientação na realização deste trabalho.

À Professora Dra. Renata Danielle Adati pela co-orientação e sugestões valiosas, por toda sua paciência e pelo exemplo de dedicação em ensinar e orientar na realização deste trabalho.

A minha família por todo apoio, carinho e atenção. Dedicação sem limites para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós Graduação em Biofísica Molecular pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Às amigas do Laboratório: Dra. Gisele Gasparotto, Aline Maximiliano e Ligia Maria Landi pelas dicas, conversas e materiais. Vocês foram fundamentais.

À Professora Máisa Martins pelo apoio e dedicação em ensinar outro idioma. Sem a sua contribuição não seria possível a elaboração deste trabalho. Muito Obrigado.

A todos aqueles de alguma forma participaram da elaboração deste trabalho e principalmente a Deus que permitiu a concretização de mais uma etapa em minha vida.

RESUMO

Estudou-se o efeito do comprimento das cadeias alquílicas (C_{12} e C_{18}) e do contra íon (Br^- e Cl^-) dos lipídios catiônicos derivados de amônio quaternário, formadores de vesículas, brometo de didodecildimetilamônio (DDAB), brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC), na interação com o copolímero tribloco Pluronic[®] F127 (F127), formador de micelas. Foram investigadas as propriedades térmicas e estruturais das vesículas e micelas formadas. Foi fixada a concentração lipídica em 1 mM, na qual predominam vesículas unilamelares em dispersão aquosa e variada a concentração de F127 0,05 até 5mM. As amostras foram monitoradas pelas técnicas de turbidimetria, calorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento dinâmico eletroforético de luz (DELS). Os resultados indicam transição vesícula-micela, que ocorre em três estágios: no primeiro estágio, há predominância de vesículas mistas, no segundo estágio coexistem vesículas e micelas mistas e, no terceiro estágio, o sistema é dominado por micelas mistas. Os complexos formados consistem de vesículas ou de micelas mistas de lipídio/F127, respectivamente em baixas e altas concentrações do copolímero. Esses complexos vesiculares e micelares podem servir de modelos de lipoplexos e poliplexos na interação das vesículas e micelas mistas com ácido nucleico (DNA ou RNA), respectivamente.

Palavras-chave: DSC, copolímero tribloco, espalhamento dinâmico de luz, lipídio catiônico, potencial zeta, lipoplexos, poliplexos.

ABSTRACT

It has been studied the effects of the alkyl chain length (C_{12} and C_{18}) and counterion (Br^- and Cl^-) of the vesicle-forming quaternary ammonium cationic lipids from didodecyldimethylammonium bromide (DDAB), dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) and dioctadecyldimethylammonium chloride (DODAC), on the interaction with the micelle-forming triblock copolymer Pluronic[®] F127(F127). Thermal and structural properties of vesicles and micelles formed were investigated. The lipid concentration was fixed at 1 mM at which predominantly unilamellar vesicles are formed in aqueous dispersion and varied the F127 concentration up to 5 mM. The samples were monitored by turbidimetry, differential scanning calorimetry (DSC), dynamic light scattering (DLS) and dynamic electrophoretic light scattering (DELS) techniques. The results indicate vesicle-micelle transition, which occurs in three stages: in the first stage there is predominance of mixed vesicles; in the second stage there co-exist mixed vesicles and micelles; and in the third stage the system is dominated by mixed micelles. The complexes formed consist of mixed vesicles or micelles from lipidF127, respectively at low and high copolymer concentrations. These vesicle and micelle complexes can serve as template for lipoplexes and polyplexes in the interaction of mixed micelles and vesicles with nucleic acid (DNA or RNA), respectively.

Keywords: DSC, triblock copolymer, dynamic light scattering, cationic lipid, zeta potential, lipoplexes, polyplexes

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Pluronic® F127 (F127).....	17
1.2 Lipídios Catiônicos	19
1.3 Aplicações.....	24
2.OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Materiais.....	25
3.2 Preparações das Amostras.....	25
3.2.1 Preparação das Vesículas.....	25
3.2.2 Preparação das soluções de F127.....	25
3.2.3 Preparação das amostras de Lipídio/F127	26
3.3 Caracterização.....	26
3.3.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	26
3.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	27
3.3.3 Espalhamento dinâmico eletroforético de luz (DELS).....	28
3.3.4 Turbidimetria.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Estudo por turbidimetria.....	30
4.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	31
4.2.1 Solução de F127.....	32
4.2.2 Dispersão DODAB/F127.....	34
4.2.3 Dispersão de DODAC/F127.....	37
4.2.4 Dispersão DDAB/F127.....	40
4.3 Determinação do Raio hidrodinâmico.....	46

4.4 Potencial zeta e condutividade	48
4.5. Modelo proposto para os complexos Lipídios catiônicos-F127.....	49
5.CONCLUSÃO.....	50
6.PERSPECTIVAS.....	51
7.REFERÊNCIAS.....	52
8.ANEXOS	58
ANEXO I	58

ABREVIATURAS

cmc = concentração micelar crítica

cmt = temperatura micelar crítica

CVC = concentração vesicular crítica

DDAB = brometo de didodecildimetilamônio

DNA = ácido desoxirribonucleico

DODAB = brometo de dioctadecildimetilamônio

DODAC = cloreto de dioctadecildimetilamônio

EO = óxido de etileno

F127 = Pluronic[®] F127

k_B = constante de Boltzmann

MIC = micelas mistas

PEO = poli(óxido de etileno)

PO = óxido de propileno

PPO = poli(óxido de propileno)

RNA = ácido ribonucleico

T_m = temperatura de transição do estado principal

T'_m = temperatura de transição reversa do estado principal

T_p = temperatura de transição do estado gel-para-liquido cristalino de multilamelas

T'_p = temperatura de transição do estado liquido cristalino-para-gel intermediário de multilamelas

T_s = temperatura de transição do estado gel-para-estado gel intermediário de vesículas

T'_s = temperatura de transição do estado gel intermediário-para-estado gel de vesículas

VES = vesícula mistas

ΔH = variação da entalpia

ΔH_m = variação da entalpia da transição principal

$\Delta H'_m$ = variação da entalpia da transição reversa principal

ΔH_s = variação da entalpia da transição do estado gel-para-estado gel intermediário de vesículas

$\Delta T_{1/2}$ = largura do pico a meia altura

ϵ = constante dielétrica

ζ = potencial zeta

λ = comprimento de onda

μ_e = mobilidade eletroforética

η = viscosidade do meio

κ = comprimento de Debye

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (a) Estrutura molecular de F127, onde a representa o número de óxido de etileno e b representa o número de óxido de propileno, sendo $a = 99$ e $b = 65$. (b) Representação esquemática de uma micela de copolímero.....18
- Figura 2.** Representação esquemática do lipídio (a) e as três estruturas formadas por lipídios em solução aquosa: vesícula unilamelar (b), micela (c) e bicamada (d).....19
- Figura 3.** Representação esquemática de bicamada lipídica estruturada em: vesícula unilamelar pequena (SUV), vesícula unilamelar grande (LUV), vesícula unilamelar gigante (GUV), vesícula multilamelar (MLV) e vesícula oligomérica (OVV).....20
- Figura 4.** Transições estruturais de LUV para MLV e estrutura multilamelar planar induzida pelo aumento da concentração lipídica. As setas indicam o aumento da concentração lipídica.....21
- Figura 5.** Transições de estados características de bicamadas lipídicas.....23
- Figura 6.** Método de preparo das misturas entre Lipídio/F127. Em cada amostra foi adicionado apenas um Lipídios em fração diferentes de concentração de F127.....26
- Figura 7.** Componentes essenciais de um equipamento de espalhamento de luz. O detector está posicionado no ângulo de espalhamento de 90°28
- Figura 8.** Efeito da concentração de F127 na turbidez em 250 nm para dispersões vesiculares (1mM) de (a) DODAB, (b) DODAC, (c) DDAB e (d) F127.....31
- Figura 9.** Termogramas de F127 obtidos por (a) aquecimento e (b) resfriamento, para diferentes concentrações do copolímero. Tempo de pré-varredura de 15 min e taxa de varredura 60°C/h33
- Figura 10.** Efeito da [F127] na cmt e ΔH , parâmetros obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).....34
- Figura 11.** Termogramas DSC, obtidos no aquecimento (a) e no resfriamento (b) de dispersões de DODAB 1mM, na ausência e na presença de F127, conforme indicado.....36
- Figura 12.** Efeito da [F127] na T_m e ΔH_m (a), cmt e ΔH (b) dos sistemas F127/DODAB obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).37
- Figura 13.** Termogramas DSC, obtidos no aquecimento (a) e no resfriamento (b) de dispersões de DODAC 1 mM, na ausência e na presença de F127, em concentração crescente, conforme indicado.....39
- Figura 14.** Efeito da [F127] na T_m e ΔH_m (a), cmt e ΔH (b) dos sistemas F127/DODAC obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).....40

Figura 15. Efeito do tempo de equilíbrio (pré-varredura) no termograma de aquecimento de F127 na concentração de 2 mM, obtido à taxa de varredura de 20 °C/h. A quarta varredura (de baixo para cima) foi obtida no resfriamento.....	41
Figura 16. Termogramas DSC de DDAB 1mM, na ausência e na presença de F127, conforme indicado. Aquecimento, com tempo de equilíbrio monitorado em: 15 min(a), 6 h (b) e 12 h (c).	43
Figura 17. Termogramas DSC de DDAB 1mM, conforme indicado, por resfriamento com tempo de equilíbrio de 15min.....	43
Figura 18. Efeito da [F127] na T_m e ΔH_m (a), c_{mt} e ΔH (b) dos sistemas F127/DDAB obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).	44
Figura 19. Termogramas DSC obtidos por resfriamento de DDAB 1 mM na presença de F127, com taxa de varredura de 20°C/h.....	45
Figura 20. Efeito da [F127 mM] no R_H das vesículas DODAB (a), DODAC (b) e DDAB (c). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.....	47
Figura 21. Efeitos da concentração de F127 no potencial zeta (ζ) e na condutividade DODAB,DODAC e DDAB a 25 °C.....	49
Figura 22. Possíveis modelos de interação lipídio-copolímero em bicamada e micelas.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros térmicos de F127 mM obtidos no aquecimento e no resfriamento.....	58
Tabela 2. Parâmetros térmicos de DODAB 1mM no aquecimento.....	59
Tabela 3. Parâmetros térmicos de DODAB 1mM no resfriamento.....	60
Tabela 4. Parâmetros térmicos de DODAC 1mM no aquecimento.....	60
Tabela 5. Parâmetros térmicos da DODAC 1mM no resfriamento.....	61
Tabela 6. Parâmetros térmicos de F127 na concentração de 2 mM.....	61
Tabela 7. Parâmetros térmicos de DDAB 1 mM por aquecimento com pré-equilíbrio - 12 h.....	62
Tabela 8. Parâmetros térmicos de DDAB 1 mM por resfriamento com pré-equilíbrio -15min.....	63
Tabela 9. Parâmetros térmicos de DDAB 1,0mM /F127 por aquecimento com pré-equilíbrio -15min.....	63
Tabela 10. Parâmetros térmicos de DDAB 1,0mM /F127 por aquecimento com pré-equilíbrio - 6 h.....	64

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas vários grupos de pesquisa têm direcionado interesse para otimização do sistema de entrega de drogas para células-alvo. Esses estudos normalmente consistem em desenvolver novos modelos para carreadores não virais de fármacos ou material genético, pois, apesar das vantagens dos carreadores virais, seus efeitos colaterais costumam ser nocivos ao organismo humano. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de novos carreadores não virais de drogas eficientes. Os lipídios e polieletrólitos catiônicos são promissores para superar essa desvantagem dos carreadores virais, devido ao seu potencial para compactar ácido nucleico a fim de transportá-lo até a célula-alvo [LASIC; TEMPLETON, 1996; ZHADANOV; PODOBED; VLASSOV, 2002].

O uso de lipídios e polieletrólitos catiônicos como carreadores não virais esbarra em alguns problemas básicos, como a citotoxicidade e a baixa eficiência de transfecção [VIEIRA; PACHECO; CARMONA-RIBEIRO, 2006]. Muitos estudos têm sido realizados visando superar esses problemas, com destaque para a síntese de novos lipídios e polímeros com baixa citotoxicidade e maior eficiência em transfecção. Estes novos compostos, entretanto, são em geral, de difícil acesso devido ao custo elevado ou por serem patenteados. Uma alternativa consiste em utilizar lipídios ou polímeros comerciais, de baixo custo.

Normalmente a preparação de carreadores requer um *helper*, a fim de otimizar a eficiência de transfecção celular e reduzir a citotoxicidade. Os *helpers* são aditivos como polímeros, copolímeros, tensoativos e sais em geral [LIANG; CHOU, 2009; LV et al., 2006; STEFANUTTI et al., 2014]. A interação desses aditivos (*helpers*) com lipídios e polímeros catiônicos pode resultar em alterações no grau de fluidez e na estrutura dos carreadores tornando-os mais eficientes e menos citotóxicos [OLIVEIRA et al., 2012].

Estudos recentes com DODAB e DODAC em misturas com monoleína, colesterol e siRNA, indicam que DODAB é mais eficiente para transfecção celular e menos citotóxico do que DODAC [OLIVEIRA et al., 2014]. Lipídios catiônicos também interagem com nanopartículas, formando sistemas coloidais com potencial para aplicação na área farmacêutica [HOPE, 2014].

Pesquisas têm demonstrado a importância da interação entre lipídios catiônicos (e.g. DDAB, DODAB), polímeros naturais (e.g., DNA), sintéticos (e.g., PEG) e copolímeros (e.g. F127) [BARRELEIRO; OLOFSSON; ALEXANDRIDIS, 2000; ANTUNES et al., 2009; FEITOSA; WINNIK, 2010]. As micelas formadas por copolímeros já foram avaliadas em aplicações farmacêuticas, com resultados favoráveis [CHANDAROY et al., 2001; KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002], assim como complexos formados pela mistura de vesículas de lipídios catiônicos com moléculas de DNA [BARRELEIRO; OLOFSSON; ALEXANDRIDIS, 2000]. O estudo da

interação entre F127 e vesículas catiônicas pode proporcionar avanços na pesquisa farmacológica e de nanomedicina, especialmente em terapia gênica.

Os lipídios catiônicos em solução aquosa formam uma variedade de agregados supramoleculares, dependendo da concentração, da composição química e da temperatura [ALVES et al., 2007]. Estudamos o efeito da solução de lipídios catiônicos DDAB, DODAB ou DODAC com o copolímero neutro Pluronic[®]F127 (F127) sobre as propriedades térmicas e estruturais de vesículas e micelas nesses sistemas, visando o desenvolvimento futuro de lipoplexos ou poliplexos com DNA ou RNA. A carência de estudos sobre a interação entre copolímeros triblocos e lipídios catiônicos, nos motivou a realizar este estudo para vesículas de DDAB, DODAB ou DODAC, considerando o efeito do comprimento das cadeias alquílicas (C_{12} e C_{18}) e do contra íon (Br^- ou Cl^-).

Detalhes das propriedades térmicas e estruturais das vesículas desses lipídios encontram-se na literatura [FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000; FEITOSA et al., 2012; MARQUES; KHAN; LINDMAN, 2002], assim como da interação de DODAB com F127 investigada por DSC [FEITOSA; WINNIK, 2010]. Este estudo é aqui estendido para os lipídios DDAB e DODAC, utilizando outras técnicas além de DSC, como turbidimetria, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento dinâmico eletroforético de luz (DELS).

