Universidade de São Paulo

Instituto de Física

**Caracterização estrutural de agregados formados pelo
antifúngico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma
possível formulação farmacológica**

Tiago Ribeiro de Oliveira

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy (IF - USP)

Profa. Dra. Karin do Amaral Riske (UNIFESP)

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento (IFSC-USP)

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Oliveira, Tiago Ribeiro de

Caracterização estrutural de agregados formados pelo
antibiótico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma
possível formulação farmacológica – São Paulo - 2008

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.
Instituto de Física – Depto. de Física Geral

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy

Área de Concentração: Biofísica

Unitermos: 1. Biofísica; 2. Farmacodinâmica;
3. Antibióticos; 4. Lipídios catiônicos.

USP/IF/SBI-007/2009

Agradecimentos

À Teresa, pela orientação durante esses anos, pela paciência e por oferecer ao seu Técnico de Laboratório essa oportunidade.

À Carla e Vera, pelas grandes discussões realizadas nas reuniões de Espalhamento de Luz .

Aos meus amigos Raul , Evandro , Fernando e Rafael, por participarem ativamente deste processo.

À minha família, que sempre me apoiou durante todos os momentos difíceis.

Em especial a minha namorada Renata, por fazer parte da minha vida.

Nomenclatura

16-MESL	16 Doxil Metil Ester
5-MESL	5 Doxil Metil Ester
a_0	desdobramento hiperfino isotrópico
AB	Anfotericina B
$A_{\text{máx}}$	desdobramento hiperfino máximo
ΔH	variação de entalpia
ΔH_0	largura de linha do pico central
$C_{18}\text{TAB}$	Brometo de octadeciltrimetilamônio
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAB ^S	dispersões de DODAB preparadas a por sonicação
DODAB ^{NS}	dispersões de DODAB preparadas por simples agitação
DSC	calorimetria diferencial de varredura
L_β	fase gel
L_α	fase líquido-cristalino
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
T_m	temperatura de transição principal (gel-líquido-cristalino)
T_p	temperatura de pré-transição
τ_b , τ_c	tempos de correlação de difusão da molécula (RPE)
τ	Turbidez

Caracterização estrutural de agregados formados pelo antifúngico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma possível formulação farmacológica

Resumo

A Anfotericina B (AB) é um antibiótico antifúngico natural, do grupo dos polienos, produzido por cultura de bactérias *Streptomyces nodosus*. A AB foi isolada pela primeira vez em 1953, e desde então tem sido utilizada extensivamente no tratamento clínico de infecções sistêmicas. Como a AB é altamente insolúvel em meio aquoso, a formulação de escolha tem sido dispersões aquosas de micelas mistas de AB e desoxicolato de sódio (Fungizon). Entretanto, a alta toxicidade deste fármaco tem estimulado a proposição de várias outras formulações. O presente trabalho estuda uma dessas formulações alternativas propostas: agregados de AB e Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB). O objetivo principal deste trabalho foi tentar avaliar, numa visão estrutural, as propriedades e peculiaridades envolvidas na interação da AB com as dispersões de DODAB. Neste trabalho, centrou-se no estudo de dispersões de DODAB, sonicadas (DODAB^S) e não sonicadas (DODAB^{NS}), onde o antibiótico estivesse, principalmente, na forma monomérica, tendo em vista a proposta baixa toxicidade da AB enquanto monômero.

Para avaliar estes sistemas utilizaram-se as técnicas de absorção óptica, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de marcadores de spin incorporados nos agregados lipídicos. Mostrou-se que a AB monomérica incorpora-se tanto em vesículas de DODAB^{NS}, como nos pequenos agregados de DODAB^S, sendo maior sua incorporação nestes últimos. Foi possível mostrar que até a fração molar (AB/DODAB) de 1,2 mol% a AB está totalmente monomérica, incorporada em agregados de DODAB^S, mas somente parcialmente em vesículas de DODAB^{NS}. Nas bicamadas de DODAB^{NS}, a preferência da AB monomérica é pela fase gel, 40 % incorporada, comparada com 23 % na fase fluida.

As várias técnicas indicam que a AB encontra-se na superfície da bicamada, com seu cromóforo hidrofóbico enxergando um meio de polarizabilidade maior do que a da água, tanto em DODAB^S como em DODAB^{NS}. Marcadores de spin mostram a coexistência de domínios lipídicos em fases diferentes, gel e fluida, a baixas temperaturas, em DODAB^S. Curiosamente, indicam que a AB monomérica interage, preferencialmente, com os domínios mais fluidos, em desacordo com a observada maior afinidade da AB pela fase gel de bicamadas lipídicas de DODAB^{NS}.

O estudo termo-estrutural de dispersões de DODAB^{NS} e DODAB^S aqui apresentado, na presença e ausência de AB, pode ser relevante na proposta de novas formulações farmacológicas.

Structural characterization of aggregates formed by the antifungal drug amphotericin B and cationic lipids: a possible pharmacological formulation

Abstract

Amphotericin B (AB) is a natural antibiotic, produced by *Streptomyces nodosus*, with a very potent antifungal activity. It is a polyene macrolide molecule, isolated in 1953. Since then, it has been extensively used in the treatment of systemic mycotic infections. Considering AB very low solubility in aqueous medium, it has been largely used as an aqueous dispersion of sodium deoxycholate-AB mixed micelles (Fungizon). However, the high toxicity of this preparation has led to the proposition of different other formulations. The present work focuses on one of the proposed preparations, namely aggregates formed by AB and the cationic lipid dioctadecyldimethylammonium (DODAB). Considering the proposed low toxicity of monomeric AB, the present work studies DODAB dispersions, sonicated (DODAB^S) and non-sonicated (DODAB^{NS}), where AB is mostly monomeric.

To the structural analysis, optical absorption, differential scanning calorimetry (DSC) and electron spin resonance of spin labels incorporated in the aggregates were used. It was found that AB as a monomer incorporates in aggregates present in both dispersions, DODAB^S and DODAB^{NS}, but the incorporation of monomeric AB in the small fragments present in DODAB^S is much larger. It was shown that AB incorporates in DODAB^S aggregates, as a monomer, up to AB/DODAB concentration of 1.2 mol%. At this concentration, only 40 % and 23 % of AB molecules are in the monomeric state in the gel and fluid phases of DODAB^{NS} bilayers, respectively. Hence, the gel phase of DODAB^{NS} bilayers favors the monomerization of AB, as compared to the bilayer fluid phase.

All the applied techniques point to a superficial interaction of monomeric AB with DODAB aggregates, with the hydrophobic polyene chromophore positioned relatively inside the bilayer, in a region of polarizability higher than that of water, in both dispersions, DODAB^S and DODAB^{NS}. Spin labels indicate the coexistence of gel and fluid domains in DODAB^S aggregates, at low temperatures, supporting the proposed hypothesis of the presence of bilayer fragments in the dispersion. Contrarily to the higher detected affinity of monomeric AB for the gel phase, as compared to the fluid phase of DADAB^{NS} bilayers, spin labels indicate that monomeric AB is mostly adsorbed at the fluid domain of the fragments, possibly corresponding to the periphery of the fragments.

The thermal-structural study presented here of DODAB^{NS} and DODAB^S, in the presence and absence of AB, can be relevant in the design of new pharmaceutical formulations.

Índice

Agradecimentos	I
Nomenclatura	II
Resumo	III
Abstract	IV
1. Introdução	1
1.1 Anfotericina B	1
1.2 Anfílicos	9
1.3 Objetivos	16
2. Técnicas	17
2.1 Absorção Óptica	17
2.2 Turbidez	25
2.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica	27
2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura	44
3. Materiais e Métodos	47
3.1 Materiais	47
3.2 Métodos	48
4. Resultados e Discussões	55
4.1 Caracterização estrutural do sistema DODAB	55
4.1.1 Caracterização estrutural do DODAB ^S por Turbidez	55
4.1.2 Caracterização por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	61
4.1.3 Caracterização por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	69
4.2 Interação da AB com dispersões de DODAB	76
4.2.1 Monitoramento da interação AB - dispersões de DODAB por Absorção Óptica	76
4.2.2 Monitoramento por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	87
4.2.3 Monitoramento por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	103

5. Conclusões	109
5.1 Efeitos da interação AB-dispersões de DODAB ^{NS}	109
5.2 Caracterização estruturais do DODAB ^S	109
5.3 Efeitos da interação AB-DODAB ^S	110
Apêndice	112
A. Organização da AB em Meio Aquoso	112
B. Efeitos do Solvente	116
C. Interação entre Cromóforos	121
D. Clausius-Mossotti	130
E. Dependência da Turbidez com o comprimento de onda da luz	135
Referências	142

1. Introdução

1.1 Anfotericina B

(Filippin e Souza, 2006; Baginski e col., 2006; Hartsel e Bolard, 1996)

Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por leveduras em humanos sofreu grande aumento, especialmente em doentes com sistema imunológico comprometido (o caso dos doentes com AIDS ou doentes à espera de um transplante) (Chang e col., 2000; Selitrennikoff, 2001; Kuhn e col., 2003). Para muitas destas infecções, o fármaco de escolha é o antifúngico chamado de Anfotericina B, ou comercialmente conhecido como Fungizone® (Bristol-Meyers Squibb).

A Anfotericina B (AB) é um antibiótico antifúngico natural, do grupo dos polienos, produzido por cultura de bactérias *Streptomyces nodosus*. A AB foi isolada pela primeira vez em meados de 1953, e desde então tem sido utilizada extensivamente no tratamento clínico de muitas infecções sistêmicas. Atualmente ela figura como um dos mais antigos antibióticos ainda utilizados na prática médica com o mesmo agente ativo. Estes 50 anos de uso clínico da AB são resumidos na Fig.1.1, que aponta as principais datas da sua evolução histórica.

Datas importantes na história da AB

Fig.1.1 - Seleção dos fatos mais importantes relacionados à história da Anfotericina B (AB). [figura extraída de (Baginski, e col., 2006)]

Existem duas razões principais que colocam a AB nesta posição privilegiada entre os agentes antifúngicos durante todos esses anos: suas propriedades quimioterápicas únicas e a falta de drogas alternativas melhores. As propriedades quimioterápicas únicas da AB incluem sua alta atividade e largo espectro antifúngico. Características estas que os outros muitos agentes ainda não conseguiram alcançar. Todavia, a situação da AB está longe de ser a ideal, pois a AB, além de possuir alta atividade, possui também alta toxicidade, provocando uma série de reações adversas quando da sua administração. Desta forma, ainda existe um grande esforço na tentativa de minimizar os efeitos colaterais e aumentar a eficiência desta droga.

Estrutura química da AB

Muitas das propriedades quimioterápicas da AB estão relacionados às peculiaridades da sua estrutura química, que pode ser visualizada na Fig.1.2.

Fig.1.2 – Representação esquemática da estrutura química da molécula Anfotericina B em pH 7.

A AB possui 37 átomos de carbono, formando um anel macrocíclico fechado por lactonização; possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas (heptaeno) e, na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, conferindo a ela características anfipáticas. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um amino grupo livre, de pK_a igual 9.5, e um grupo carboxil, de pK_a igual 3.5 (Mazerski e col., 1990). Este dois grupos nesta extremidade, em pH fisiológico, conferem à AB características “zwiteriônicas” e constituem o que se chama de cabeça polar.

O amino grupo é um grupo flexível, que pode assumir algumas conformações com relação ao anel macrocíclico. O momento de dipolo elétrico da AB é extremamente dependente da posição

relativa dos grupos carregados CO_2^- e NH_3^+ . Alterações no momento de dipolo podem conferir à molécula diferentes propriedades nos diferentes meios.

O grupo heptaeno, devido à presença das duplas ligações, é normalmente considerado um grupo rígido, pois são poucas as possibilidades de ocorrer alguma curvatura e, portanto, não é suscetível à influência do meio ao redor. Entretanto, o grupo contendo as hidroxilas pode sofrer deformações “trans-gauche”, principalmente entre os carbonos C5 e C8, onde a configuração uniforme da cadeia de poli-hidroxilas é alterada.

Mecanismo de ação

Durante estes 50 anos de utilização da AB, centenas de trabalhos foram publicados sobre o modo de ação e a atividade da AB na membrana plasmática. Entretanto, apesar deste grande esforço para entender o mecanismo molecular de ação da AB, este ainda permanece obscuro. Existem diversas hipóteses propostas na literatura, mas nenhuma ainda capaz de abranger todos os aspectos envolvidos no mecanismo.

A ação antifúngica da AB está diretamente relacionada à sua atividade na membrana plasmática celular. De acordo com diversos dados experimentais, a AB possui a capacidade de formar poros transmembranares, os quais alteram a permeabilidade da membrana, causando o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons de potássio, que acabam por levar à morte celular.

O estudo do mecanismo molecular da atividade da AB na membrana plasmática concentra-se em descrever algumas características como a forma de introdução do antibiótico no interior da membrana, as propriedades para a formação dos canais e qual a estrutura destes canais formados. A AB é uma molécula anfifílica, ou seja, tanto em ambiente polar como em apolar, ela possui a tendência de se associar e formar agregados. Em meio aquoso (meio polar), a AB tende a formar agregados nos quais a região apolar da molécula mantém-se “protegida” da água e as regiões polares em contato com a mesma. Já em um ambiente anfifílico (meio apolar), a configuração do agregado deve se inverter, pois agora a AB tende a oferecer a região apolar para interagir com os lipídios e deve “proteger” a região polar de contato com o mesmo.

Diversas propriedades do sistema podem influenciar a formação dos canais, como o estado de associação da AB, a composição lipídica, o estado físico da membrana, o pH local etc. Dependendo da concentração de antibiótico, monômeros, dímeros ou oligômeros solúveis de AB podem alcançar a superfície da membrana e iniciar o processo de formação dos canais. Existem diversas propostas para o mecanismo de penetração e formação dos canais. Uma destas propostas, chamada de “mecanismo seqüencial”, considera que primeiramente alguns monômeros de AB penetram no

ambiente lipídico, através da interação com os esteróides e/ou outros lipídios, formando uma estrutura primária com os mesmos, e após este, num segundo passo, teria início a agregação no ambiente lipídico e a formação dos canais propriamente ditos. Outra proposta para este mecanismo, chamada de “passo único”, propõe que primeiramente a AB concentra-se na superfície da membrana, e inicia a formação de agregados. Após a formação dos agregados, em um único passo, facilitado pela presença dos esteróides, os agregados penetram na membrana, formando o canal. Além destas duas propostas, existem outras propostas descritas na literatura. Entretanto, atualmente existe uma tendência de considerar o mecanismo de “passo único” como um mecanismo mais provável. Com intuito de ilustrar este mecanismo de “passo único”, apresenta-se na Fig.1.3 uma representação pictórica do processo.

Fig.1.3 - Representação esquemática dos principais estágios de interação da AB com uma membrana plasmática, seguindo a proposta de mecanismo de passo único. No processo (i), a AB dispersa na solução particiona-se na superfície da membrana plasmática, sendo que o estado de organização na superfície irá depender da concentração de antibiótico. No processo (ii), conforme aumenta a concentração de antibiótico na superfície, a AB começa a agregar-se, até o momento que essa agregação atinge um ponto crítico e ocorre a penetração. [figura extraída de (Coutinho e Prieto, 2003)]

É importante salientar que a formação dos canais não está condicionada à presença dos esteróides, mas comprovadamente a presença destes aumenta em muito a eficiência de formação. Uma possível estrutura formada pelos canais de AB no ambiente lipídico está ilustrada nas Fig.1.4 e Fig.1.5.