1.1 Pluronic[®] F127 (F127)

Copolímeros triblocos do tipo [poli(óxido etileno)]_a-[poli(óxido propileno)]_b-[poli(óxido etileno)]_a, ou P(OE)_a-P(OP)_b-P(OE)_a, sendo a e b números de cadeias de OE (óxido de etileno) e OP (óxido de propileno), respectivamente, conhecido como Pluronic[®] (nome comercial dado pela BASF, uma das empresas que o fabrica) ou Poloxamer (nome dado por Irving Schmolka, patente recebida em 1973). O copolímero consiste de blocos de segmentos dos polímeros OE e OP, respectivamente hidrofílico e hidrofóbico, dispostos na sequência P(OE)_a-P(OP)_b-P(OE)_a e em tamanhos variados, dados pelos valores de a e b . Esta disposição resulta em copolímeros anfifílicos, onde o número de unidades hidrofílicas OE e de unidades hidrofóbicas OP assumem valores diversos [KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002], tornando o copolímero mais ou menos hidrofóbico. A característica anfifílica confere aos copolímeros triblocos a possibilidade de se auto-associarem em solução aquosa em estruturas micelares ou vesiculares, no regime diluído [HAMLEY, 2005; WANKA; HOFFMANN; ULBRICHT, 1994].

A possibilidade de variar a extensão dos blocos OE e OP confere aos copolímeros vasta gama de aplicação, como em sistemas de distribuição controlada de fármacos e terapia gênica, pois, dependendo da fração desses segmentos hidrofílico/hidrofóbico, um número de estruturas

supramoleculares e fases diferentes podem ser formados com potencial de aplicações diversas [KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002].

O copolímero F127 (POE₉₉-POP₆₅-POE₉₉), MM 12.600 g/mol, Figura 1a-b, utilizado neste estudo, apresenta valores de temperatura micelar crítica (cmt) e concentração micelar crítica (cmc) dependentes da concentração e temperatura, respectivamente [KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002; MORTENSEN, 2001]. As micelas são formadas pela associação dos segmentos de OP no núcleo hidrofóbico e uma coroa formada por segmentos de OE, hidrofílico, conforme mostrado na Figura 1c [ALEXANDRIDIS et al., 1994, 1995; HECHT; HOFFMANN, 1995; MORTENSEN, 2001;].

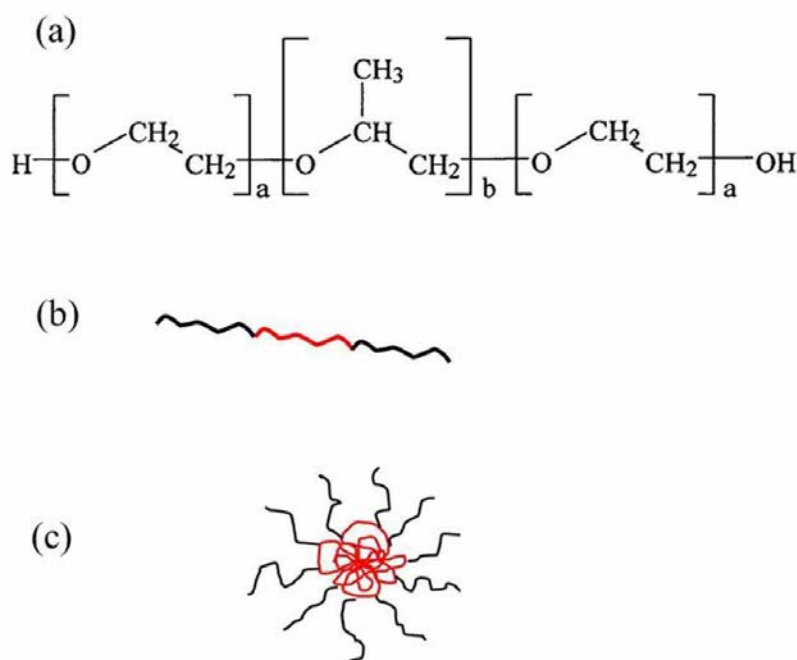


Figura 1. (a) Estrutura molecular de F127, onde a representa o número de óxido de etileno e b representa o número de óxido de propileno, sendo $a = 99$ e $b = 65$. (b) forma cadeia estendida do copolímero. (c) Representação esquemática de uma micela de copolímero tribloco.

Em solução aquosa e abaixo da cmc e cmt, F127 encontra-se na forma de cadeia estendida, Figura 1b. Quando a concentração e/ou a temperatura excede a cmc e/ou cmt, ocorre micelização, com núcleo hidrofóbico de POP e uma coroa hidrofílica de POE, Figura 1c [HECHT; HOFFMANN, 1995; MORTENSEN, 2001]. Outra característica dos copolímeros triblocos em geral, é o grande potencial dessas moléculas de gelificação, sob condições específicas de concentração e temperatura [BOHORQUEZ et al., 1999; CHAIBUNDIT et al., 2007; GAUCHER, et al., 2005]. Portanto, variações na concentração e na temperatura ocasionam alterações estruturais com potencial de

aplicação industrial [WENZEL et al., 2002, RASSING; ATTWOOD, 1982, ZHANG; LAM; TAN, 2005; SU; WEI; LIU, 2003].

Os sistemas contendo F127 podem ser usados no *design* de novos modelos de carreadores não virais de fármaco ou gene. Para fins de aplicação futura em terapia gênica ou entrega controlada de fármacos, estudamos a inclusão de F127 às estruturas vesiculares catiônicas, como possível modelador da fluidez dos lipoplexos ou poliplexos, a fim de minimizar a toxicidade e maximizar a eficiência da transfecção celular.

1.2 Lipídios Catiônicos

Lipídios catiônicos são moléculas anfífilas, classificadas, de acordo com as suas composições químicas, como aniônicos, catiônicos, não iônicas e *zwiteriônicas*. A associação dos lipídios forma agregados como micelas, vesículas, monocamadas (ou filmes de Langmuir) e bicamadas unilamelares ou multilamelares, entre outras estruturas mais complexas (Figura 2). Essas estruturas são formadas devido ao efeito hidrofóbico, Figura 2a, como resultado do contato energeticamente desfavorável entre a parte apolar dos lipídios e moléculas de água [GRADZIELSKI et al., 1999, SEGOTA; TEZAK, 2006]. O tipo de estrutura formada pela associação de lipídios é determinado, pelo parâmetro de empacotamento do lipídio, $P = v/al$, onde v e l representam o volume e comprimento das cadeias hidrofóbicas respectivamente e a é a área secção da reta ocupada pelo grupo polar do lipídio no agregado formado [ISRAELACHVILLI, 2011]. Assim, para micelas, $P < 0.5$, vesículas, $0.5 < P < 1$, e bicamadas planas, $P \approx 1$. [ISRAELACHVILLI, 2011, p.549].

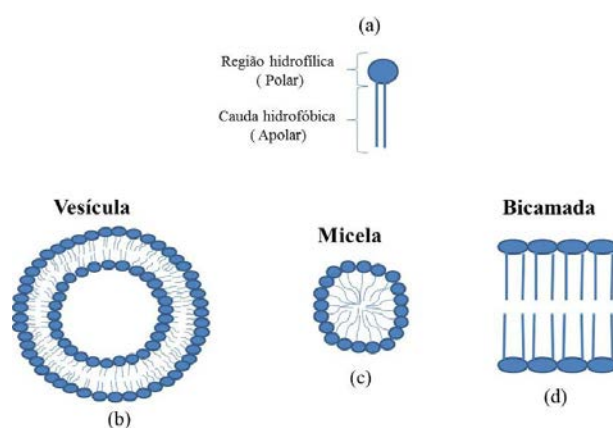


Figura 2. Representação esquemática do lipídio (a) e as três estruturas formadas por lipídios em solução aquosa: vesícula unilamelar (b), micela (c) e bicamada (d).

As estruturas das vesículas, unilamelares, multilamelares ou oligoméricas, são determinadas pela concentração lipídica e pela composição do solvente (pH, força iônica, temperatura). As vesículas unilamelares (UV) consistem de uma bicamada lipídica com raio (R) e geometria variados, sendo pequenas (SUV, $R \approx 4 - 20$ nm), grandes (LUV, $R \approx 50$ nm - $10 \mu\text{m}$), ou gigantes, (GUV, $R > 10 \mu\text{m}$) [GRADZIELSKI et al., 1999, SEGOTA; TEZAK, 2006]. As vesículas multilamelares (MLV) são estruturas formadas por duas ou mais camadas concêntricas. As vesículas oligoméricas, ou multiestruturais (OVV), consistem de pequenas vesículas incorporadas no interior aquoso de uma vesícula maior, (Figura 3) [VAN DER LINDEN; BUYTENHEK, 1997; SEGOTA; TEZAK, 2006].

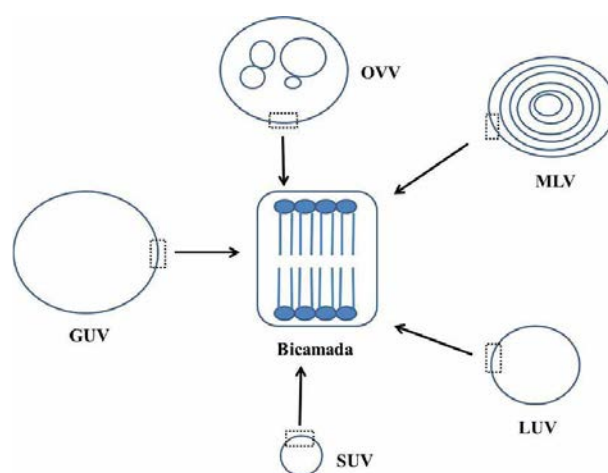


Figura 3. Representação esquemática de bicamada lipídica estruturada em: vesícula unilamelar pequena (SUV), vesícula unilamelar grande (LUV), vesícula unilamelar gigante (GUV), vesícula multilamelar (MLV) e vesícula oligomérica (OVV).

Alguns lipídios, DODAB ou DODAC, se auto associam em solução aquosa por diluição simples dos lipídios. Esses lipídios, em baixas concentrações, 0 a 1 mM predominam LUVs, em elevadas concentrações, 65 a 120 mM, predominam as MLVs, e em concentrações intermediárias, 1 a 65 mM essas estruturas coexistem. Esses lipídios possuem uma concentração vesicular crítica (CVC) pouco definida, abaixo da qual os monômeros estão dispersos em solução [FEITOSA et al., 2012, FEITOSA, ADATI, ALVES, 2015]. Trabalho recente do nosso grupo observou que para DODAC, as LUVs predominam em concentrações lipídicas maiores do que DODAB, evidenciando o forte efeito do contra íon na estrutura das vesículas [FEITOSA; ADATI; KARLSSON, 2014].

Transições estruturais induzidas pela variação na concentração lipídica estão representadas na Figura 4 [SEGOTA; TEZAK, 2006]. As estruturas e os tamanhos das vesículas também estão relacionados ao método de preparação das vesículas. Os métodos mais utilizados são o espontâneo, injeção orgânica (etanólica, clorofórmica etc.), sonicação, extrusão e hidratação de filmes lipídicos

[FEITOSA; BROWN, 1997, FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000; OLSON et al.,1979, BATZRI; KORN 1973].



Figura 4. Transições estruturais de LUV para MLV e estrutura multilamelar planar induzida pelo aumento da concentração lipídica. As setas indicam o aumento da concentração lipídica.

Desde meados da década de 1970, quando Kunitake e Okahata reportaram pela primeira vez a formação, por sonicação em banho, de vesículas de anfílicos catiônicos sintéticos derivados de amônios quaternários (DDAB) [KUNITAKE; OKAHATA, 1977], diferentes métodos de preparação têm sido explorados para obter vesículas com tamanho e forma variados e reprodutíveis, visando aplicações com interesses variadas [SEGOTA; TEZAK, 2006, KUNITAKE; OKAHATA, 1977].

Dentre os métodos de preparação das vesículas existentes, destacamos o método espontâneo que consiste na formação das vesículas em solvente aquoso, simplesmente aquecendo a mistura lipídio/solvente acima da transição do estado gel para líquido cristalino do lipídio [FEITOSA; JANSSON; LINDMAN, 2006].

Vesículas de DODAB, DODAC e DDAB formadas pelo método espontâneo têm sido muito investigadas pelas técnicas de DSC e ITC [SEGOTA; TEZAK, 2006, FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000, LASIC, 1988] de modo que suas propriedades físico-químicas são bem conhecidas. Além disso, este método oferece maior reprodutibilidade do que os demais, não envolver nenhum tipo de contaminante (solvente orgânico). [BATZRI; KORN, 1974, VAN DER LINDER; BUYTENHEK, 1997]. Neste trabalho optamos pela formação das vesículas pelo método espontâneo.

Existem outros métodos como: (i) o de sonicação para a obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUV) [HAUSER; BARRATT, 1973], (ii) o processo de extrusão consiste em filtrar a dispersão vesicular, formada pelo método espontâneo, através das membranas de extrusão com poros de diâmetros definidos [LOPES; EDWARDS; FEITOSA, 2008], e (iii) o método de injeção de uma solução orgânica, normalmente etanólica ou clorofórmica, os lipídios (dependo do tamanho da cauda lipídica e o contra - íons) são dissolvidos em etanol ou clorofórmio e injetados em solução aquosa desejada.

Lipídios catiônicos em solução aquosa, a uma temperatura acima da sua temperatura de transição de estado gel para líquido cristalino (T_m), sob agitação mecânica suave, se auto organizam, em vesículas com tamanho e estruturas variadas. Vesículas unilamelares e multilamelares, além de estruturas multilamelares planas podem coexistir na dispersão de DODAB, por exemplo [FEITOSA et al. 2012] ou ocorrer separação de fases, como observado em dispersões de DDAB [FEITOSA; ADATI, 2014].

Uma das propriedades características dessas vesículas é a transição do estado gel para líquido-cristalino (LC), que ocorre em torno de uma temperatura bem definida, por exemplo no dispersão de DDAB, DODAB e DODAC. Essa transição ocorre numa faixa de temperatura que varia com o tipo de lipídio, com concentração lipídica, com o método de preparação das vesículas, com o tipo de estrutura supramolecular formado, e com a presença de aditivos em geral (que afeta o tipo de estrutura). Desse modo, o valor da T_m não pode ser considerado uma característica do lipídio, mas sim do sistema vesicular em particular [FEITOSA; JANSSON; LINDMAN, 2006].

Outra característica térmica importante das vesículas consiste no fato da transição gel para LC ocorrer diretamente ou não no aquecimento da amostra. O DDAB e DODAC possuem uma única transição térmica, atribuída à transição gel para LC, enquanto que DODAB possui três transições bem definidas, em torno de T_s , T_m e T_p , onde T_s é a temperatura de transição do estado gel para o estado intermediário e T_p devido a formação de estruturas multilamelares [FEITOSA et al., 2012].

Na fase gel da bicamada os lipídios estão completamente distendidos no seu interior numa direção perpendicular ao plano da bicamada, deixando esta mais rígida; no estado líquido-cristalino (LC), as caudas dos lipídios na bicamada encontram-se recolhidas, deixando a mais fluida, Figura 5. No estado intermediário as caudas dos lipídios encontram-se inclinados em relação ao plano da bicamada, levando a uma conformação ondulada para a bicamada das vesículas, e transições apresentam um pico endotérmico no termograma DSC em torno da temperatura T_s . Em água, os valores da T_m diferem para DDAB, DODAB e DODAC, $T_m \approx 16, 45$ e 49 °C, respectivamente, sendo para DODAB, $T_s \approx 36$ °C [FEITOSA, 2010, FEITOSA et al., 2012, FEITOSA et al., 2009].

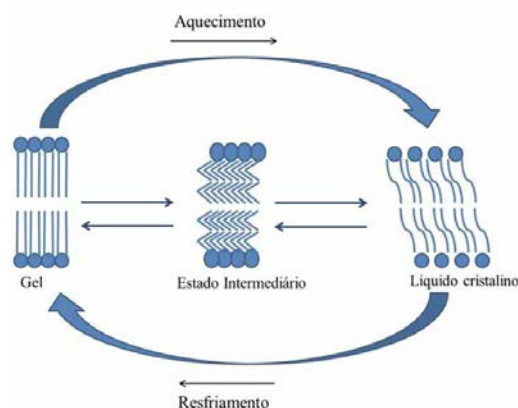


Figura 5. Transições de estados características de bicamadas lipídicas

No resfriamento, DODAB e DODAC apresentam uma transição exotérmica do estado LC para o estado intermediário ou gel em torno de $T'_m \approx 40$ e 44 °C, respectivamente; apresentando uma histerese térmica, $\Delta T_m = T_m - T'_m \approx 5$ °C, para ambos. Para DODAB, a transição exotérmica correspondente à transição do estado intermediário para o estado gel ocorre em torno de $T'_s \approx 11-13$ °C, apresentando, portanto, grande histerese $\Delta T_s > 20$ °C. O DODAB apresenta uma terceira transição em torno de $T_p \approx 53$ °C. Esta transição, segundo estudos recentes, se deve à formação de estruturas de bicamadas multilamelares, mais compactamente organizadas do que as bicamadas das vesículas [FEITOSA et al., 2012]. DODAC não apresentam esta transição (pelo menos até 20 mM), indicando que esses lipídios se associam preferencialmente em estruturas unilamelares.

Por fim, DDAB não apresenta nenhuma transição reversa detectada por medidas diretas de DSC ou outro método, pelo fato da transição LC para gel ser demasiadamente lenta [BLANDAMER et al., 1997, FEITOSA, 2010]. Recentemente, o nosso grupo determinou o valor da $T'_m \approx 9,5$ °C dessa transição de DDAB através do monitoramento da temperatura inicial do experimento de calorimetria (histerese $\Delta T_m = 6,5$ °C). Essa transição inicia em torno de 5 °C e termina em 11 °C [FEITOSA; ADATI, 2014]. Essas propriedades térmicas são conhecidas e serão exploradas na comparação com o comportamento térmico na presença de F127, a fim de caracterizarmos os complexos formados pela interação de DODAB, DODAC e DDAB com F127.

Neste trabalho, as cadeias alquílicas (C_{12} e C_{18}) e do tipo de contra íon (Br^- e Cl^-) dos lipídios catiônicos proporcionam análise do comportamento térmico, resultando em diferentes transições térmicas, facilmente detectáveis pela técnica de calorimetria, cujos termogramas contêm picos endotérmicos ou exotérmicos característico de cada transição.

1.3 Aplicações

Assim como os sistemas polímero-lipídio, os sistemas copolímero-lipídio possuem aplicação na indústria em geral e farmacêutica em particular, pois a mistura desses componentes serve para monitorar as propriedades do sistema.

As vesículas mimetizam biomembranas e servem de modelos para o transporte de pequenas moléculas. O conhecimento da estrutura e das propriedades das vesículas e micelas é essencial para o estudo do complexo formado pela mistura de componentes lipídicos e os copolímeros. Em aplicações práticas são desejáveis que as vesículas sejam monodispersas e estáveis, o que nem sempre ocorre, requerendo normalmente um aditivo (*helper*) para adequar suas propriedades às requeridas para determinada aplicação. Neste estudo, F127 pode ser visto como um *helper* na preparação de agregados supramoleculares catiônicos de DDAB, DODAB ou DODAC para futura aplicação desses complexos na formação de lipoplexos, enquanto esses lipídios catiônicos podem funcionar como *helper* no preparo de polioplexos de copolímeros (F127) com moléculas de ácido nucleico.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são desenvolver carreadores não virais efetivos para transporte de droga e/ou gene. Os carreadores não virais foram preparados usando lipídios sintéticos catiônicos (DODAB, DODAC ou DDAB), na presença de diferentes frações do copolímero tribloco Pluronic® F127. Este estudo tem como objetivo geral investigar a interação entre vesículas formadas por três diferentes lipídios catiônicos e o copolímero tribloco F127 em dispersão aquosa.

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

(1) estudar o efeito de F127 na estrutura e estabilidade de vesículas catiônicas formadas pelos lipídios sintéticos DDAB, DODAB ou DODAC, através das técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), espalhamento eletroforético dinâmico de luz (DELS), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espectrofotometria UV-Vis (turbidimetria).

(2) estudar a transição vesícula - micela em misturas desses lipídios com F127.

(3) estudar o efeito do comprimento das cadeias alquílicas e do contra íon dos lipídios catiônicos na transição vesícula-micela desses sistemas.

(4) propor um modelo de complexação dos componentes lipídios catiônicos/copolímero, com base nos resultados experimentais.

Os sistemas aqui investigados são candidatos à formação de lipoplexos e poliplexos com ácido nucleico, para aplicação no transporte de fármacos e/ou genes. Complexos mistos de F127/lipídio catiônico podem ser apropriados para a compactação/descompactação do ácido nucleico para fins de transfecção celular.

O conhecimento da estrutura e das propriedades de vesículas de lipídios e micelas de copolímeros é essencial para sua aplicação em sistemas farmacêuticos, pois auxilia no estudo das propriedades de complexos nanoestruturados da mistura desses compostos para fins de aplicação em sistemas de interesse farmacêutico de nanomedicina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

DDAB (MM 462,65 g/mol) e DODAB (MM 630,95 g/mol) com grau de pureza > 98 % (Sigma-Aldrich) foram usados sem purificação adicional. DODAC (MM 586,50 g/mol) foi obtido de DODAB em coluna de troca iônica e recristalizado, conforme relatado [CUCCOVIA et al.,1997].

F127 (MM 12.600g/mol, Sigma-Aldrich), também foi usado sem purificação adicional. Água ultrapura, qualidade Milli-Q resistividade 18,2 MΩ.cm a 25 °C, foi utilizada na preparação das amostras, utilizando equipamento Direct-Q UV-3 para obtenção da água ultrapura.

3.2 Preparações das Amostras

3.2.1 Preparações das Vesículas

As dispersões de vesículas lipídicas foram preparadas pelo método espontâneo, na concentração fixa de 1 mM. Os respectivos sais de amônio (DODAB, DODAC ou DDAB) foram solubilizados em água, sob agitação magnética lenta durante 1 h, nas temperaturas de 25 °C para DDAB e 60 °C para DODAB e DODAC. Em seguida, foram resfriados à temperatura ambiente (ca 25 °C) para estocagem.

3.2.2 Preparação das soluções de F127

Solução aquosa de F127 foi preparada na concentração de 5 mM, por solubilização do copolímero em água, para obtenção da solução estoque, a qual foi utilizada para o preparo das amostras diluídas, 0,05 até 5 mM, a 25 °C.

3.2.3 Preparação das amostras de F127/Lipídios

As vesículas catiônicas foram preparadas pelo método espontâneo. Soluções de DODAB, DODAC ou DDAB em água e em solução F127 (0,05-5,0 mM) foram preparadas de modo que a concentração lipídica final fosse mantida constante em 1,0 mM (Figura 6). As misturas contendo DDAB foram aquecidas a 25 °C e as soluções contendo DODAB ou DODAC, a 60 °C. Nessas temperaturas, as misturas foram agitadas magneticamente durante 1 h. Após esse período, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C) para estocagem.

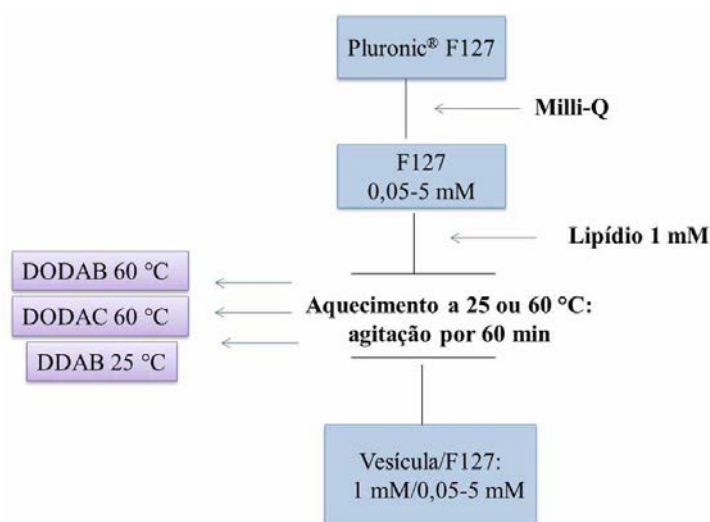


Figura 6. Esquema do método de preparo de dispersões mistas de DODAB, DODAC ou DDAB com F127.

3.3. Caracterização

3.3.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Um microcalorímetro diferencial de varredura (DSC), modelo VP-DSC (Microcal. Inc. Northampton. MA - EUA), com celas gêmeas, para a amostra e a referência, de 0,54 mL, foi utilizado na coleta de dados, cuja análise foi realizada usando o software Origin[®] 7.0 fornecido pelo fabricante. Detalhes da configuração do equipamento encontram-se na literatura [FEITOSA et al., 2009].

O DSC é um equipamento importante para investigar transições térmicas de vesículas de lipídios e polímeros, assim como na análise de ligantes em proteínas e mudanças estruturais e conformacionais em sistemas coloidais e de proteínas [COOPER; NUTLEY; WADOOD, 2000, SILVA; LOTH; OLOFSSON, 2004].

Utilizando a calorimetria para determinar as temperaturas de transição de estado gel-líquido cristalina (LC), entalpia dessas transições, a temperatura micelar crítica (cmt) de copolímeros triblocos em solução.

Os experimentos consistem em aquecer ou resfriar, à mesma taxa volumes iguais da amostra e da referência à pressão constante, de uma temperatura inicial (T_i) até uma temperatura final (T_f), mantendo a solução e a referência à mesma temperatura.

O calorímetro compensa o ganho ou a perda de calor, fornecendo ou removendo calor para ou da amostra, de modo a manter a temperatura da amostra igual à temperatura da referência [COOPER; NUTLEY; WADOOD, 2000]. Esse calor retirado ou fornecido é registrado em função da temperatura, e é denominado termograma, que descreve a variação da capacidade térmica (ΔC_p) vs temperatura, sendo ajustado com a referência da linha base, obtida com ambas as celas preenchidas com o solvente.

Transições térmicas são representadas no termograma por picos em torno da temperatura de transição (e.g., T_m), cuja largura ($\Delta T_{m,1/2}$) reflete a velocidade da transição e, portanto, a cooperatividade. A área do pico fornece a energia ou entalpia (ΔH_m) dessa transição, pois o experimento é realizado a pressão constante [BARRELEIRO et al., 2002; FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000; MARQUES; KHAN, LINDMAN, 2002].

As dispersões dos lipídios e do copolímero aqui investigados resultam em termogramas com perfil característico para cada composto, o que nos permite compará-los aos termogramas de lipídio/copolímero, obtendo assim, a partir de variação no perfil dos termogramas, informações sobre o comportamento térmico e estrutural dos complexos formados na solução, objetos de nosso interesse.

3.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) permite determinar o raio hidrodinâmico (R_H) e a polidispersividade de partículas coloidais (e.g., vesículas e micelas). Essencialmente, o equipamento consiste de um laser como fonte de luz, um colimador, um goniômetro, no centro do qual fica posicionado a amostra, um sistema detector de luz espalhada, uma fotomultiplicadora e um computador com software para análise de dados (Figura 7). Esta técnica nos auxilia na análise dos agregados formados, agregados menores (do tipo micelar) são apropriados para o transporte de fármacos via corrente sanguínea, enquanto que estruturas maiores (do tipo vesicular) são apropriadas para a compactação/descompactação de DNA para a transfecção celular.

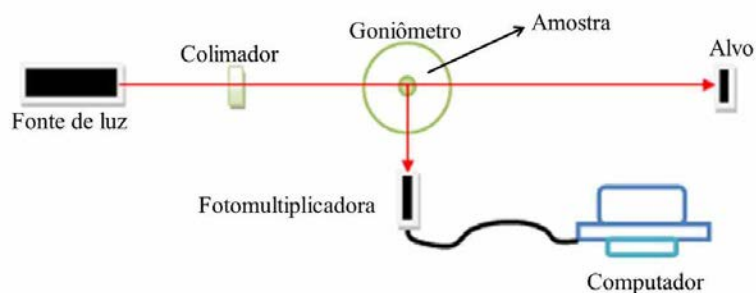


Figura 7. Componentes essenciais de um equipamento de espalhamento de luz. O detector está posicionado no ângulo de espalhamento de 90°.

A técnica de espalhamento de luz explora os movimentos térmicos das partículas em suspensão sobre as quais incide o laser. O coeficiente de difusão (D) para uma partícula está relacionado ao raio hidrodinâmico (R_H) de acordo com a relação de Stokes-Einstein:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_H \quad (1)$$

onde o k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura Absoluta e η é a viscosidade do meio. O sistema detecta a função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada, que decai exponencialmente com o tempo. A partir de ajustes da função exponencial o programa calcula a função distribuição do raio hidrodinâmico, cuja posição caracteriza o valor médio de R_H , e a largura indica a polidispersividade do tamanho das partículas [CHU, 1997].

O raio hidrodinâmico corresponde ao raio da partícula mais a espessura da camada de solvatação (hidratação), uma vez R_H é obtido através da medida do coeficiente de difusão e que, na difusão, a partícula arrasta consigo algumas camadas de moléculas de água ligadas [CHU, 1997].

As medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas usando um instrumento Brookhaven Instruments Corp, Holtsville, EUA, equipado com um laser de comprimento de onda 633 nm operando a uma potência ajustável de até 15mW, com ângulo de espalhamento ajustável e temperatura da amostra ajustável através de um banho termostaticável (Poly Science Temperature Control, modelo 91A0A11B).

3.3.3 Espalhamento dinâmico eletroforético de luz (DELS)

O Potencial zeta é o potencial eletrostático na superfície de cisalhamento de partículas coloidais hidratadas, que determina a mobilidade dessas partículas na presença de um campo elétrico. A mobilidade eletroforética (μ_e) está relacionada ao potencial zeta (ζ) através da equação

$$\mu_e = (2/3) \zeta \epsilon / \eta f(\kappa a) \quad (2)$$

onde ε é constante dielétrica do meio, η é a viscosidade do meio, κ é o comprimento de Debye e a é o diâmetro hidrodinâmico da partícula e $f(\kappa a)$ é uma função de Henry.

Existem dois modelos clássicos que resultam em dois limites: as equações de Smoluchowski e de Hückel, que se aplicam em limites opostos. Estes limites têm como raiz comum o módulo de κa .

- *Limite de Hückel*: $\mu_e = (2\varepsilon\zeta)/(3\eta)$ para $\kappa a \ll 1$, válida para pequena força iônica e partículas muito pequenas, com $f(\kappa a) = 1$.
- *Limite de Smoluchowski*: $\mu_e = \varepsilon\zeta/\eta$ para $\kappa a \gg 1$, válida para força iônica significativa e partículas grandes, com $f(\kappa a) = 2/3$ [WEINER, 1987].

O potencial zeta (ζ) das amostras foram obtidos utilizando o equipamento de DELS (Zeta Pals, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, EUA) equipado com um laser de diodo de alta potência de 35mW. Sobre a amostra irradiada pelo laser incide um campo elétrico, atribuindo às partículas coloidais movimento de translação associado ao movimento browniano, sobre os quais se aplicam os modelos de Hückel ou de Smoluchoviski.