Fig.1.4 - Visão superior do modelo de canal AB-esterol formado em uma membrana plasmática. Em amarelo ilustra-se a posição dos esteróides, os palitos azuis representam os fosfolipídios e no centro da figura [bolas vermelhas (Oxigênio), brancas (Hidrogênio) e azuis (Nitrogênio)] encontram-se as Anfotericinas, com suas cabeças polares na extremidade do canal. [figura extraída de (Baginski, e col., 2006)]

Fig.1.5 - Visão lateral do modelo de canal AB-esterol formado em uma membrana plasmática. Sendo a região azul a representação dos fosfolipídios, os retângulos amarelos os esteróides e em cinza as Anfotericina.. [figura extraída de (Kasai e col., 2008)]

As figuras Fig.1.4 e Fig.1.5 representam o mesmo modelo de estrutura dos canais formados pela AB, mas em cortes diferentes de observação. Neste modelo, os esteróides atuam como mediadores na interação entre a AB e os fosfolipídios.

Afinidade da AB ao colesterol

A afinidade da AB aos esteróides é uma afinidade seletiva, pois existem diferenças para cada tipo de esterol. Por exemplo: a afinidade da AB ao ergosterol (muito presente em membrana celular de fungos) é sensivelmente maior que ao colesterol (presente principalmente nas membranas celulares de mamíferos), pois em estudos comparativos observa-se que as alterações de permeabilidade são mais pronunciados em membranas contendo ergosterol. Porém, as razões para estas diferenças ainda permanece obscura.

A afinidade da AB por colesterol vem sendo muito estudada, tanto em modelos celulares como em lipossomos. Assim, embora a AB possua maior afinidade por ergosterol, muitos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e a outros constituintes da membrana celular de mamíferos.

A ligação da AB ao colesterol é dependente do estado de associação da AB no meio, pois estudos demonstraram que a capacidade de formação dos poros de AB frente a membranas contendo colesterol é muito pequena, quando a AB encontra-se no estado de associação monomérico. Indicando assim, que a AB no estado de associação monomérico deve possuir menor toxicidade.

Sistemas de transportes

Sabe-se que a AB é praticamente insolúvel em meio aquoso. Entretanto, a solubilidade da AB pode ser aumentada através da adição de lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio (DOC) ao meio aquoso, o qual tem a capacidade de formar estruturas micelares em meio aquoso. A formulação DOC_AB é a formulação convencional, encontrada no fármaco Fungizone®. A formulação DOC é utilizada com intuito de solubilizar a AB, entretanto o sistema constituído não pode ser considerado homogêneo, pois pode apresentar em sua constituição três formas diferentes de organização: monomérica, oligomérica e agregados de DOC_AB misturados com micelas puras de DOC (Lamy-Freund e col., 1989).

Como já discutido, a formulação convencional DOC_AB possui uma toxicidade extremamente alta, sendo capaz de promover diversas reações adversas. Por essa razão, formulações alternativas e novos métodos de veiculação de AB vêm sendo estudados e propostos na literatura, com o intuito de serem mais efetivos que a formulação convencional. Muitos trabalhos direcionaram seus esforços na tentativa de incorporar AB em preparações lipídicas, como lipossomos. Alguns destes estudos demonstraram que AB incorporada a lipossomos ou a emulsões

eram tão eficazes quanto DOC_AB no tratamento de infecções fúngicas em animais, sendo ainda menos tóxicas.

Entre as diversas formulações lipídicas testadas durante todos estes anos, existem três que se apresentam com maior destaque e já são aprovadas por órgãos de saúde para seu uso: a AmBisome, a ABCD e a ABLC. A AmBisome é uma preparação de vesículas pequenas (SUV), constituídas de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) e AB em razão molar de 2:1:0,8:0,4. O ABCD é uma dispersão coloidal de AB em sulfato de colestera sódica em razão molar de 1:1, formulada em partículas discóides. Já o ABLC é um complexo lipídico com AB de estrutura multilamelar “ribbon-linker” constituído de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e (DMPG) em razão molar de 7:3 com 36 mol% de AB. Estas formulações diferem na estrutura, forma, tamanho, composição lipídica e conteúdo de AB, o que fornece a elas diferentes propriedades físicas e farmacêuticas. Sendo assim, observa-se que não deve existir apenas uma característica do sistema que distinga a máxima eficiência da completa ineficiência.

Uma formulação alternativa aos sistemas acima citados foi proposta por Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001, que utilizaram-se de uma dispersão de lipídio catiônico, Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), preparado a partir do processo de sonicação. Observou-se que para este sistema, a baixas concentrações, a AB apresentava-se prioritariamente no estado monomérico. Esta propriedade tornou-se interessante, pois como acredita-se que o estado de organização monomérico não seja capaz de induzir a formação de poros em células de mamíferos, desta forma, espera-se que a formulação de DODAB sonicado (DODAB^S)_AB possa ser menos tóxica que a formulação convencional. Outra vantagem também desse sistema seria o baixo custo da formulação com relação aos outros sistemas.

Estudos anteriores (Lincopan e col., 2005) avaliaram a eficiência do tratamento de Candidíase sistêmica de ratos modelos utilizando separadamente as formulações DODAB^S_AB e DOC_AB. Eles observaram que, para doses baixas, a AB na formulação DODAB^S_AB mostrou-se tão eficiente, no combate à infecção sistêmica, quanto a formulação de DOC_AB na mesma dose. Resultado este que sinaliza positivamente para a utilização do sistema. Entretanto, estudos de toxicidade da formulação ainda não determinaram com precisão a diferença de toxicidade entre a formulação convencional e a formulação de DODAB^S, requerendo ainda mais alguns estudos, para que se possa ter maior confiabilidade. Apesar disto, o sistema DODAB^S_AB ainda apresenta-se como uma potencial formulação.

Padrão de absorção óptica e o grau de organização da AB

Como já muito discutido, a AB é uma molécula de caráter anfifílico, ou seja, apresenta simultaneamente regiões moleculares com características eletrostáticas apolares e polares. O caráter anfifílico da molécula de AB introduz uma grande diversidade de interações nos diferentes meios de dispersão. Essas interações são determinantes na modulação de diversas propriedades da molécula, como: a conformação molecular, o grau de ionização e o estado de associação molecular. O meio aquoso, essencial para vida, é um meio de muito interesse nos estudos com AB, pois todo sistema biológico está inserido em meio aquoso. Logo, torna-se inevitável o estudo dos efeitos da água sobre as características de qualquer molécula de interesse biológico. A AB em ambiente aquoso sofre modificações em algumas de suas propriedades, quando comparada com a molécula de AB isolada. A perturbação de maior interesse terapêutico é o surgimento da auto-agregação, para concentrações acima de 10^{-7} M, formando grandes sistemas moleculares (ver apêndice “A”).

A técnica de absorção óptica, há algum tempo, apresenta-se como uma ferramenta poderosa no monitoramento do estado de associação de sistemas moleculares de AB, pois observa-se que tanto as propriedades físicas do meio como o estado de associação são capazes de induzir modificações significativas nos perfis de absorção (ver apêndices “B” e “C”, respectivamente). Inúmeros estudos avaliando-se os perfis de absorção e os correspondentes estados de associação já foram realizados para a AB (Mazerski, e col., 1990; Ernst e col., 1981; Mazerski e col., 1982) em diferentes sistemas, e atualmente os padrões de resposta encontram-se bem estabelecidos na literatura.

Através de estudos comparativos entre as respostas encontradas com a técnica de absorção óptica e com dicroísmo circular (Ernst, e col., 1981), propõe-se que espectros ópticos não são sensíveis a todas as estados de associação da AB em meio aquoso, existindo grandes modificações apenas entre o espectro do monômero e os espectros dos agregados dos primeiros processos de organização. Os processos seguintes não promovem grandes modificações nos espectros de absorção óptica. Sendo assim, a AB apresenta basicamente dois tipos de perfis principais, o espectro correspondente ao estado monomérico, normalmente encontrado em solventes orgânicos, como DMSO e Metanol, e o correspondente aos primeiros estágios de agregação, o qual seria uma sub-unidade para a formação dos grandes agregados, em solventes como a água. Com o intuito de facilitar ao leitor a visualização das propriedades introduzidas anteriormente, apresentam-se na Fig.1.6 os espectros de absorção para o padrão do estado agregado e para o padrão do estado monomérico.