3.3.4 Turbidimetria

As medidas de turbidez foram realizadas a 25 °C em um espectrofotômetro Cary Bio 300 UV-Vis (Varian, Mulgrave, Austrália), utilizando cubetas de quartzo de comprimento óptico de 1 cm. As amostras foram monitoradas nos comprimentos de onda 250, 400 e 500 nm. As concentrações dos lipídios foram mantidas constante a 1 mM na ausência e na presença de F127, nas concentrações de 0,05 até 5 mM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo por turbidimetria

Medidas de turbidez auxiliam na análise qualitativa das partículas coloidais em relação ao tamanho e a estrutura. Agregados pequenos, como as micelas, e agregados grandes, como as vesículas uni- e multilamelares, resultam na alteração dos valores de turbidez.

O perfil da curva de turbidez varia muito pouco com o comprimento de onda (resultados não mostrados). Por essa razão, mostramos apenas as curvas de turbidez vs [F127] monitorado em $\lambda = 250$ nm (na região do UV), a qual apresenta sinal mais intenso (Figura 8).

A variação da turbidez (Figura 8) sugere, para os três lipídios investigados, as seguintes mudanças estruturais com o aumento de [F127]: vesículas mistas \rightarrow estruturas mistas (micelas + vesículas) \rightarrow micelas mistas. A transição vesícula-micela ocorre em três estágios, como ocorre para outros sistemas lipídio-surfactante [ALVES et al., 2007].

Esses dados indicam grande afinidade de F127 pelas vesículas. No primeiro estágio (pouco perceptível por esta técnica), ocorre a transição de vesículas lipídicas para vesículas mistas devido à solubilização do copolímero nas vesículas; no segundo estágio, após a saturação das vesículas, ocorre a formação de micelas ricas em F127, que coexistem com as vesículas mistas; no terceiro estágio, a amostra é rica em micelas mistas, devido à solubilização do lipídio às micelas.

Na Figura 8, observa-se a transição vesícula-micela em função da concentração de F127, onde identifica-se a formação de diferentes estruturas. Os valores de concentração crítica, que caracterizam a ausência de vesículas são: 1,5 mM para DODAB e DODAC e 3 mM para DDAB. Frente a estes resultados, avaliamos que as vesículas de DODAB e DODAC na presença do copolímero são menos estáveis do que as vesículas de DDAB, e que o contra íon (Br^- ou Cl^-) exerce pouca influência na estabilidade das mesmas.

Ainda de acordo com a Figura 8, observa-se que a turbidez da solução de F127 aumenta linearmente para maiores [F127], até 2 mM do copolímero; acima desta concentração, ocorre o aumento de modo menos pronunciado, característico da formação de agregados micelares simples de F127, Figura 8d. Na presença de DODAB ou DODAC a turbidez é alterada de modo não linear, enquanto que a turbidez de DDAB ocorre uma diminuição até 1 mM de F127, acima desta concentração, observa-se o aumento do valor da turbidez de modo linear.

As alterações estruturais das vesículas, sugeridas pelas medidas de turbidez serão correlacionadas aos dados obtidos pelas técnicas de: DSC, DLS e DELS

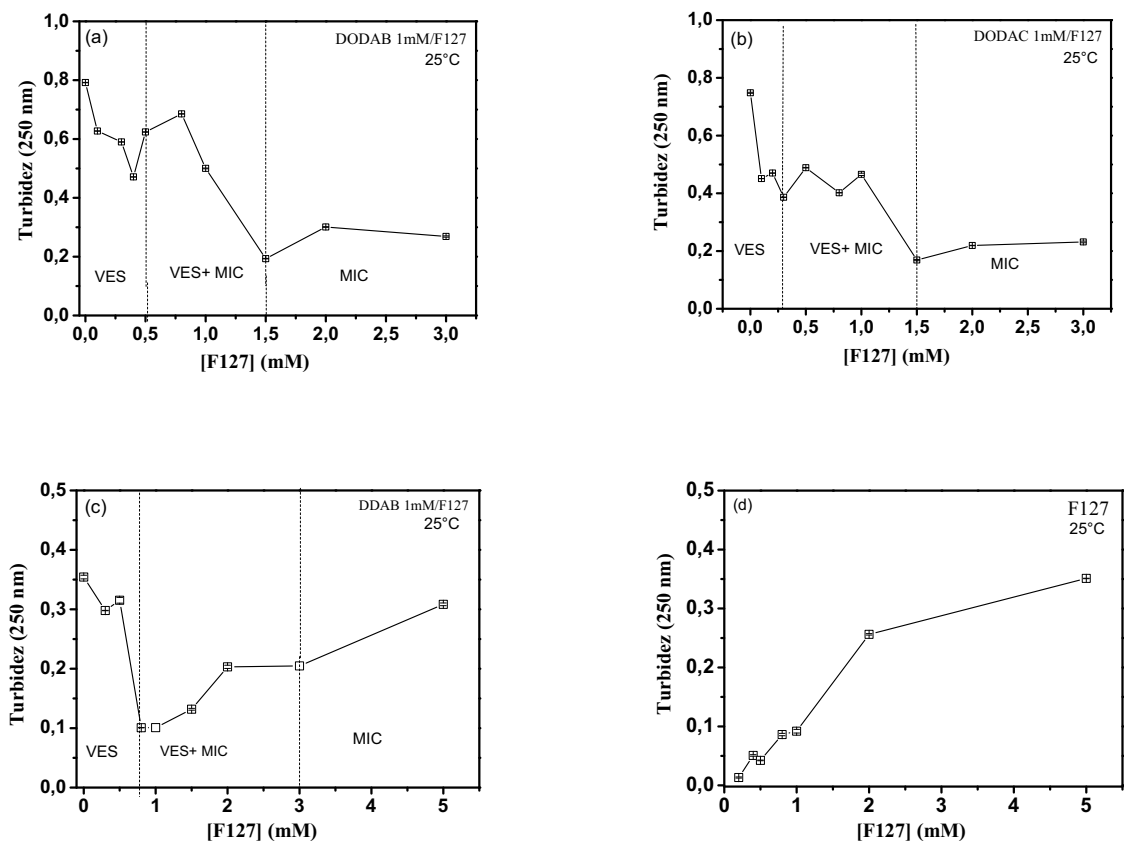


Figura 8. Efeito da concentração de F127 na turbidez em 250 nm para dispersões vesiculares (1 mM) de (a) DODAB, (b) DODAC, (c) DDAB e (d) F127. Onde VES indica região vesicular simples e mista, MIC indica a formação de micelas simples e mista.

4.2 Estudo por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A técnica de calorimetria fornece informações detalhadas sobre o estado conformacional dos lipídios na bicamada, desde que ocorra alguma transição térmica entre estados da bicamada lipídica ou polimérica dentro da faixa de temperatura investigada. Estes estados são determinados por transições térmicas e a variação energética associada a cada transição pode ser obtida pela análise dos termogramas. Os estados mais comuns encontrados são: estado gel, estado intermediário (*tilt*) e estado líquido cristalino (LC). Nem todos os lipídios apresentam a transição intermediária, DODAB, por exemplo, apresenta esses três estados. No aquecimento, temos a transição gel para o estado intermediário (T_s), transição intermediário para LC (T_m) e no resfriamento, observamos as respectivas transições reversas, com histerese [FEITOSA et al., 2012]. DODAC, que difere de DODAB apenas

pelo contra-íon Cl^- no lugar de Br^- , possui uma única transição gel-LC [FEITOSA; BARRELEIRO;OLOFSSON, 2000].

Essas transições são reversíveis, embora não necessariamente ocorram à mesma taxa como ocorre para DDAB, cuja transição reversa (LC-para-gel) é muito mais lenta do que a de aquecimento (gel-para-LC) [FEITOSA, 2010]. A fim de detectar essas transições, realizamos experimentos de DSC nos modos aquecimento e resfriamento.

4.2.1 Solução de F127

Os termogramas de F127 em solução aquosa foram obtidos utilizando o tempo de equilíbrio de 15 min, taxa de varredura de 60 °C/h. No intervalo de 1 a 80°C foram obtidas 4 varreduras, sendo alternadas entre aquecimento e resfriamento. Para análise dos resultados foram utilizados os termogramas da 3ª e 4ª varreduras devido o maior tempo de equilíbrio das amostras. No aquecimento, o termograma de F127 apresenta uma única endoterma larga ($\Delta T_{1/2} \approx 5^\circ\text{C}$), assimétrica e reversível, em torno da cmt, que diminui com a concentração do copolímero, nota-se um deslocamento do valor da cmt e cmt' com aumento da [F127], Figuras 9a-9b. No resfriamento, obtemos exotérmicas assimétricas, também centradas para o mesmo valor da cmt, indicando que a micelização induzida pelo aquecimento é reversível (Figura 9a e 9b).

Em solução aquosa o copolímero tribloco F127 apresenta endoterma com a temperatura de transição em torno da cmt $\approx 27^\circ\text{C}$ em 1mM, Figura 9a-9b. Através do monitoramento das transições térmicas do F127 pode-se entender sobre o mecanismo da interação entre os lipídios DODAB, DODAC e DDAB na presença deste copolímero.

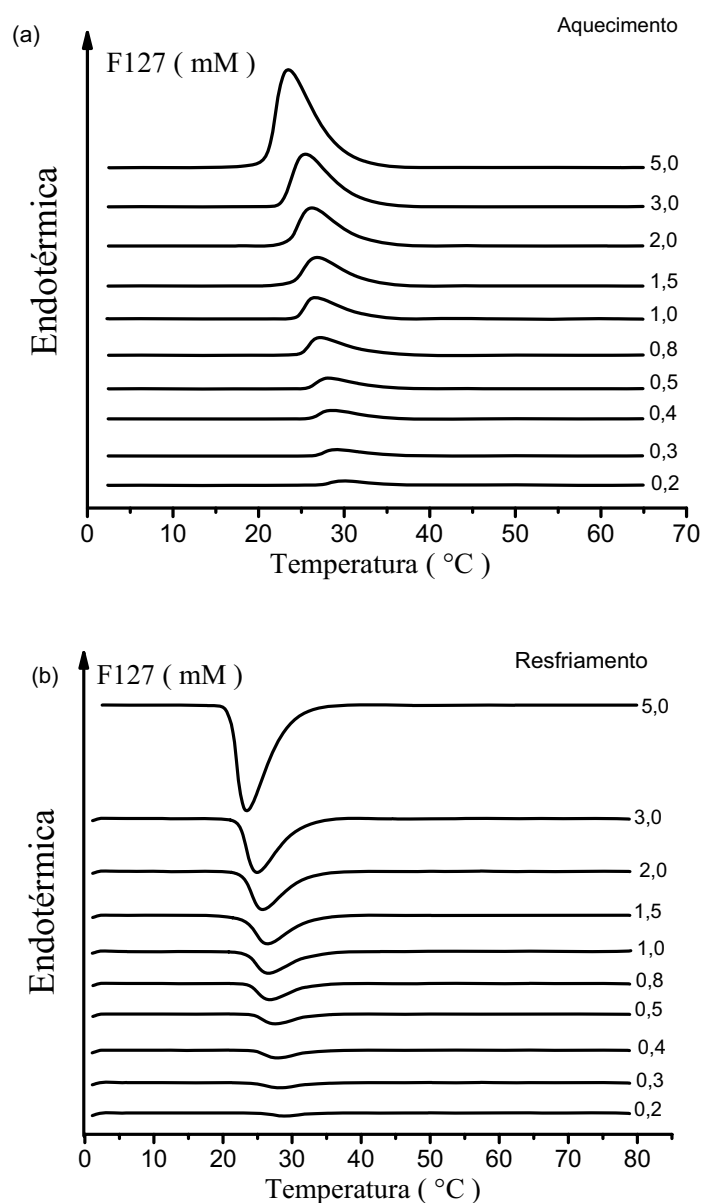


Figura 9. Termogramas de F127 obtidos por (a) aquecimento e (b) resfriamento, para diferentes concentrações do copolímero. Tempo de pré-varredura de 15 min e taxa de varredura 60 °C/h.

Na Figura 10 vemos que a c_{mt} e c_{mt}' diminui em função da $[F127]$, a entalpia, ΔH_m e $\Delta H'_m$, por outro lado, aumenta linearmente com $[F127]$, indicando que maior quantidade de energia é necessária para agregar ou desagregar os monômeros, resultados que estão em acordo com os dados publicados anteriormente [FEITOSA; WINNIK, 2010]. Os parâmetros térmicos estão apresentados na Tabela 1, no (Anexo I).

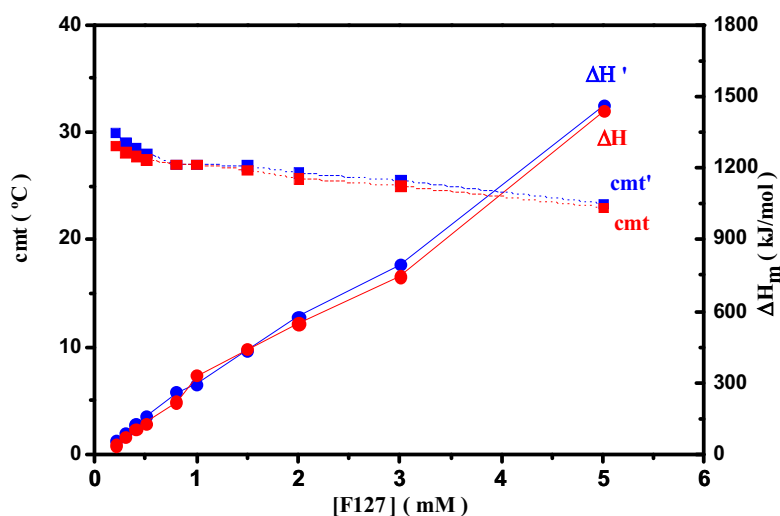


Figura 10. Efeito da [F127] na cmt e ΔH , parâmetros obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).

4.2.2 Dispersão de DODAB/F127

Neste estudo e em outras publicações, as propriedades físico-químicas das vesículas dependem do tipo de contra íon. O sistema F127/DODAB, a concentração lipídica foi fixada em 1mM e foi variado [F127] de 0,05 até 5 mM.

Na concentração de 1 mM, DODAB se organiza predominantemente em vesículas unilamelares (LUVs). As transições térmicas principais são $T_s \approx 36$ °C (pré-transição), $T_m \approx 45$ °C (transição gel-LC) e $T_p \approx 53$ °C (pós-transição). A transição T_p se deve as estruturas não vesiculares presentes na dispersão, muito provavelmente estruturas multilamelares, que dominam em concentrações acima de 1 mM de DODAB em solução aquosa e/ou também na presença de alguns aditivos (sais inorgânicos por exemplo) [FEITOSA et al., 2012]. O fato do valor da T_p ser maior do que o valor da T_m indica que os lipídios estão mais densamente empacotados nas estruturas multilamelares do que nas vesículas, portanto, a curvatura das estruturas multilamelares é menor do que as das vesículas, favorecendo maior empacotamento.

No resfriamento, através do termograma nota-se a presença de duas exotérmicas, respectivamente em $T'_m \approx 40$ °C e $T'_s \approx 11-16$ °C. Sendo que em 40 °C, o pico relativo a primeira transição exotérmica consiste da sobreposição de duas transições exotérmicas em torno de $T'_m = T'_p$ e a segunda transição exotérmica em torno de T'_s [FEITOSA et al., 2012, FEITOSA; ADATI; ALVES, 2015]. Os termogramas de DODAB 1 mM foram obtidos em quatro ciclos alternado de

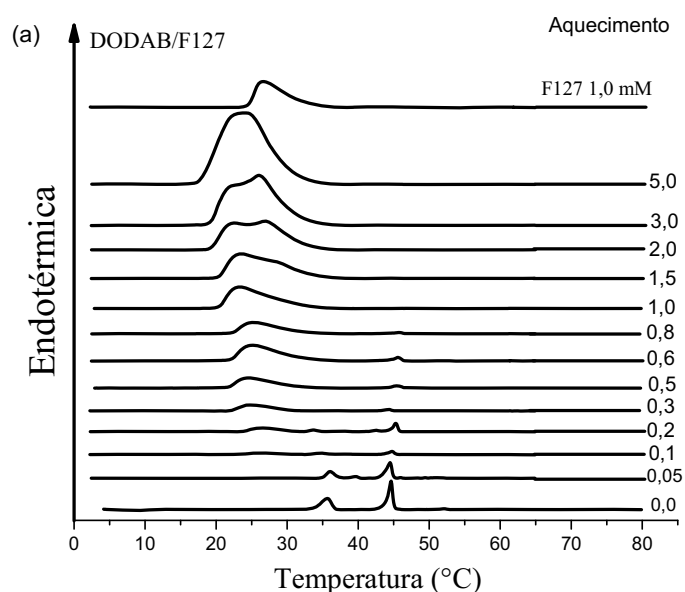
aquecimento/resfriamento, sendo utilizadas as 3^a e 4^a varreduras para análise térmica, com pré-varredura de 15 minutos à taxa de 60 °C/h.

De acordo com os termogramas, em concentrações menores que 0,8 mM, as moléculas de F127 são solubilizadas na bicamada das vesículas, tornando-a mais fluída (menor valor de T_m). Em geral, observamos que a entalpia das transições térmicas das estruturas de bicamada nas misturas diminui em maiores concentrações de F127. Esta variação pode estar relacionada à diminuição da população de vesículas, predominando estruturas de micelas na amostra.

Dessa forma, notamos que a transição vesícula-micela em DODAB/F127 se completa quando a concentração de F127 é aproximadamente igual a 0,8 mM, concentração na qual os picos característicos de vesículas desaparecem. Comparando esses dados com os de turbidez (Figura 8a), notamos que em torno de 0,8 mM de F127, as micelas são grandes, nota-se que o valor da turbidez ainda não alcançou o seu valor mínimo.

Em concentrações maiores de F127, existe a superposição de picos de transição característicos de micelas, muito provavelmente devido à formação de micelas mistas DODAB/F127 em equilíbrio com micelas simples de F127, efeito observado nas curvas de aquecimento e resfriamento.

Notamos também que, em função de maiores concentrações de F127, a fração de micelas simples de F127 (com maior c_{mt}) predomina, enquanto a de micelas mistas de DODAB/F127 diminui (Figura 11a). Comportamento análogo também foi observado no resfriamento das amostras (Figura 11b). Esses dados indicam que as micelas mistas diferem estruturalmente das micelas simples de F127, sendo as micelas mistas maiores do que as micelas simples.



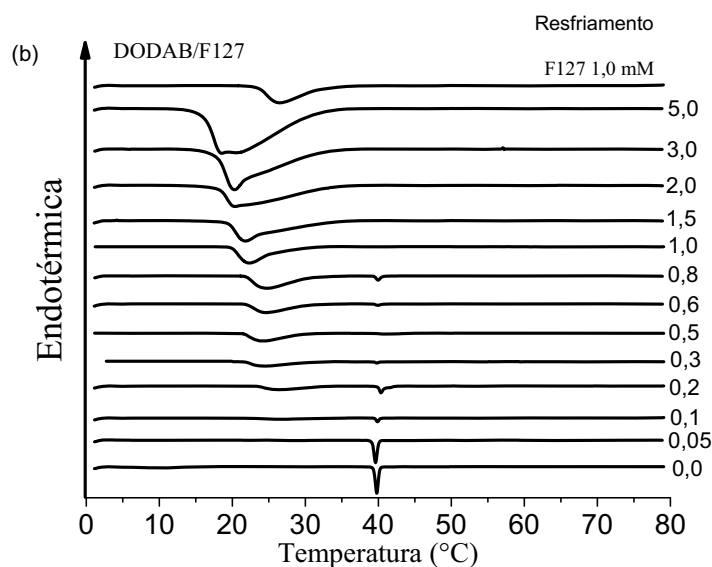


Figura 11. Termogramas DSC, obtidos no aquecimento (a) e no resfriamento (b) de dispersões de DODAB 1mM, na ausência e na presença de F127, conforme indicado.

Na Figura 12 são mostrados os parâmetros térmicos do sistema F127/DODAB em função de [F127]. Nota-se que os valores de T_m e T'_m não sofrem alterações significativas e a entalpia diminui com a [F127], demonstrando a formação de estruturas mistas, (Figura 12a). De acordo com a Figura 12a, nota-se que o efeito de histerese também não se altera com a adição de F127, permanecendo em torno de 5°C ($\Delta T_m = T_m - T'_m$). Na Figura 12b observam-se menores valores de cmt e cmt' na presença do DODAB, de 27°C micelas simples de F127 a 1mM simples para $18,6^\circ\text{C}$ na presença de lipídios a 1mM/F127 a 5mM. As alterações dos valores das entalpias e cmt e cmt' caracterizam a interação de DODAB com o copolímero, como foi discutido na Figura 12. Tabelas com os valores dos parâmetros térmicos de DODAB/F127 são mostrados nas Tabelas 2 e 3 (ANEXO I).

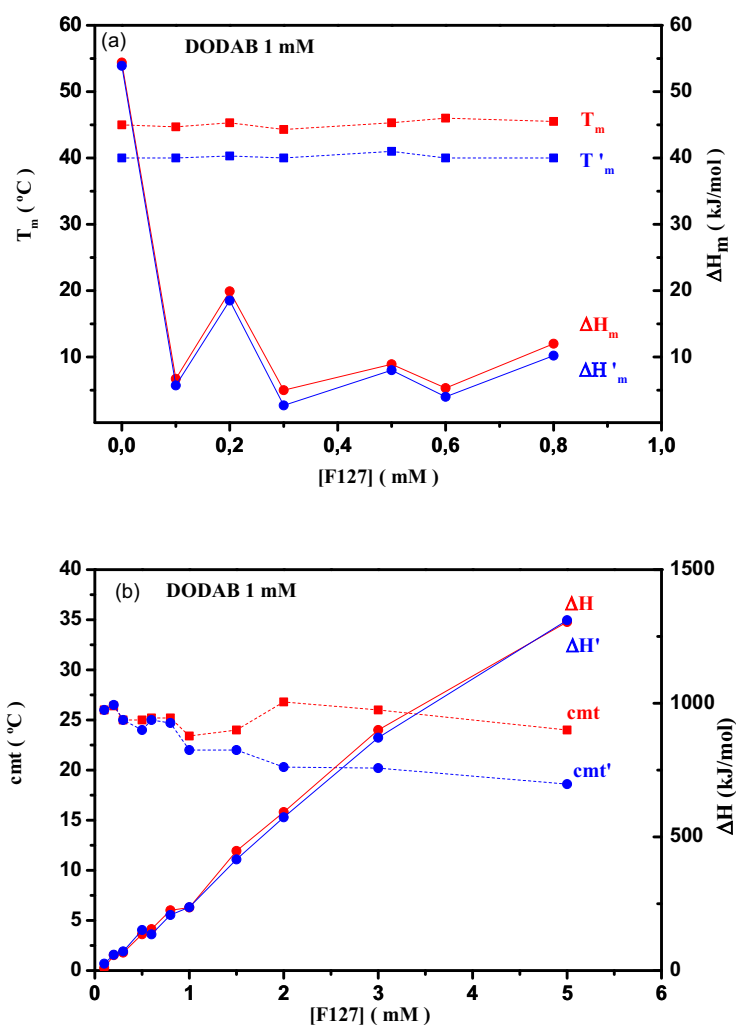


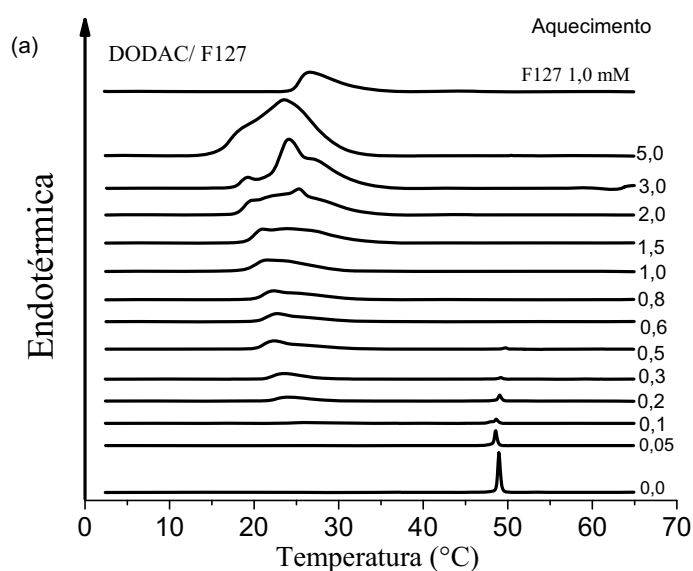
Figura 12. Efeito da [F127] na T_m e ΔH_m (a), na cmt e ΔH (b) dos sistemas F127/DODAB obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).

4.2.3 Dispersão de DODAC/F127

Os termogramas das vesículas de DODAC 1 mM foram obtidos em quatro ciclos de alternados de aquecimento/resfriamento, sendo utilizada a 3ª e 4ª varredura para análise térmica, com pré-varredura de 15 minutos à taxa de 60 °C/h. No aquecimento e na ausência de F127, os termogramas de DODAC apresentam uma única transição térmica simétrica, bem definida, $T_m \approx 49$ °C, caracterizada por um pico endotérmica muito estreito ($\Delta T_{1/2} \approx 0,3$ °C). No resfriamento, a transição reversa ocorre em $T'_m \approx 44$ °C ($\Delta T'_{1/2} = 0,9$ °C), Figura 12. Há, portanto, uma histerese térmica de $\Delta T_m = 5$ °C (mesmo valor de DODAB). Os parâmetros térmicos obtidos da análise dos resultados estão mostrados nas Tabelas 4 e 5 (Anexo I).

Na presença de F127, o valor da T_m é alterado, devido à solubilização de F127 na bicamada, resultando numa T_m menor. Este pequeno aumento na T_m é devido a pequena fração dos copolímeros F127 ser solubilizado na bicamada, ou a “adsorção” dos copolímeros à superfície das vesículas, com pequeno grau de penetração na bicamada. Ainda são necessários maiores estudos para definir o mecanismo de interação das vesículas/F127, pois a variação do valor da T_m é muito discreta. Acima de 0,5 mM de F127, o pico da transição principal desaparece, indicando que não existem mais vesículas na dispersão. Comparando esses dados com os de turbidez, notamos que na concentração 0,5 mM de F127 o valor da turbidez não é o valor mínimo, o que sugere a presença de micelas mistas F127/DODAC (Figura 8b). Micelas menores são formadas com a adição de mais copolímero, resultando em menores valores de turbidez (Figura 8b).

Assim como DODAB, em concentrações maiores do copolímero, observamos a sobreposição dos picos, indicando a formação de micelas simples de F127 e micelas mistas de F127/DODAC. Este efeito foi observado tanto por aquecimento como por resfriamento, cujos picos de transição são assimétricos para as misturas (Figura 13).



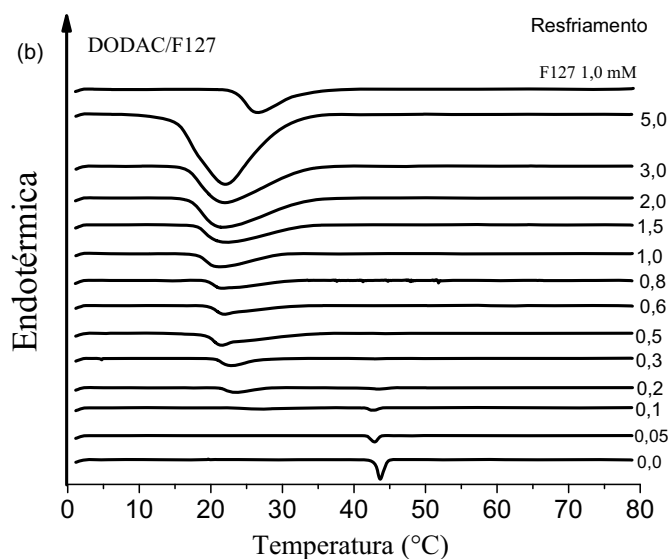
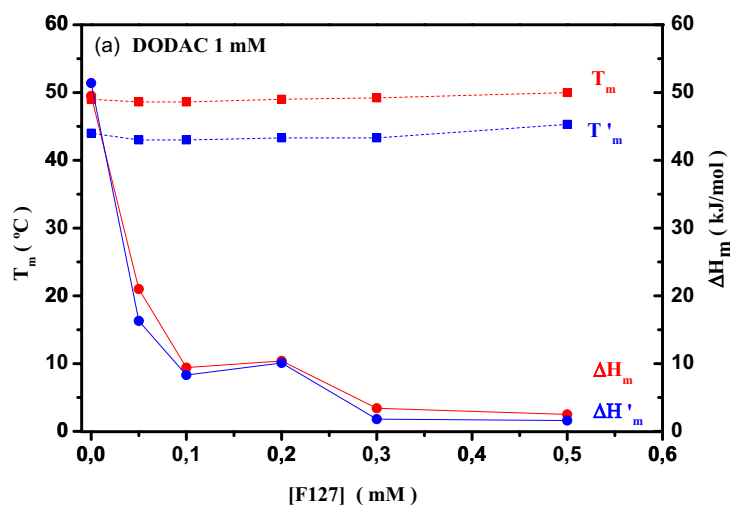


Figura 13. Termogramas DSC, obtidos no aquecimento (a) e no resfriamento (b) de dispersões de DODAC 1 mM, na ausência e na presença de F127, em concentração crescente, conforme indicado.

O efeito da [F127] nas vesículas de DODAC são descritos com base nos parâmetros térmicos, Figura 14. Na Figura 14a, vemos que T_m e T'_m sofrem pequenas alterações, em torno de 1 °C, possível interação do F127 com a bicamada, e a diminuição da entalpia indica a desestabilização das vesículas na presença de F127. As transições principais do copolímero são alteradas (Figura 14b), indicando a formação de estruturas micelares mistas. Esta alteração estrutural também verificada pela variação na entalpia, cujo valor aumenta linearmente [F127].



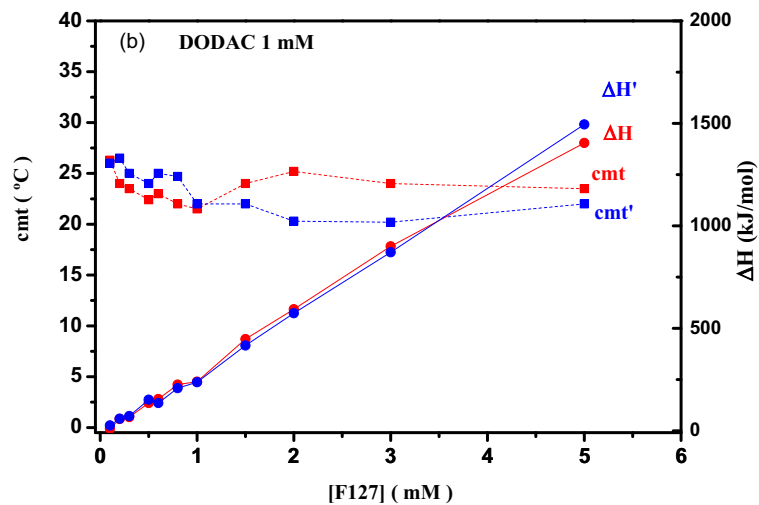


Figura 14. Efeito de [F127] na T_m e ΔH_m (a), cmt e ΔH (b) dos sistemas F127/DODAC obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul).