Fig.1.6 - Espectros de Absorção Óptica da AB, a 24 μ M, dispersa em dois solventes: água (—) e DMSO/Metanol(.....), à temperatura ambiente (23°C).

Como pode ser observado nos dois perfis apresentados na Fig.1.6, existem diferenças bem pronunciadas, destacando-se o desaparecimento das bandas vibrônicas e o deslocamento do espectro para o azul em sistemas agregados em comparação ao sistema monomérico. Estes resultados serão de extrema importância na análise dos espectros de absorção, quando a AB tiver a possibilidade de interação com sistemas lipídicos. Nestes sistemas existem evidências de diversas possibilidades de organização e estes espectros serão utilizados como unidades fundamentais na composição dos espectros da AB em dispersões lipídicas.

1.2 Anfífilos

Sais de amônio quaternário são obtidos pelo processo de exaustiva metilação, usando uma amina primária ou secundária e um cloreto de alquila. A formação de anfífilos derivados de sais de amônio quaternário ocorre com a ligação de uma ou mais cadeias alquilas ao nitrogênio. O brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) é um lipídio de sal de amônio com duas cadeias hidrocarbônicas compostas por 18 carbonos cada uma e um brometo como contra-íon (Fig.1.7) .

Fig.1.7 - Representação esquemática da estrutura química do DODAB

Os anfífilicos derivados de sais de amônio quaternário, como o DODAB, quando dispersos em água, tendem a se auto-associar, formando grandes agregados que podem assumir estruturas de bicamadas fechadas (vesículas) e com sua superfície carregada positivamente. As propriedades de organização de moléculas anfífilicas em água são determinadas por diferentes fatores do sistema. Um dos fatores importantes para a determinação da estrutura do agregado formado está relacionado à forma da molécula anfífilica, pois a razão entre a área ocupada pela região da cabeça polar e área ocupada pela região hidrofóbica pode modular a estrutura do agregado formado. Para o caso dos anfífilicos existem diversas possibilidades de estruturas que podem ser formadas. A Fig.1.8 ilustra esquematicamente algumas destas estruturas possíveis de serem formadas por agregados anfífilicos.

Fig.1.8 – Representação esquemática de algumas das possíveis estruturas formadas por agregados lipídios. A) micela, B) fase hexagonal normal, C) fase hexagonal reversa , D) vesícula unilamelar e E) vesícula multilamelar.

Propriedades termotrópicas da fase lipídica

Bicamadas lipídicas completamente hidratadas são interpretadas como uma fase termodinâmica. Esta fase, quando homogênea, ou seja, composta apenas por um tipo de lipídio, apresenta uma transição de fase termotrópica, ou seja induzida por variação de temperatura, muito bem definida. Nesta transição, as cadeias hidrocarbônicas saem de uma configuração ordenada (fase gel) para uma situação de desordem (fase fluida ou líquido-cristalina). A fase fluida é convencionalmente designada como " L_α " e a fase gel é designada como " L_β "; uma transição de fase $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ é normalmente considerada como uma transição de primeira ordem, pois a mesma gera um pico pronunciado de calor específico em um pequeno intervalo de temperatura.

A fase gel é uma fase lamelar onde os lipídios apresentam suas cadeias principalmente na forma *trans*, caracterizando uma configuração *all-trans*. O empacotamento possui uma configuração de rede bidimensional hexagonal e com restrição à rotação das moléculas ao longo do eixo principal. As cadeias podem orientar-se de forma paralela (L_β), ou inclinada à normal da bicamad ($L_{\beta'}$) ou ainda de forma interdigitada ($L_{\beta I}$), como mostrada na Fig.1.9. As diferentes orientações parecem depender das áreas ocupadas pela cabeça polar, e pelas cadeias hidrocarbônicas. Alguns sistemas lipídicos apresentam também outra fase ordenada, chamada de fase ripple ou $P_{\beta'}$, entre as fases gel e fluida. É proposto que esta fase ripple apresenta a superfície da bicamada periodicamente ondulada (Heimburg, 2000), Fig.1.9.

Fig.1.9 – Representação esquemática dos diferentes arranjos da fase gel de bicamadas lamelares. A) fase ripple ($P_{\beta'}$), B) fase gel de cadeia paralela (L_β), C) de cadeia inclinada ($L_{\beta'}$) e de cadeia interdigitada ($L_{\beta I}$).

Acima de certa temperatura (T_m), característica para cada sistema, as cadeias sofrem uma transição da conformação β ou β' para uma conformação líquida-cristalina (L_α). A L_α é uma fase que permite uma rápida difusão lateral dos lipídios, com liberdade para que as caudas sofram algumas dobras *gauche*. Normalmente na L_α os lipídios apresentam um ganho de 15-30% em sua área interfacial, tornando assim o ambiente menos empacotado (Fig.1.10)

Fig.1.10 - Representação esquemática da fase gel (L_β) e fase fluida (L_α), de bicamadas lipídicas.

Dispersões anfifílicas sonicadas

A sonicação de agregados lipídicos é um processo que através de ondas ultra-sônicas, promove a agitação dos agregados dispersos na solução. Atualmente existe um consenso na comunidade científica, e aceita-se que o primeiro efeito da sonicação sobre a estrutura de agregados lipídicos seja a ruptura dos mesmos em pequenos fragmentos de bicamada, como o ilustrado na Fig.1.11.

A proposta estrutural para o fragmento de bicamada apresentado na Fig.1.11 considera que num primeiro instante os agregados assumem uma estrutura planar discoidal de bordas laterais abertas, ou seja, pequenas bicamadas com as caudas hidrocarbônicas dos lipídios de borda em contato direto com o meio aquoso. O contato entre a água e algumas caudas hidrocarbônicas do agregado torna a energia livre do sistema mais positiva, consequência do aumento da interação hidrofóbica, e sinaliza que uma estrutura como esta não deve corresponder a uma situação de estabilidade do sistema. Logo, considera-se que as bordas livres dos fragmentos de bicamada devem ser estruturas de difícil observação experimental, pois na condição de estabilidade do sistema espera-se que as mesmas desapareçam.

Fig.1.11 – Representação esquemática de um fragmento de bicamada lipídica, obtido por sonicação, e no qual apresenta suas bordas laterais em contato com a água. Nesta figura a região das cabeças polares é representada pela região vermelha, e as cadeias hidrocarbônicas são representadas pela região cinza. [figura disponível em:< <http://www.chemistry.emory.edu/faculty/kindt/molecular.htm>>]

Uma proposta de como as bordas dos fragmentos poderiam ser eliminadas pelo sistema, é considerar a possibilidade de reorientação de alguns lipídios do agregado, os quais posicionariam suas cabeças polares num arranjo molecular que reduzia o contato da água com as caudas hidrocarbônicas, como o ilustrado na Fig.1.12. Entretanto, esta nova região ocupada pelos lipídios não deve possuir a mesma ordem molecular que o centro do agregado, mas sim, deve ser uma região de baixo empacotamento, similar ao de uma micela.

Fig.1.12 - Representação esquemática da possível redistribuição espacial dos lipídios, na tentativa de reduzir a área hidrofóbica exposta à água e assim atingir uma condição mais estável.[figura disponível em: <http://www.chemistry.emory.edu/faculty/kindt/molecular.htm> >]

Outra proposta para a forma que o agregado sonificado atinge em condições mais estáveis, considera a possibilidade de auto-associação ou fusão dos fragmentos. A auto-associação dos fragmentos proporciona ao sistema a possibilidade da formação de extensas folhas lamelares, que poderiam dobrar-se e formar vesículas fechadas.

É interessante notar que ambas as propostas citadas acima não excluem a possibilidade da ocorrência simultânea dos dois efeitos, o que torna o entendimento do sistema um pouco mais complicado. Sabe-se também que a condição final de estabilidade do sistema lipídico sonificado é uma propriedade dependente de uma série de fatores, como: composição lipídica, força iônica do meio, protocolo de preparação, etc. Então cada sistema pode assumir configurações completamente diferentes. Entretanto, apesar desta grande variedade de comportamento entre os diferentes sistemas sonificados, é possível ilustrar esquematicamente o comportamento geral do sistema sonificado (Fig.1.13).

Fig.1.13 - Representação esquemática do processo de formação de vesículas a partir de fragmentos de bicamada. Espontaneamente um filme lipídico, quando hidratado, tende a formar vesículas multilamelares (MLV). Porém, através do processo de sonicação, pode-se transformar o sistema de MLV's um sistema de pequenos fragmentos de bicamada (1). Estes fragmentos, na busca por estabilidade, tendem a fundir e formar fragmentos maiores (2), que por sua vez podem curva-se e formar vesícula unilamelares pequenas (SUV) , ou continuar crescendo e formar fragmentos ainda maiores (3). Esses fragmentos crescem até atingir um tamanho crítico, no qual, inevitavelmente acabam curvando-se e formando as vesículas unilamelares grandes (LUV). [figura extraída de (Lasic, 1988)]

Dispersões de DODAB sonicado (DODAB^S)

Para este trabalho, o sistema de interesse é o lipídio catiônico DODAB. A estrutura estável assumida por dispersões de DODAB sonicado em meio aquoso há muito já vem sendo estudada. Entretanto, apesar do grande investimento neste sistema, ainda não se tem um consenso pleno quanto às características estruturais do mesmo, onde há diversas discussões e propostas na literatura. Com o intuito de exemplificar algumas destas discussões existentes, apresenta-se a seguir uma pequena revisão da literatura.

Inicia-se pelo trabalho de Pansu e col. (1990) os quais, utilizando-se da técnica de espalhamento de luz, propuseram que dispersões de DODAC (que possui uma estrutura muito semelhante ao do DODAB, diferindo apenas no cloreto como contra-íon) sonicado são principalmente compostos por fragmentos de bicamada. Feitosa e Brown (1997), utilizando-se de dispersões de DODAB sonicado por banho acima da T_m , indicaram que este sistema apresenta distribuição de tamanho bimodal, onde partículas com raio hidrodinâmico de 20 nm seriam vesículas, e partículas com raio de 6 nm seriam fragmentos. Andersson e col.(1995), por sua vez, através de fotos obtidas com a técnica de crio-TEM (Fig.1.14) indicaram que as dispersões de DODAB sonicado podem ser compostas por fragmentos de bicamadas, mas também por vesículas grandes (100 nm de diâmetro) e com curvaturas anômalas.

Benatti C.R. e col. (2001), com a técnica de ressonância paramagnética eletrônica, propuseram que a dispersão de DODAB sonicado é composta por agregados que possuem regiões com diferentes graus de organização das caudas hidrocarbônicas, ou seja, parte dos lipídios estaria em regiões com alto grau de empacotamento e parte estaria em regiões com baixo grau de empacotamento, mesmo quando observados a temperaturas abaixo da T_m . E esse resultado então sinalizou para a existência de fragmentos de bicamada no sistema, ou vesículas muito pequenas, onde os lipídios não se organizam em fase gel. Cocquyt J. e col. (2004), utilizando-se da técnica de ressonância magnética nuclear, confirmaram a existência de frações de lipídios em fases ordenadas e frações em fase desordenadas, para as dispersões de DODAB sonicado, porém, através das fotos de crio-TEM, puderam afirmar que não é possível descartar a possibilidade da existência de pequenas vesículas no estado fluido.

Fig.1.14 - Foto obtida a partir da técnica de microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Crio-TEM), de uma dispersão de 10 mM de DODAB sonificado vitrificada a partir de 25°C. A barra no lado direito superior da imagem representa 100 nm de tamanho.[foto extraída de (Andersson e col., 1995)]

1.3 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi tentar avaliar, numa visão estrutural, as propriedades e peculiaridades envolvidas na interação da AB com as dispersões de DODAB. Neste trabalho, centrou-se no estudo de dispersões de DODAB, sonicadas (DODAB^S) e não sonicadas (DODAB^{NS}), onde o antibiótico estivesse, principalmente, na forma monomérica, tendo em vista a proposta baixa toxicidade da AB enquanto monômero.

Para avaliar estes sistemas utilizaram-se as técnicas de Absorção Óptica, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de marcadores de spin incorporados nos agregados lipídicos.

2. Técnicas experimentais

2.1 Absorção Óptica

(Bransden e Joachain, 1983; Atkins e Friedman, 1997; Klessinger e Michl, 1995; Rohatgi-Mukherjee 1978)

A espectroscopia de absorção óptica é uma técnica que compara as diferenças entre as intensidades de um feixe luz transmitido através de um material qualquer com a intensidade incidente ao mesmo e, a partir desta diferença, determina o quanto foi absorvido pelo material. A absorção de radiação por um átomo ou molécula ocorre quando um feixe de luz é capaz de promover transições entre níveis energia do sistema. O intervalo de energia associado à radiação ultra-violeta e visível encontra-se na faixa de energia dos estados eletrônicos da matéria, ou seja, a radiação UV-Visível transporta energia suficiente para promover transições entre os estados eletrônicos do meio.

O estudo das transições entre os diferentes estados eletrônicos de um átomo ou molécula é interessante, pois sabe-se que os estados eletrônicos são extremamente dependentes dos potenciais eletromagnéticos existentes no microambiente em que a molécula ou átomo está inserido; logo, tem-se que a partir do estudo das transições eletrônicas é possível obter informações sobre o comportamento dos potenciais locais do sistema. Para o sistema de interesse deste trabalho, a molécula de AB, observa-se que a técnica de absorção óptica é uma poderosa ferramenta no monitoramento do seu estado de associação nos diferentes meios.

Aspectos teóricos - tratamento clássico da absorção de luz

A absorção óptica é um efeito caracterizado como a transferência de energia de um feixe de luz a um meio qualquer. Na visão clássica, um feixe de luz é constituído por um conjunto de ondas eletromagnéticas que se propagam no espaço transportando energia em seus campos elétrico e magnético. A quantidade de energia eletromagnética transportada por um feixe de luz pode ser avaliada através de uma grandeza conhecida como intensidade. A intensidade (I) de uma onda é definida como a quantidade de energia transportada por unidade de tempo por unidade de área. Com esta definição de intensidade espera-se que o efeito da transferência de energia do feixe de luz a um meio qualquer possa ser avaliada através do monitoramento da intensidade do mesmo, pois uma

variação na energia transportada pelo feixe será detectada pela diminuição na sua intensidade. Estudos antigos obtiveram resultados empíricos, relacionando a diminuição da intensidade do feixe com algumas propriedades macroscópicas do meio, que são determinantes para o grau de absorção do mesmo. Um dos primeiros estudos publicados foi realizado por Johann Heinrich Lambert, em 1760, que propôs que um feixe de luz monocromático colimado de intensidade (I) quando atravessa um material absorvedor seria atenuado, tal que a fração da luz incidente absorvida por esse material independeria da intensidade do feixe incidente, sendo apenas proporcional à espessura de material percorrido e proporcional a uma constante que depende de propriedades do material. A proposta de Lambert pode ser expressa como:

$$-\frac{dI}{I} = \alpha dL \quad \text{Eq.(2.1)}$$

Considera-se “ dI ” a variação na intensidade do feixe incidente, “ I ” a intensidade do feixe incidente, “ α ” a constante de proporcionalidade (que depende do material) e “ dL ” o caminho percorrido pelo feixe no material. Tempos depois de Lambert, August Beer, em 1852, propôs que a fração do feixe incidente absorvida por um dado material seria proporcional à concentração de absorvedores presentes no meio. Esta proposta fornece uma nova relação complementar ao decréscimo da intensidade do feixe, e que é expressa como:

$$-\frac{dI}{I} = \beta dC \quad \text{Eq.(2.2)}$$

Na relação acima “ β ” é uma constante de proporcionalidade dependente do meio e “ dC ” a variação do número de moléculas por unidade de volume no meio. Como pode ser constatado, ambas as propostas, Eq.(2.1) e Eq.(2.2), dependem de uma constante de proporcionalidade, que é atribuída apenas a propriedades do meio. Logo, pode-se imaginar que estas constantes devam estar correlacionadas, pois afinal avaliam o mesmo material. Quando se combina a expressão de Lambert com a de Beer, e considera-se uma situação onde a concentração “ C ” do meio seja fixa, pode-se escrever:

$$-\frac{dI}{I} = \varepsilon' C dL \quad \text{Eq.(2.3)}$$

Observa-se em Eq.(2.3) que uma nova constante “ ε ” surgiu na relação das constantes. Essa nova constante ainda depende de propriedades do meio, mas agora é independente da concentração e caminho óptico, pois estas já estão sendo consideradas explicitamente. Integrando a relação Eq. (2.3), para o caminho “ L ” percorrido pela luz, encontra-se como solução a expressão Eq.(2.4).