4.2.4 Dispersão de DDAB/F127

Estudamos inicialmente o efeito do tempo de equilíbrio ou pré-varredura (15 min, 6 h e 12 h), que antecede o aquecimento da amostra no DSC, à taxa de 20 °C/h, para F127 2 mM (na ausência de DDAB), sendo realizado em 3 ciclos de aquecimento e 1 ciclos de resfriamento, Figura 15. Para todos os tempos de equilíbrio estudados (Figura 15), os termogramas apresentam uma única transição em torno de $cmt \approx 25,6$ °C e $cmt' \approx 25,3$ °C, respectivamente no aquecimento e no resfriamento, indicando que, ao contrário de DDAB, essas transições são rápidas e assimétricas. O propósito deste experimento foi verificar se o processo de micelização de F127 induzido pela variação na temperatura é reversível e assimétrico. Os resultados indicam que, ao contrário de DDAB, o perfil dos termogramas não depende do tempo de equilíbrio, e as transições térmicas de F127 são assimétricas, ocorrem praticamente à mesma velocidade e $cmt \approx cmt'$.

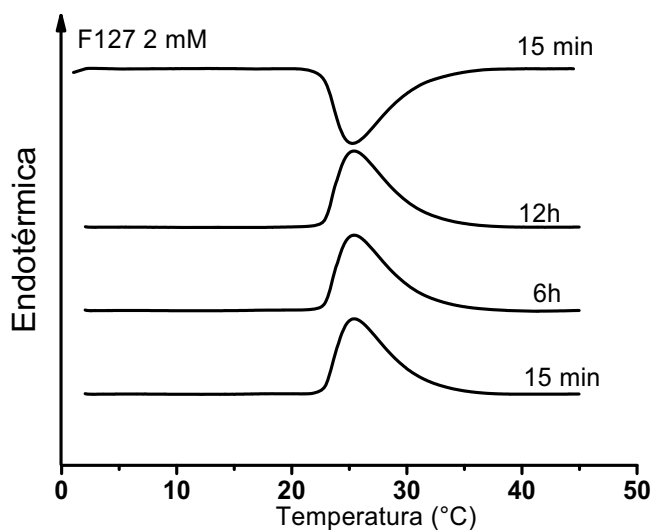


Figura 15. Efeito do tempo de equilíbrio (pré-varredura) no termograma de aquecimento de F127 na concentração de 2 mM, obtido à taxa de varredura de 20 °C/h. A quarta varredura (de baixo para cima) foi obtida no resfriamento.

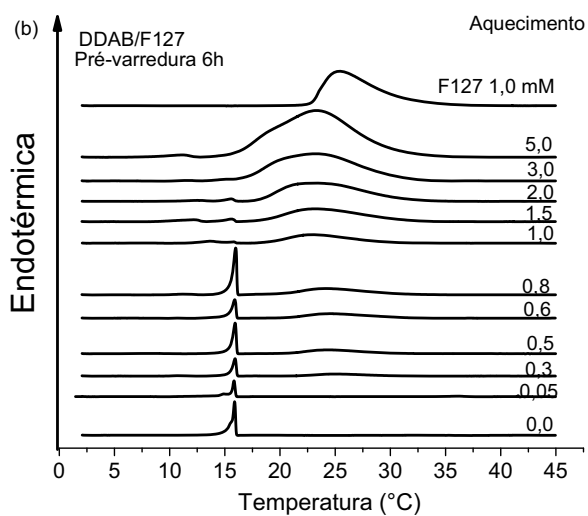
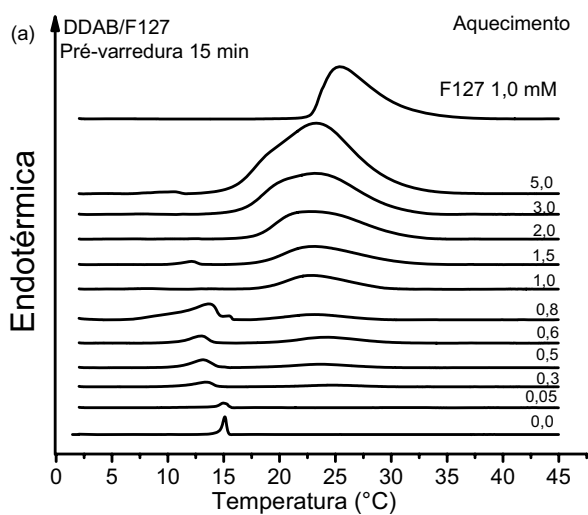
Assim como DODAC ($T_m \approx 49 \text{ °C}$), e ao contrário de DODAB que apresenta até quatro transições no aquecimento, DDAB apresenta apenas uma transição endotérmica em $T_m \approx 16 \text{ °C}$, no aquecimento de 1 a 80 °C. No resfriamento, o termograma de DDAB não apresenta exotérma devido à baixa velocidade da transição reversa [FEITOSA, 2010].

Investigamos por DSC o efeito de F127 nas propriedades térmicas de DDAB 1mM, na faixa de temperatura de 1 a 45 °C, variando o tempo de equilíbrio de 15 min, 6h e 12 h, à taxa de aquecimento de 20 °C/h, sendo realizado em 3 ciclos de aquecimento e 1 ciclo de resfriamento. No resfriamento, utilizando o tempo de equilíbrio de 15 min, com a mesma taxa de varredura e intervalo de temperatura.

Os termogramas com tempos de equilíbrios de 15 min (Figura 16a) apresentam alterações no comportamento térmico comparado aos termogramas de 6h e 12h (Figura 16b -16c), devido à baixa cinética da transição reversa do DDAB. Portanto, os termogramas de menor tempo de equilíbrio (Figura 16a) apresentam menor intensidade da transição e entalpia comparadas aos de maior tempo de varredura (Figuras 16b - 16c).

Para DDAB 1mM, obtivemos $T_m \approx 16 \text{ °C}$, (Figura 16c), com tempo de equilíbrio 12h. A entalpia desta transição, no entanto, diminui progressivamente em função da [F127], até desaparecer por completo [F127] $\approx 3 \text{ mM}$, quando a transição vesícula-micela se completa, de acordo com os dados de turbidez (Figura 8c). Segundo os termogramas de aquecimento (Figura 16c), em torno de 0,5 mM de F127, aparece uma endoterma próxima do valor da cmt de F127, característico da coexistência de vesículas e micelas, resultados que corroboram as medidas de turbidez (Figura 8c).

A intensidade da transição principal, com tempo de equilíbrio de 12h, das vesículas diminui, tornando-se pequeno acima de 1 mM de F127, indicando que acima desta concentração a dispersão é dominada por micelas, até desaparecer completamente em ≈ 3 mM de F127.



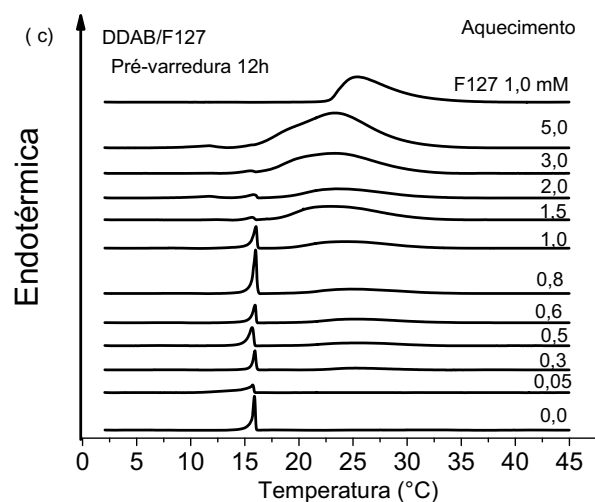


Figura 16. Termogramas DSC de DDAB 1mM, na ausência e na presença de F127, conforme indicado. Aquecimento com tempo de equilíbrio monitorado em: 15 min (a), 6h (b) e 12h (c) e taxa de varredura de 20 °C/h.

No resfriamento (Figura 17), os termogramas das soluções apresentam apenas exotérmicas características de F127. No entanto, em concentrações maiores de F127, observamos uma pequena exotérma, em $T'_m \approx 8-10$ °C (Figura 18), que poderia estar relacionada à transição LC-para-gel de DDAB, cujo valor na ausência de F127, é 9,5 °C [FEITOSA; ADATI; ALVES, 2015]. Neste caso, F127 favorece a transição LC-para-gel, permitindo a obtenção de T'_m diretamente por DSC.

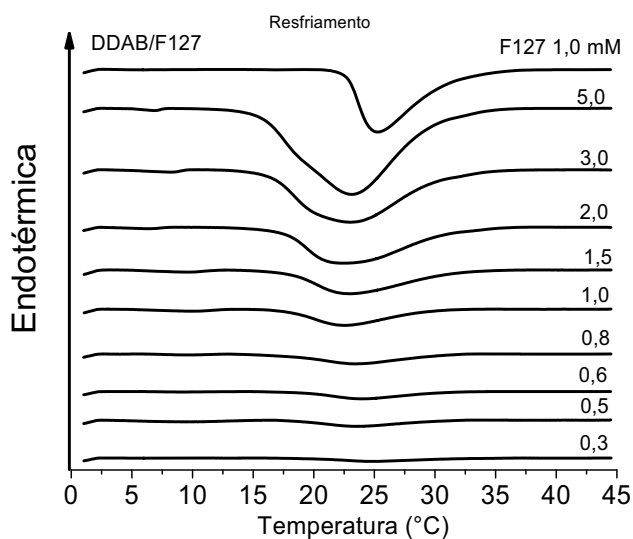


Figura 17. Termogramas DSC de DDAB 1mM, por resfriamento, com tempo de equilíbrio de 15 min e taxa de varredura de 20°C/h.

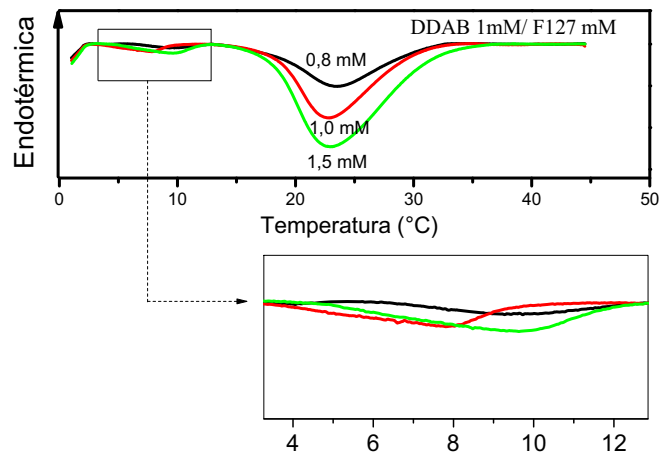


Figura 18. Termogramas DSC obtidos por resfriamento de DDAB 1 mM na presença de F127 nas concentrações de 0,8; 1 e 1,5 mM, com taxa de varredura de 20°C/h. Suposta transição reversa do DDAB.

Os parâmetros térmicos do sistema DDAB/F127, obtidos da Figura 19, são mostrados nas Tabelas 7 e 8 (Anexo I). Nota-se que o valor da T_m é mensurável até a $[F127] \approx 3$ mM, e não há variação significativa no valor da T_m com a $[F127]$. No resfriamento, uma pequena transição em T'_m é observada no intervalo de $[F127] \approx 0,5 - 3$ mM, para estas amostras o copolímero favorece a transição LC-para-gel, não observada para DDAB puro (Figura 19a). No intervalo de $[F127] \approx 0$ a 0,8 mM, ΔH_m varia entre 30-90 kJ/mol, quando ocorre uma diminuição pronunciada entre 0,8 a 1 mM de 90 para 20 kJ/mol, permanecendo constante acima desse 1 mM de F127 (Figura 19a). De acordo com a Figura 19b, até a concentração de 2mM a cmt e cmt' sofre alterações e acima desta concentração ocorre uma pequena diminuição em seu valor e as entalpias, ΔH e $\Delta H'$, aumentam linearmente na presença do lipídio, demonstrando um sistema misto. De acordo com os dados de turbidez, Figura 8c.

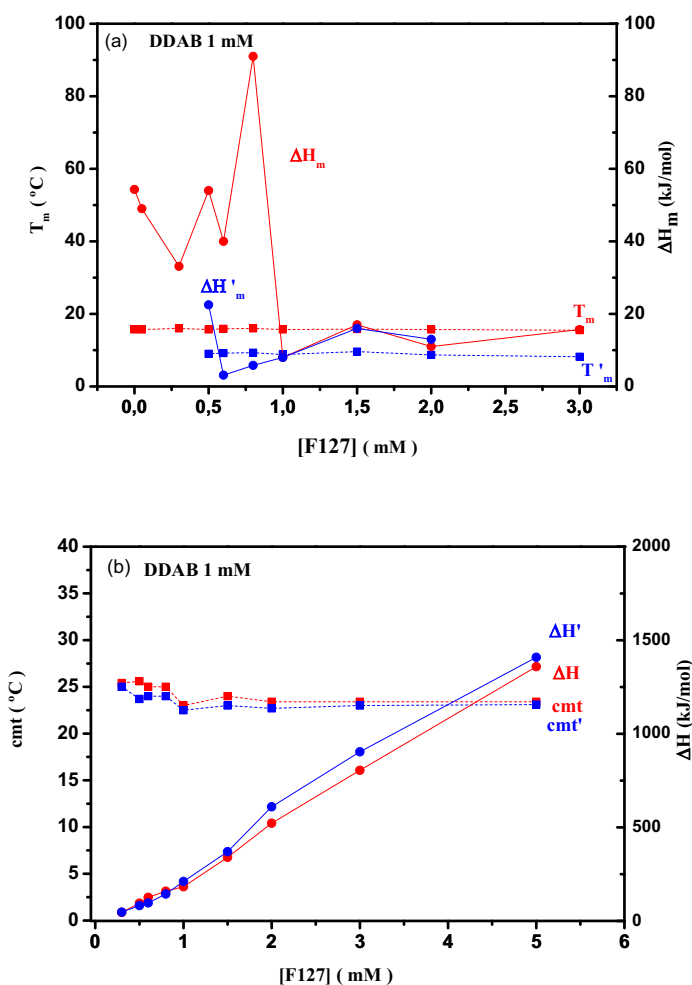


Figura 19. Efeito da [F127] na T_m e ΔH_m (a), cmt e ΔH (b) dos sistemas F127/DDAB obtidos dos termogramas DSC de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul). Aquecimento tempo de equilíbrio 12h e resfriamento tempo de equilíbrio de 15 min.

Com base nos dados de calorimetria, notamos que na presença de F127, a estrutura de vesículas de DDAB, DODAB ou DODAC é preservada até uma determinada concentração de F127, a partir da qual não há mais vesículas e a amostra é dominada por micelas. As amostras apresentam uma região onde coexistem vesículas e micelas. Os resultados demonstram que a transição vesícula-micela, induzida pela adição de F127, depende da composição química do lipídio (comprimento das cadeias hidrofóbicas e do tipo de contra íon). Essa transição também depende da temperatura, especialmente se estiver abaixo ou acima do valor da cmt de F127.

Os comportamentos térmicos de todos os lipídios estudados são alterados na presença de F127, esta evidência é observada na inibição da transição principal de cada lipídio, as vesículas formadas pelos lipídios de cadeia alquílicas maiores (DODAB e DODAC), são desestabilizadas na [F127] $\approx 0,5$ mM, ou seja, ocorre a ruptura das vesículas na solução. Enquanto os lipídios de cadeias menores

(DDAB), são desestabilizados na $[F127] \approx 3\text{mM}$. De acordo com os resultados de calorimetria nota-se que os lipídios de cadeias alquílicas menores são mais estáveis na presença de copolímero tribloco. Não se observa o comportamento diferente devido o contra íon (Br^- e Cl^-).

4.3 Determinação do Raio hidrodinâmico

Medidas de DLS permitem monitorar o efeito da concentração de F127 no raio hidrodinâmico (R_H) das partículas coloidais existentes nas amostras. Os resultados das medidas permitem identificar a existência de vesículas e de micelas nas amostras. Através da distribuição de tamanho dos agregados, verificamos alterações estruturais nas amostras, indicando a ocorrência da transição vesícula-micela.

Assim como nos dados de turbidez e calorimetria, os resultados de DLS (Figura 20) também mostram a transição vesícula-micela, em três estágios, com predominância de vesículas mistas (estágio I), de vesículas mistas e micelas em equilíbrio (estágio II) e de micelas mistas (estágio III), respectivamente com o aumento de $[F127]$. Na presença de F127, o perfil da curva R_H vs $[F127]$ difere para cada lipídio, indicando a interação entre o copolímero com as vesículas.

Para definir o R_H foram realizados três medidas a 25°C , nos dados apresentados são as médias aritméticas das regiões onde continha estruturas com tamanho comparáveis das vesículas ou micelas, pois a solução apresenta duas populações. Na ausência do copolímero, R_H das vesículas em solução aquosa é aproximadamente igual a 260, 210 e 400 nm, respectivamente para DODAB, DODAC e DDAB. Em geral, os valores de R_H das vesículas de DODAB são alterados com a concentração de F127 (Figura 20a). Porém, no estágio I, R_H diminui rapidamente, enquanto que no estágio II, R_H se modifica com a $[F127]$, alcançando um valor máximo de $R_H \approx 270$ nm para $[F127] \approx 1$ mM. No estágio II, ocorre a formação de micelas, R_H das micelas varia de 50-80 nm e diminui para $R_H \approx 20$ nm na região III.

No sistema DODAC/F127, verifica-se que R_H diminui para maiores $[F127]$ de modo menos pronunciado no estágio I e oscila no estágio II, enquanto que o tamanho das micelas tende a aumentar no estágio II e a diminuir no estágio III (Figura 20b). Na Figura 20a nota-se alterações dos valores do R_H comparado com as Figuras 20b e 20c, estas alterações são devido o lipídio DODAB ser mais monodisperso comparado com os outros lipídios. Vale destacar que as regiões de concentração dos estágios para DODAB e DODAC são as mesmas, 0,5 e 1,5 mM de F127, onde aparecem regiões micelares e a desestabilização das vesículas respectivamente.

De acordo com a Figura 20c, F127 diminui R_H das vesículas de DDAB no estágio I de aproximadamente 400 para 250 nm quando $[F127] \approx 0,7$ mM e micelas começam a se formar. No intervalo de 0,7 - 2mM de $[F127]$, vesículas e micelas coexistem e as micelas são as estruturas dominantes acima de 2mM do copolímero tribloco. Nota-se que R_H das micelas tende a aumentar para

maiores concentrações de F127 para DDAB a partir de 2mM, o que pode estar relacionado à formação de micelas mistas de F127/DDAB, cujo tamanho se diferencia das micelas simples de F127.

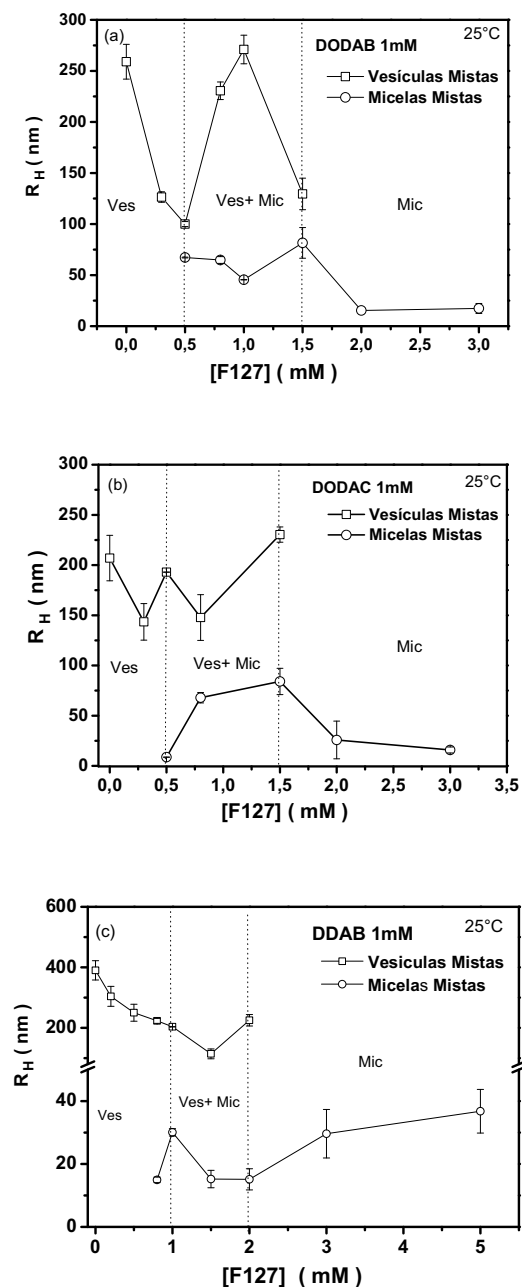


Figura 20. Efeito da [F127 mM] no R_H das vesículas DODAB (a), DODAC (b) e DDAB (c). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°. Onde VES indica região vesicular simples e mista, MIC indica a formação de micelas simples e mista.

4.4 Potencial zeta e condutividade

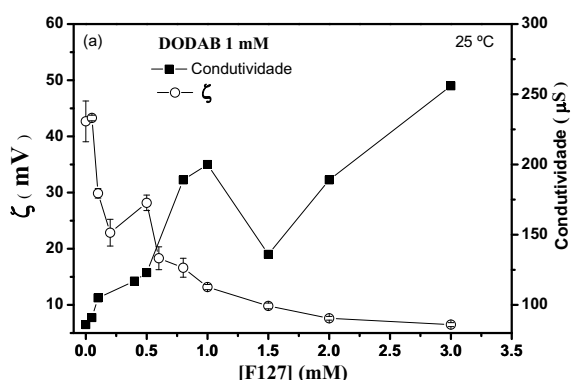
De acordo com a Figuras 21a-21c, o potencial zeta (ζ) diminui em função da [F127], indicando alterações na densidade superficial de cargas e no tamanho das vesículas dos complexos catiônicos investigados.

Na ausência de F127, $\zeta \approx 43, 33$ e 65 mV, respectivamente para DODAB, DODAC e DDAB e, na presença do copolímero, esses valores diminuem com a [F127] até um valor mínimo de 8-12 mV. Esta diminuição deve estar relacionada à diminuição da distribuição superficial de cargas positivas nos agregados vesiculares e micelares ou a presença de monômeros livres (Figura 21a). Observa-se que o ζ é positivo, caracterizando que as vesículas e micelas são catiônicas. O aumento no valor da condutividade, DODAB 10 até $70 \mu\text{S}$, DODAC de 11 até $35 \mu\text{S}$ e DDAB 5 até $60 \mu\text{S}$, valores aproximados, (Figura 21a-21c), reflete a modificação no tamanho médio dos agregados e a formação de monômeros livres, alterando a mobilidade eletroforética.

De acordo com os resultados, ocorre a solubilização do copolímero na bicamada das vesículas, causando não apenas a diminuição na densidade superficial de carga, como também na desorganização estrutural, formação de estruturas micelares menores do que as vesículas.

Apesar das curvas de potencial zeta e condutividade não permitirem distinguir os três estágios da transição vesícula-micela, notamos maior variação desses parâmetros num intervalo de 0 a 1 mM (estágio I) e menor variação acima de 1,5 mM (estágio III), que resultam na variação estrutural.

A diminuição no potencial zeta e a alteração da condutividade com o [F127] pode ser correlacionada aos dados de turbidez, calorimetria e espalhamento de luz, da seguinte forma: para maiores concentrações de F127, há desestabilização das vesículas e ocorre a formação de estruturas mistas e mais estáveis.



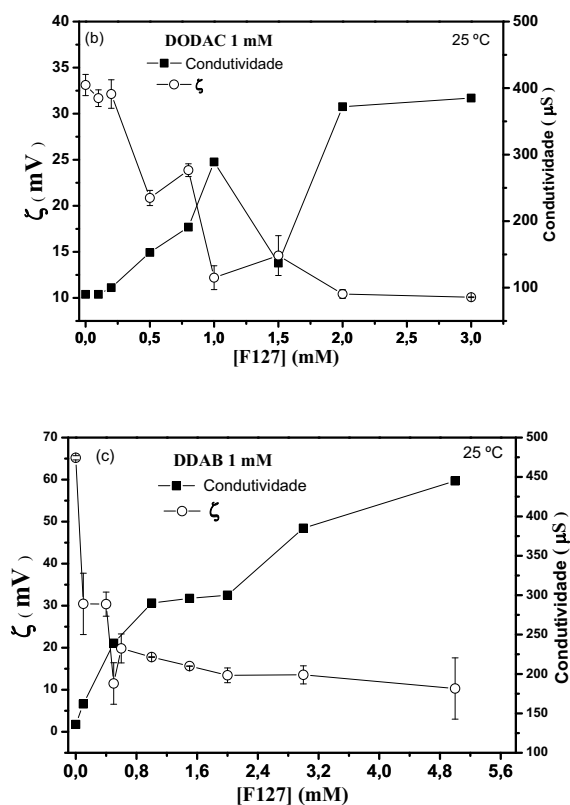


Figura 21. Efeitos da concentração de F127 no potencial zeta (ζ) e na condutividade DODAB, DODAC e DDAB a 25 °C.

4.5 Modelo proposto para os complexos Lipídios catiônicos-F127

O estudo da interação entre as vesículas catiônicas e F127 visa desenvolver modelos de carreadores de fármacos ou gene. Dependendo da concentração, F127 compõe as vesículas ou micelas, conforme ilustra a Figura 22. Em geral, num intervalo de [F127] de 0,05 até 3 mM, F127 são adsorvidos ou embebidos nas vesículas, este valor pode ser alterado dependendo das características físico-químicas dos lipídios estudados, enquanto que, em concentrações maiores de F127, acima de 5 mM, os lipídios incorporam as micelas (Figura 22).

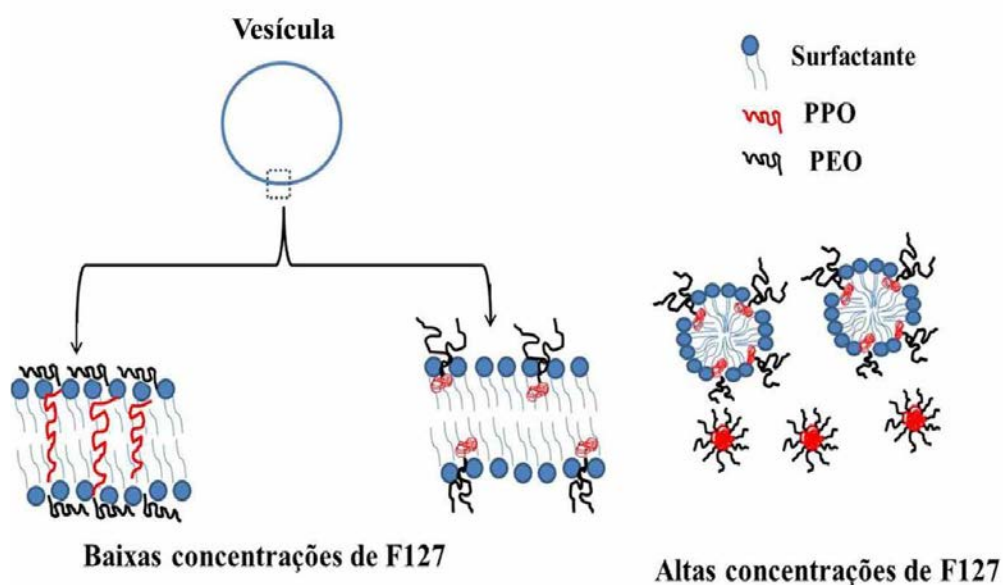


Figura 22. Possíveis modelos de interação lipídio-copolímero em bicamada e micelas.

5. CONCLUSÃO

Estudamos o efeito do comprimento das cadeias alquílicas do lipídio catiônico e do contra íon na interação com F127. Fixando a concentração lipídica em 1 mM, variamos a concentração de F127 e observamos a transição vesícula-micela. Mostramos que essa transição depende predominantemente do comprimento da cadeia alquílica do lipídio (C_{12} ou C_{18}) ao tipo do contra íon (Br^- ou Cl^-).

Com base nos resultados de DSC, turbidez, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta, mostramos que a transição vesícula-micela nos sistemas lipídio catiônico/copolímero tribloco F127 investigados ocorre em três estágios: no estágio I predominam vesículas mistas; no estágio II predominam misturas de vesículas e micelas; e no estágio III predominam micelas mistas.

Os nossos principais objetos de estudo são as vesículas e as micelas mistas compostas de lipídio catiônico/F127, que têm grande potencial de aplicação na compactação de moléculas de DNA para fins de transfecção celular. Com os estudos concluímos que a incorporação de DNA na região do estágio I (Figura 8) desses sistemas deve favorecer a formação de lipoplexos, enquanto que a adição de DNA à região do estágio III (Figura 8) deve favorecer a formação de poliplexos.

Os resultados obtidos nos permitem a proposição de um modelo de vesículas nos quais os copolímeros estão embebidos na região da bicamada e os segmentos de PEO voltados para o interior ou para o exterior das vesículas, pois, nesta configuração, as propriedades térmicas são pouco afetadas. Em menor quantidade, os copolímeros podem ser incorporados na bicamada, pois nesta conformação, as propriedades térmicas seriam mais intensamente afetadas.

6. PERSPECTIVAS

Pretende-se, na sequência (após a defesa do Mestrado), estudar a formação de lipoplexos, lipídios catiônicos na presença de moléculas de DNA e/ou RNA ou fármacos em geral, visando a realização de testes de eficiência em transfecção celular *in vitro* e de citotoxicidade. Estes testes serão realizados em colaboração com colegas portugueses do grupo da Profa. Dra. Maria Elisabete C.D. Real Oliveira, num possível projeto de doutoramento.

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 1-46, 1995.

_____. et al. Surface activity of poly(ethylene-oxide) - block - poly(propylene-oxide) -block - poly(ethylene-oxide) copolymers. **Langmuir**, Washington, v. 10, n. 8, p. 2604-2612, 1994.

ALVES, F. R. et al. Vesicle - micelle transition in aqueous mixtures of the cationic dioctadecyl-dimethylammonium and octadecyltrimethylammonium bromide surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 316, n. 1, p. 132-139, 2007.

ANTUNES, F. E. et al. Polymer-vesicle association. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, n. 147-148, p. 18-35, 2009.

BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G.; ALEXANDRIDIS, P. Interaction of DNA with cationic vesicles: a calorimetric study. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 104, n. 32, p. 7795-7802, 2000.

_____. et al. Interaction of octaethylene glycol n-dodecyl monoether with dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles. **Langmuir**, Washington, v. 18, n. 4, p. 1024-1029, 2002.

BATZRI, S.; KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 298, n. 4, p. 1015-1019, 1973.

BLANDAMER, M. J. et al. Reorganisation of alkyl chains in vesicles formed in aqueous solution by dialkyldimethylammonium bromide, $R_2N^+Me_2Br^-$ where $R=C_{12}H_{25}$, $C_{14}H_{29}$, $C_{16}H_{33}$ or $C_{18}H_{37}$. **Journal Chemical Society, Faraday Transactions**, Cambridge, v. 93, p. 453-455, 1997.

BOHORQUEZ, M. et al. A Study of the temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.216, n.1, p.34-401, 1999.

CHAIBUNDIT, C. et al. Micellization and gelation of mixed copolymers P123 and F127 in aqueous solution. **Langmuir**, Washington, v. 23, n. 18, p. 9229-9236, 2007.