$$I = I_0 e^{-\varepsilon' C L} \quad \text{Eq.(2.4)}$$

Considerou-se “I” a intensidade do feixe transmitido, “I₀” a intensidade do feixe incidente, “ε’” a constante conhecida como coeficiente de absorção, “C” a concentração de absorvedores do meio e “L” o caminho percorrido pelo feixe no material, ou mais comumente chamado de caminho óptico. A expressão obtida em Eq.(2.4) é conhecida como Lei de Lambert-Beer, e é utilizada em experimentos de absorção óptica até os dias atuais.

Em experimentos de Absorção Óptica os resultados são apresentados em função de uma grandeza conhecida como Absorbância. A Absorbância é uma grandeza adimensional definida como:

$$A = \log(I_0/I) \quad \text{Eq.(2.5)}$$

Através da definição de Absorbância Eq.(2.5), pode-se então encontrar uma relação com a Lei de Lambert-Beer Eq.(2.4):

$$A = \frac{\varepsilon'}{2.303} C L \quad \text{Eq.(2.6)}$$

Considerando-se $\varepsilon = \varepsilon' / 2.303$, pode-se reescrever a Eq.(2.6) como:

$$A = \varepsilon C L \quad \text{Eq.(2.7)}$$

Na Eq.(2.7) a grandeza “ε” é conhecida como coeficiente de absorção molar, quando “C” é definida em mol/L. Para que a relação Eq.(2.7) seja válida, existem algumas condições que devem ser satisfeitas. Uma condição seria garantir que a concentração de absorvedores seja pequena o suficiente para que as moléculas possam ser consideradas independentes e o grau de absorção pequeno, de forma a garantir que a probabilidade de absorção seja homogênea em todo meio. Uma segunda condição seria que os absorvedores devem estar homogeneamente distribuídos no volume de interação e não deve possuir efeitos de espalhamento, reflexão e refração. Outra condição seria que o feixe incidente deve consistir de raios paralelos, os quais atravessam a mesma espessura de material, e deve ser monocromático. A última condição seria que o fluxo incidente não deve perturbar as características fundamentais dos átomos ou moléculas que compõem o meio absorvedor, comportando-se apenas como uma sonda não invasiva.

Aspectos teóricos - tratamento quântico da absorção de luz

O tratamento apresentado até o momento é um tratamento puramente clássico, que avalia as propriedades de absorção óptica do meio através de grandezas macroscópicas (ϵ , C , L). Com o surgimento da Mecânica Quântica, novas formulações foram elaboradas e uma nova roupagem foi introduzida aos modelos de absorção. Uma destas propostas foi elaborada por Einstein, em 1917, que interpretou o efeito da absorção de radiação como sendo consequência da transição entre estados de energia de um sistema. Einstein definiu uma taxa de transição entre dois estados de energia do sistema como sendo proporcional à densidade de energia da radiação incidente, e a um fator de proporcionalidade característico do meio em questão, Eq.(2.8).

$$W_{b \leftarrow a} = B'_{ba} \rho_{rad}(\nu_{ba}) \quad \text{Eq.(2.8)}$$

Em Eq.(2.8), “ $W_{b \leftarrow a}$ ” é a taxa de transição entre os estados “a” e “b” induzida no sistema, “ B'_{ba} ” um fator de proporcionalidade e “ ρ_{rad} ” a densidade de energia de radiação com frequência “ ν_{ba} ”.

A justificativa para a proposta de Einstein pode ser compreendida a partir de alguns conceitos relativamente simples, como discutido abaixo. Inicia-se então encontrando a taxa de transição entre dois estados induzida por um feixe de luz, através da regra de ouro de Fermi, Eq.(2.9), que é obtida a partir da teoria de perturbação dependente do tempo e determina a taxa da probabilidade de transição entre estados de um sistema na presença de uma perturbação.

$$W_{b \leftarrow a} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_b | H' | \Psi_a \rangle|^2 \rho_b(E_b) \quad \text{Eq.(2.9)}$$

“ H' ” é a hamiltoniana do termo perturbativo independente do tempo e “ ρ_b ” é a densidade de estados do sistema com energia de “ E_b ”. Considerando agora que a interação entre a onda eletromagnética (E.M.) e o meio pode ser aproximada por uma energia de interação com dipolo, tem-se que a hamiltoniana de interação pode ser definida como:

$$H(t) = \vec{\mu} \circ \vec{E} \quad \text{Eq.(2.10)}$$

Ou

$$H(t) = \vec{\mu} \circ [E_0 e^{i(kr - \omega t)} \hat{\epsilon}] \quad \text{Eq.(2.11)}$$

Então:

$$H(t) = E_0 (\vec{\mu} \circ \hat{\epsilon}) e^{i k r} e^{-i \omega t} \quad \text{Eq.(2.12)}$$

Onde “ $\hat{\epsilon}$ ” é o versor direção do campo elétrico e “ $\vec{\mu}$ ” o momento de dipolo elétrico que caracteriza a matéria. Definindo agora “ H ” como sendo $H' = E_0(\vec{\mu} \circ \hat{\epsilon}) e^{i k r}$, é possível reescrever a regra de ouro de Fermi Eq.(2.9) como:

$$W_{b \leftarrow a} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_b | (\vec{\mu} \circ \hat{\epsilon}) e^{i k r} | \Psi_a \rangle|^2 E_0^2 \rho_b(E_b) \quad \text{Eq.(2.13)}$$

Considerando então um sistema de apenas dois níveis, ou seja, $\rho_b = 1$, Tem-se que a Eq.(2.13) torna-se:

$$W_{b \leftarrow a} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_b | (\vec{\mu} \circ \hat{\epsilon}) e^{i k r} | \Psi_a \rangle|^2 E_0^2 \quad \text{Eq.(2.14)}$$

Como o interesse está em descrever transições induzidas pela luz visível em um átomo ou molécula, e sabendo que as dimensões destes são muito inferiores ao comprimento de onda da luz utilizada, é possível então considerar que o termo $Kr \ll 1$, o que permite expandir a exponencial $e^{i k r}$ em torno do zero e escrever Eq.(2.14) como:

$$W_{b \leftarrow a} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_b | (\vec{\mu} \circ \hat{\epsilon}) | \Psi_a \rangle|^2 E_0^2 \quad \text{Eq.(2.15)}$$

Assumindo que a onda E.M. incidente seja uma onda despolarizada, de forma que o produto escalar entre o momento de dipolo elétrico e a direção do campo elétrico assuma um valor médio de $\frac{1}{3} |\vec{\mu}|$, encontra-se que:

$$W_{b \leftarrow a} = \frac{2\pi^2}{3 \hbar^2} |\langle \Psi_b | \mu | \Psi_a \rangle|^2 E_0^2 \quad \text{Eq.(2.16)}$$

Considerando:

$$B_{ba} = \frac{2\pi^2}{3 \hbar^2} |\langle \Psi_b | \mu | \Psi_a \rangle|^2 \quad \text{Eq.(2.17)}$$

Tem-se que:

$$W_{b \leftarrow a} = B_{ba} E_0^2 \quad \text{Eq.(2.18)}$$

Observa-se aí que a taxa de probabilidade de transição dependente da amplitude do campo elétrico ao quadrado. Entretanto, na formulação de Einstein a taxa de probabilidade de transição aparece com uma dependência explícita da densidade de energia de radiação. Sendo assim, torna-se necessário demonstrar a relação entre a amplitude do campo elétrico da radiação incidente e a

densidade de energia da mesma. Inicia-se então, a partir da definição de densidade de energia (energia/volume) contida nos campos elétrico e magnético de um sistema qualquer, Eq.(2.19).

$$u = \frac{1}{2} \left(\epsilon_0 E^2 + \frac{1}{\mu_0} B^2 \right) \quad \text{Eq.(2.19)}$$

“E” e “B” são os campos elétrico e magnético da onda E.M. Considerando agora a radiação incidente uma onda plana, tem-se que:

$$u = \frac{1}{2} \left(\epsilon_0 E_0^2 e^{2i(k \cdot r - \omega t)} + \frac{1}{\mu_0} \frac{E_0^2}{c^2} e^{2i(k \cdot r - \omega t)} \right) \quad \text{Eq.(2.20)}$$

Tomando a média sobre um período completo da onda, observa-se que:

$$\rho_{rad}(\nu) = \langle u \rangle_T = \frac{1}{2} \epsilon_0 E_0^2 \quad \text{Eq.(2.21)}$$

A fórmula acima corresponde à relação entre a densidade de energia de radiação e a amplitude do campo elétrico. Utilizando agora a definição da intensidade de uma onda eletromagnética, torna-se possível dizer que:

$$I = \langle |\vec{S}| \rangle_T \quad \text{Eq.(2.22)}$$

“ $\langle |\vec{S}| \rangle_T$ ” representa a média sobre um período completo do módulo do vetor de Poynting. Considerando que a onda E.M. seja uma onda plana composta por um campo elétrico do tipo $\vec{E} = E_0 e^{i(k \cdot r - \omega t)} \hat{e}$, a intensidade é obtida através de:

$$I = \frac{1}{2} \epsilon_0 c E_0^2 \quad \text{Eq.(2.23)}$$

Onde “ ϵ_0 ” é permissividade elétrica e “c” velocidade de propagação da luz. Portanto, a partir da Eq.(2.23) é possível dizer que:

$$\rho_{rad}(\nu) = \langle u \rangle_T = \frac{1}{2} \epsilon_0 E_0^2 = \frac{I(\nu)}{c} \quad \text{Eq.(2.24)}$$

Então, substituindo o resultado da Eq.(2.24) na Eq.(2.18), tem-se que:

$$W_{b \leftarrow a} = B'_{ba} \rho_{rad}(\nu_{ba}) = B'_{ba} \frac{I(\nu_{ba})}{c} \quad \text{Eq.(2.25)}$$

Obtém-se assim o resultado proposto por Einstein na Eq.(2.8). Está definido o coeficiente B'_{ba} , comumente chamado de coeficiente de Einstein para a absorção estimulada, como a probabilidade de transição entre dois estados “a” e “b”.

Este resultado encontrado por Einstein interpreta o mesmo efeito analisado classicamente por Lamber-Beer, e que se demonstrou satisfatório em muitas situações. A existência de dois modelos distintos propõe a necessidade de uma conexão entre os dois resultados que mantenha as duas formulações consistentes.

Aspectos teóricos – conexão entre o tratamento clássico e o tratamento quântico

Primeiramente defini-se a taxa de variação da energia da radiação quando a mesma interage com um meio absorvedor, Eq.(2.26).

$$\frac{dU_d}{dt} = h \nu_{ba} N W_{ba} \quad \text{Eq.(2.26)}$$

Considera-se que “ $h\nu_{ba}$ ” é a energia do fóton que compõe a radiação, “ N ” representa o número de moléculas capazes de absorver a radiação de frequência “ ν_{ba} ” e “ W_{ba} ” a taxa de transição. Considerando que quando um feixe de luz atravessa um material qualquer a potência de radiação absorvida (P_d) será a diferença entre a potência incidente (P_i) e a potência emergente (P_e) do material,

$$P_i - P_e =_{abs} \quad \text{Eq.(2.27)}$$

e sabendo que a potência absorvida por um meio é definida como a taxa de variação da energia eletromagnética absorvida por esse meio, pode-se então igualar a Eq.(2.26) à Eq.(2.27), fornecendo:

$$P_i - P_e = h \nu_{ba} N W_{ba} \quad \text{Eq.(2.28)}$$

A partir da definição de intensidade $I = P/A$, sendo “ A ” a área de incidência do feixe de luz, tem-se que a Eq.(2.28) pode ser reescrita como:

$$A (I_i - I_e) = h \nu_{ba} N W_{ba} \quad \text{Eq.(2.29)}$$

Considerando agora que o feixe de luz atravessa apenas uma pequena espessura “ dL ” do material, tornando a diferença de intensidade uma grandeza pequena “ dI ”, logo, Eq.(2.29) torna-se:

$$-dI = h \nu_{ba} \frac{N}{A} W_{ba} \quad \text{Eq.(2.30)}$$

Definido que “C” seja o número de absorvedores por unidade de volume ($\Delta V = A dL$),pode-se dizer que:

$$-dI = h \nu_{ba} C W_{ba} dL \quad \text{Eq.(2.31)}$$

Considerando agora “ W_{ba} ” como sendo a taxa de transição conforme proposto na Eq.(2.25), tem-se que:

$$-dI = h \nu_{ba} C B_{ba} \frac{I(\nu_{ba})}{c} dL \quad \text{Eq.(2.32)}$$

Ou ainda:

$$-\frac{dI}{I} = \frac{1}{c} h \nu_{ba} C B_{ba} dL \quad \text{Eq.(2.33)}$$

Comparando então o resultado da Eq.(2.33) com o obtido na lei de Lambert-Beer Eq.(2.3):

$$-\frac{dI}{I} = \varepsilon' C dL$$

tem-se que,

$$\varepsilon' C = h \nu_{ba} C \frac{B'_{ba}}{c} \quad \text{Eq.(2.34)}$$

ou ainda;

$$\frac{\varepsilon'}{\nu_{ba}} = h \frac{B_{ba}}{c} \quad \text{Eq.(2.35)}$$

Sabendo que $\varepsilon = \varepsilon' / 2.303$, tem-se que:

$$\varepsilon' = h \nu_{ba} \frac{B_{ba}}{2.303 c} \quad \text{Eq.(2.36)}$$

Com este resultado conclui-se que a conexão entre os dois modelos ocorre através da definição do coeficiente de extinção molar como uma grandeza associada ao coeficiente de Einstein, que por sua vez está associado à densidade de probabilidade de transição entre os estados envolvidos.

2.2 Turbidez

(Hiemenz, 1986)

Até o presente momento, a discussão realizada (item 2.1) baseou-se em avaliar a atenuação de um feixe de luz por consequência do efeito de absorção de luz por um meio qualquer, porém, existem outros efeitos associados à interação do feixe de luz com um meio que podem promover atenuação. A turbidez é uma grandeza que avalia a atenuação de um feixe de luz como consequência do espalhamento de luz. O efeito de espalhamento de luz é um efeito com propriedades diferentes às da absorção, pois o espalhamento é caracterizado como um efeito de dispersão da energia transportada por um feixe nas diferentes direções.

Em 1881 Lord Rayleigh publicou um trabalho teórico sobre espalhamento de luz por partículas de tamanhos menores que o comprimento de onda da luz incidente. Este tipo de espalhamento ficou conhecido como espalhamento Rayleigh. Após a teoria de Rayleigh, outras aproximações foram propostas com o intuito de descrever o espalhamento de luz em sistemas de partículas com tamanho da ordem do comprimento de onda da luz incidente, e atualmente é aceito que a quantidade de luz espalhada de um feixe incidente depende de algumas propriedades das entidades espalhadoras, como: (1) índice de refração do meio, (2) massa, (3) tamanho e forma, (4) interações mútuas e (5) polidispersidade.

O uso da turbidez no estudo de propriedades de dispersões lipídicas é um tópico vastamente explorado, com diversas propriedades e aplicações relatadas na literatura. Uma das grandes aplicações da turbidez, em sistemas lipídicos, está no monitoramento do tamanho e forma dos agregados formados, sendo capaz de fornecer informações precisas quanto ao estado de organização dos agregados. A dependência da turbidez com o tamanho das partículas espalhadoras não serão discutidas neste item; para maiores informações, ver apêndice E.