CHANDAROY, P.; SEN, A.; HUI, S. W. Temperature - controlled content release from liposomes encapsulating Pluronic F127. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 27-37, 2001.

CHU, B. **Laser light scattering**. New York: Academic Press, 1974.

COOPER, A.; NUTLEY, M. A.; WADOOD, A. Differential scanning microcalorimetry in solution. In: HARDING, E.; CHOWDHRY, B. Z. (Eds.). **Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 287-318.

CUCCOVIA, I. M. et al. Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 72, n. 1-3, p. 323-336, 1997.

FEITOSA, E. Kinetic asymmetry in the gel-liquid crystalline state transitions of DDAB vesicles studied by differential scanning calorimetry. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 344, n. 1, p. 70-74, 2010.

_____; ADATI, R. D. Reversibility of thermal transitions in dilute dioctadecyl-dimethyl-ammonium bromide vesicles. **Journal of Surfactants and Detergents**, Champaign, v. 17, n. 5, p. 1055-1058, 2014.

_____; _____; ALVES, F. R. Thermal and phase of didodecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, 2015. No prelo.

_____; ADATI, R. D.; KARLSSON, G. Effect of lipid concentration on self-assembly structures of dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride studied by DSC and cryo-TEM. 2014. Em preparação.

_____; BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 105, n. 2, p. 201-213, 2000.

_____; BROWN, W. Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide. **Langmuir**, Washington, v. 13, n. 18, p. 4810-4816, 1997.

_____; JANSSON, J.; LINDMAN, B. The effect of chain length on the melting temperature and size of dialkyldimethylammonium bromide vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 142, n. 1-2, p. 128-132, 2006.

_____; WINNIK, F. Interaction between Pluronic F127 and dioctadecylmethylammonium bromide (DODAB) vesicles studied by differential scanning calorimetry. **Langmuir**, Washington, v. 26, n. 23, p. 17852-17857, 2010.

_____. et al. Thermal and structural behavior of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions studied by differential scanning calorimetry and X-ray scattering. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 9, p. e44702, 2012.

_____. et al. DODAB and DODAC bilayer-like aggregates in the micromolar surfactant concentration domain. **Colloid and Polymer Science**, Darmstadt, v. 287, p. 591-599, 2009.

GAUCHER, G. et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 109, p. 169-188, 2005.

GRADZIELSKI, M. et al. Structural and macroscopic characterization of a gel phase of densely packed monodisperse, unilamellar vesicles. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington v. 103, n. 9, p. 1416-1424, 1999.

HAMLEY, I. W. **Block copolymers in solution: fundamentals and application**. New York: Wiley, 2005.

HAUSER, H.; BARRATT, M. D. Effect of chain-length on stability of lecithin bilayers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 53, n. 2, p. 399-405, 1973.

HECHT, E.; HOFFMANN, H. Kinetic and calorimetric investigations on micelle formation of block copolymers of the poloxamer type. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 181-197, 1995.

HOPE, M. J. Enhancing siRNA delivery by employing lipid nanoparticles. **Therapeutic Delivery**, London, v. 5, n. 6, p. 663-673, 2014.

ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces. 3. ed. San Diego: **Academic Press**, 2011.

KABANOV, A.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic[®] block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 82, n. 2-3, p. 189-212, 2002.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y. A totally synthetic bilayer membrane. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 99, n. 11, p. 3860-3861, 1977.

LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. **The Biochemical Journal**, London, v. 256, n. 1, p. 1-11, 1988.

LASIC, D. D.; TEMPLETON, N. S. Liposomes in gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 20, p. 221-266, 1996.

LIANG, C. H.; CHOU, T. H. Effect of chain length on physicochemical properties and cytotoxicity of cationic vesicles composed of phosphatidylcholines and dialkyldimethylammonium bromides. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 158, n. 2, p. 81-90, 2009.

LOPES, A.; EDWARDS, K.; FEITOSA, E. Extruded vesicles of dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride investigated by light scattering and cryogenic transmission electron microscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 322, n. 2, p. 582-588, 2008.

LV, H. et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 100-109, 2006.

MARQUES, E. F.; KHAN, A.; LINDMAN, B. A calorimetric study of the gel-to-liquid crystal transition in cationic surfactant vesicles. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 394, n. 1-2, p. 31-37, 2002.

MORTENSEN, K. PEO-related block copolymers surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 183-185, p. 277-292, 2001.

OLIVEIRA, A. et al. Dioctadecyldimethylammonium: monoolein nanocarriers for efficient in vitro gene silencing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 6, n. 9, p. 6977-6989, 2014.

OLIVEIRA, I. M. S. C. et al. Aggregation behavior of aqueous dioctadecyldimethylammonium bromide/monoolein mixtures: a multitechnique investigation on the influence of composition and temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 374, n. 1, p. 206-217, 2012.

OLIVIERO, C. et al. Dynamic phase diagram and onion formation in the system C₁₀E₃/D₂O. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 228, n. 1-3, p. 85-90, 2003.

OLSON, F. et al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Amsterdam, v. 557, n. 1, p. 9-23, 1979.

RASSING, J.; ATTWOOD, D. Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 47-55, 1982.

SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 121, n. 1-3, p. 51-75, 2006.

SILVA, R. C.; LOTH, W.; OLOFSSON, G. Calorimetric investigation of temperature effect on the interaction between poly(ethylene oxide) and sodium dodecylsulfate in water. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 417, n. 2, p. 295-300, 2004.

STEFANUTTI, E. et al. Cationic liposomes formulated with DMPC and a gemini surfactant traverse the cell membrane without causing a significant bio-damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1838, n. 10, p. 2646-2655, 2014.

SU, Y. L.; WEI, X. F.; LIU, H. Z. Effect of sodium chloride on association behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 264, n. 2, p. 526-531, 2003.

VAN DER LINDEN, E.; BUYTENHEK C. J. Spontaneous formation of onion phases in a single surfactant system and their salt-induced transformation towards ordinary lamellar phases. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, Amsterdam, v. 245, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

VIEIRA, D. B.; PACHECO, L. F.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Assembly of a model hydrophobic drug into cationic bilayer fragments. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 293, n. 1, p. 240-247, 2006.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. **Macromolecules**, Easton, v. 27, n. 15, p. 4145-4159, 1994.

WENZEL, J. G. W. et al. Pluronic[®] F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 85, n. 1-3, p. 51-59, 2002.

WEINER, B. B.; TSCHARNUTER, W. W. Uses and abuses of PCS in particle sizing. In: PROVIDER, Theodore (Ed.). **Particle size distribution, assessment and characterization**. Washington: American Chemical Society, 1987. (ACS Symposium, Series, 332)

ZHANG, Y.; LAM, Y. M.; TAN, W. S. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)-g-poly(vinylpyrrolidone): association behavior in aqueous solution and interaction with anionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 285, n. 1, p. 74-79, 2005.

ZHADANOV, R. I.; PODOBED, O. V.; VLASSOV, V. V. Cationic lipid–DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 53-64, 2002.

8. ANEXOS

ANEXO I

Tabelas de F127

Tabela 1. Parâmetros térmicos de F127 mM obtidos no aquecimento e no resfriamento.

[F127] (mM)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	cmt' (°C)	$\Delta H'$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	cmt - cmt' (°C)
0,2	30,0	61,0	5,0	28,8	40,0	5,0	1,2
0,3	29,0	93,0	5,1	28,2	77,0	5,2	0,8
0,4	28,5	126,2	5,0	27,8	105,5	5,0	0,7
0,5	28,1	160,0	5,0	27,5	133,0	5,0	0,6
0,8	27,0	260,0	5,0	27,0	220,0	5,0	0
1,0	27,0	295,0	5,0	27,0	334,0	5,1	0
1,5	26,9	437,8	5,1	26,5	441,0	5,5	0,4
2,0	26,2	578,3	5,0	25,7	549,0	5,2	0,5
3,0	25,5	795,0	5,2	25,0	746,0	5,2	0,5
5,0	23,4	1462,6	5,0	23,0	1436,6	5,0	0,4

Tabelas de DODAB/F127

Tabela 2. Parâmetros térmicos de DODAB 1mM no aquecimento.

[F127] (mM)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_s (°C)	ΔH_s (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_p (°C)	ΔH_p (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-	-	35,6	42,9	1,6	45,0	54,4	0,7	52,0	1,6	0,9
0,05	28,7	4,0	4,2	36,0	22,0	1,3	39,7	15,0	1,0	44,5	36,0	0,9
0,1	26,0	9,7	4,0	35,0	4,4	1,4	44,7	16,7	0,9	-	-	-
0,2	26,4	57,6	5,5	-	-	-	45,3	19,4	0,7	-	-	-
0,3	25,0	67,0	5,0	-	-	-	44,3	5,0	1,2	-	-	-
0,5	25,0	135,8	5,8	-	-	-	45,3	8,9	1,4	-	-	-
0,6	25,2	155,0	5,9	-	-	-	45,0	5,3	1,7	-	-	-
0,8	25,2	225,5	6,0	-	-	-	45,5	7,0	1,2	-	-	-
1,0	23,4	236,0	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5	24,0	447,4	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	26,8	593,0	9,5									
3,0	26,0	900,2	8,4									
5,0	24,0	1304,0	8,0									
F127 1,0mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3. Parâmetros térmicos de DODAB 1mM no resfriamento.

[F127] (mM)	cmt' (°C)	$\Delta'H_m$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-	-	40,0	53,9	0,5
0,05	27,0	4,2	4,6	40,0	36,0	0,5
0,1	26,0	26,0	6,7	40,0	15,7	0,5
0,2	26,5	59,0	5,7	40,3	18,5	0,6
0,3	25,0	71,8	5,0	40,0	2,7	0,5
0,5	24,0	151,5	5,0	41,0	8,0	2,6
0,6	25,0	135,3	5,2	40,0	4,0	0,7
0,8	24,7	207,9	5,4	40,0	8,2	0,7
1,0	22,0	237,0	4,0	-	-	-
1,5	22,0	416,0	6,0			
2,0	20,3	573,4	8,9			
3,0	20,2	871,2	6,6			
5,0	18,6	1311,0	9,4			
F127 1,0 mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-

Tabelas de DODAC/F127**Tabela 4.** Parâmetros térmicos de DODAC 1mM no aquecimento

[F127] (mM)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-	-	49,0	49,5	0,3
0,05				48,6	21,0	0,3
0,1	26,3	10,9	4,4	48,6	9,4	0,5
0,2	24,0	52,0	4,3	49,0	10,4	0,4
0,3	23,5	69,5	4,0	49,2	3,4	0,5
0,5	22,4	110,5	4,1	50,0	2,5	0,6
0,6	23,0	128,6	5,2			
0,8	22,0	169,4	6,5			
1,0	21,5	198,5	6,6	-	-	-
1,5	24,0	407,2	9,5			
2,0	25,2	626,1	9,4			
3,0	24,0	906,1	5,5			
5,0	23,5	1404,8	9,0			
F127 1,0mM	27,0	295	5,0	-	-	-

Tabela 5. Parâmetros térmicos da DODAC 1mM no resfriamento

[F127] (mM)	cmt' (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-	-	44,0	51,4	0,9
0,05				43,0	16,3	1,0
0,1	26,2	19,6	6,0	43,0	8,3	1,4
0,2	23,4	40,9	4,0	43,3	10,1	2,1
0,3	23,0	70,0	4,0	43,3	1,8	1,5
0,5	21,5	179,7	6,4	45,3	1,6	1,4
0,6	22,0	119,0	6,0	-	-	-
0,8	21,6	120,1	7,0	-	-	-
1,0	21,5	219,1	7,0	-	-	-
1,5	22,2	357,0	9,0	-	-	-
2,0	22,0	648,3	9,6	-	-	-
3,0	22,0	803,0	9,5	-	-	-
5,0	22,0	1494,8	9,0			
F127 1,0mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-

Tabela de F127 – Efeito do Pré - varredura**Tabela 6.** Parâmetros térmicos de F127 na concentração de 2 mM.

Tempo de pré- scan (min)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	cmt' (°C)	$\Delta H'$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	cmt – cmt' (°C)
15	25,6	624,1	5,09	-	-	-	-
360	25,6	633,4	5,2	-	-	-	-
720	25,6	637,2	5,2	-	-	-	-
15	-	-	-	25,3	631,0	5,1	0,1

Tabelas de DDAB/F127

Tabela 7. Parâmetros térmicos de DDAB 1 mM por aquecimento com pré-equilíbrio – 12h.

[F127] (mM)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-		15,7	57,0	0,3
0,05	-	-	-	15,7	49,0	0,4
0,3	25,4	45,4	6,0	16,0	33,1	0,4
0,5	25,6	95,0	7,7	15,7	54,0	0,5
0,6	25,0	126,0	7,4	15,9	40,0	0,4
0,8	25	159,0	8,0	16,0	91,0	0,3
1,0	23,0	183,0	8,3	15,7	18,0	0,7
1,5	24,0	340,0	8,0	15,8	7,0	0,7
2,0	23,4	522,0	8,4	15,7	6,0	0,5
3,0	23,4	805,0	8,9	-	-	-
5,0	23,4	1359,0	8,4	-	-	-
F127 1,0 mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-

Tabela 8. Parâmetros térmicos de DDAB 1mM por resfriamento com pré-equilíbrio - 15 min.

[F127] (mM)	cmt' (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T'_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-	-	-	-	-
0,05	-	-	-	-	-	-
0,3	25,0	47,0	7,2	-	-	-
0,5	23,7	82,0	7,1	9,0	22,5	7,6
0,6	24,0	96,3	7,0	9,2	3,1	4,0
0,8	24,0	144,0	7,5	9,3	5,8	4,0
1,0	22,5	211,0	8,9	8,8	8,0	3,1
1,5	23,0	370,0	8,2	9,6	16,0	4,3
2,0	22,7	610,0	8,9	8,7	10,0	3,7
3,0	23,0	904,0	9,2	8,2	13,0	3,1
5,0	23,1	1409,0	8,8	-	-	-
F127 1,0 mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-

Tabela 9. Parâmetros térmicos de DDAB 1mM /F127 por aquecimento com pré-equilíbrio -15 min.

[F127] (mM)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-	-	15,7	41,0	0,4
0,05	-	-	-	15,0	10,2	0,3
0,3	25,0	20,0	5,4	13,4	23,0	2,0
0,5	24,0	48,0	5,7	13,2	40,0	2,0
0,6	24,3	83,0	6,0	13,0	34,0	2,0
0,8	23,2	63,0	6,0	13,7	130,0	3,1
1,0	23,0	189,0	6,2	-	-	-
1,5	23,0	312,0	7,6	12,2	11,0	1,5
2,0	23,0	312,0	8,5	-	-	-
3,0	23,0	524,0	9,0	-	-	-
5,0	23,0	1376,0	9,0	-	-	-
F127 1,0 mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-

Tabela 10. Parâmetros térmicos de DDAB 1mM /F127 por aquecimento com pré-equilíbrio - 6h.

[F127] (mM)	cmt (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
0,0	-	-		16,0	55,0	0,3
0,05	-	-	-	16,0	28,0	0,3
0,3	25,0	36,0	5,2	15,9	28,2	0,4
0,5	24,0	72,0	5,5	15,9	50,0	0,4
0,6	24,6	96,0	6,3	15,9	37,0	0,4
0,8	24,0	143,0	6,5	15,9	78,0	0,4
1,0	23,0	183,0	6,3	14,0	16,0	2,0
1,5	23,0	336,0	7,8	15,6	9,7	1,0
2,0	23,0	516,0	8,4	15,6	8,3	1,0
3,0	23,3	817,0	9,0	12,0	1,8	1,4
5,0	23,0	1358,0	9,5	-	-	-
F127 1,0 mM	27,0	295,0	5,0	-	-	-