Aspectos Teóricos

A turbidez é definida como a razão entre a intensidade total de luz espalhada pela intensidade total de luz incidente, abaixo apresentada:

$$\tau = \frac{I_e}{I_0} \quad \text{Eq.(2.37)}$$

Essa razão é interpretada como a soma das razões de todos os ângulos de espalhamento possíveis, Eq.(2.38).

$$\frac{I_e}{I_0} = \sum_{\text{ângulos}} \frac{i_e}{I_0} \quad \text{Eq.(2.38)}$$

Como os equipamentos de medição de turbidez possuem um arranjo experimental semelhante aos equipamentos de Espectrofotômetro, torna-se possível a realização de experimentos de turbidez em equipamentos de Espectrofotômetro, que mede absorvância. A absorvância obtida em equipamentos de Espectrofotômetro é definida como:

$$A = -\log \left(\frac{I_T}{I_0} \right) \quad \text{Eq.(2.39)}$$

“ I_T ” a intensidade de luz transmitida. A grandeza absorvância se relaciona à turbidez de maneira relativamente simples, bastando combinar as equações Eq.(2.37) e Eq.(2.39). Para tanto, primeiramente considera-se um sistema que não absorva luz, mas proporciona espalhamento em diferentes direções. Nestas condições, a intensidade de luz transmitida pode ser caracterizada como a intensidade de luz incidente menos a intensidade total de luz espalhada, “ I_e ”, em todas as direções:

$$I_T = I_0 - I_e \quad \text{Eq.(2.40)}$$

Sendo assim, com essa relação é possível reescrever a Eq.(2.39) como:

$$A = -\log \left(\frac{I_0 - I_e}{I_0} \right) = -\log \left(1 - \frac{I_e}{I_0} \right) \quad \text{Eq.(2.41)}$$

Considerando que o sistema observado seja uma solução diluída composta de pequenas partículas espalhadoras, é possível reescrever a Eq.(2.41) como:

$$A = -\log \left(1 - \frac{I_e}{I_0} \right) = \frac{1}{2.303} \ln \left(1 - \frac{I_e}{I_0} \right) \simeq \frac{1}{2.303} \frac{I_e}{I_0} \simeq \frac{1}{2.303} \tau \quad \text{Eq.(2.42)}$$

A Eq.(2.42) representa a relação entre a grandeza absorvância e a turbidez.

2.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

(Lamy-Freund, 1998; Atherton, 1993)

A técnica de RPE de radicais nitróxido, os chamados marcadores de spin, tem sido largamente usada no monitoramento da viscosidade de membranas lipídicas modelos e naturais. O espectro de RPE é sensível a movimentos na faixa de 10^{-7} s a 10^{-11} s, permitindo o marcador de spin diferenciar regiões de diferentes empacotamentos, caso a molécula tenha movimento com tempos de correlação nesta faixa de sensibilidade. Além disso, devido à assimetria do radical nitróxido, seu espectro de RPE é também sensível ao ordenamento da região onde ele se encontra.

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica interessada em observar a interação de um sistema de dipolos magnéticos com um campo magnético externo. A aplicação de um campo magnético externo a um sistema de dipolos favorece o alinhamento destes em uma dada direção. Esse alinhamento, atingido inicialmente, pode ser perturbado aplicando-se um segundo campo magnético com características distintas (intensidade, direção, variação com o tempo) ao primeiro. A observação das perturbações ocorridas no sistema, devido à combinação destes dois campos, consiste na informação de interesse desta técnica.

Interação Zeeman

Um sistema atômico ou molecular possui sua propriedade magnética associada à presença dos momentos de dipolo magnético. Esses dipolos são consequência direta dos momentos de spin e dos momentos angulares orbitais presentes no átomo. Um momento de dipolo magnético atômico resultante é consequência da combinação de todos momentos presentes no sistema. Normalmente, esta combinação assume valores nulos, porém existem situações em que esta combinação não é nula, e quando isso ocorre caracteriza a existência de spin desemparelhado. Quando um sistema apresenta uma configuração não nula, pode-se então aproximar as propriedades magnéticas do sistema às propriedades do spin desemparelhado.

A técnica de RPE permite a observação das propriedades magnéticas associadas aos spins eletrônicos do meio, não avaliando diretamente o comportamento dos spins nucleares. Uma propriedade magnética associada ao estado de spin de um sistema é o momento de dipolo magnético, o qual se relaciona com o spin eletrônico através de uma relação como a Eq.(2.43).

$$\vec{\mu} = -g_e \beta \vec{S} \quad \text{Eq.(2.43)}$$

Na Eq.(2.43) considera-se “ g_e ” o fator giromagnético eletrônico e “ β ” o magneton de Bohr. Quando um átomo qualquer, com momento de dipolo resultante $\vec{\mu}$ não nulo é submetido à presença de um campo magnético estático $\vec{H}$, surge no sistema atômico uma energia potencial de interação entre as duas entidades, que classicamente seria descrita como:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad \text{Eq.(2.44)}$$

Porém, na Mecânica Quântica essa energia de interação deve ser descrita no formalismo Hamiltoniano, onde as grandezas envolvidas são substituídas por seus operadores correspondentes. Considerando uma situação simples onde o campo magnético está interagindo apenas com um elétron livre, a Hamiltoniana ($\mathcal{H}_e$) do sistema seria descrita como uma expressão conhecida como interação Zeeman :

$$\mathcal{H}_e = g_e \beta \vec{S} \cdot \vec{H} \quad \text{Eq.(2.45)}$$

Assumindo agora que o campo magnético $\vec{H}$ seja um campo uniforme na direção $\hat{z}$, tem-se que o produto escalar presente em Eq.(2.45) se simplifica e a Hamiltoniana ($\mathcal{H}_e$) torna-se:

$$\mathcal{H}_e = g_e \beta S_z H_0 \quad \text{Eq.(2.46)}$$

Tem-se então “ H_0 ” representando a amplitude do campo $\vec{H}$. A expressão da Eq.(2.46) constitui a Hamiltoniana do sistema onde um elétron livre de momento de dipolo $\vec{\mu}$ interage com um campo $\vec{H}$ na direção $\hat{z}$. A partir da Hamiltoniana, Eq.(2.46), é possível encontrar as funções de estado do sistema e as energias de cada estado, bastando resolver a equação de Schrödinger. O resultado para a auto-energia do sistema é definida como:

$$E = g_e \beta H_0 M_s \quad \text{Eq.(2.47)}$$

Dependendo explicitamente do número quântico de spin “ M_s ”. Como o elétron tem o valor de $S=1/2$, M_s pode-se assumir valores $+1/2$ e $-1/2$, desta forma as auto-energias do sistema são descritas por:

$$E_- = -\frac{1}{2} g_e \beta H_0 \quad \text{ou} \quad E_+ = \frac{1}{2} g_e \beta H_0 \quad \text{Eq.(2.48)}$$

Onde considerou-se todos o momentos angulares como $\vec{J}/\hbar$.

Assim demonstra-se que o sistema pode assumir apenas dois estados de energia, E_- e E_+ . Qualitativamente, consideram-se estes dois estados como sendo as duas possibilidades de orientação do spin eletrônico com o campo magnético externo, paralela e antiparalela ao mesmo. Observa-se que ambas as energias dependem da intensidade do campo magnético externo, indicando que quanto maior o campo, maior será a energia de orientação. Considerando que para esse sistema, sob a presença deste campo magnético estático, seja possível promover transições entre os estados de spin através da aplicação de uma radiação eletromagnética, pode-se imaginar que a energia da radiação necessária para promover esta transições deva ser:

$$\Delta E = g_e \beta H_0 = h\nu \quad \text{Eq.(2.49)}$$

Portanto, a Eq.(2.49) corresponde à condição básica de ressonância para um elétron livre, em que a radiação eletromagnética é capaz de promover transições entre os estados de spin eletrônico, ou seja, a aplicação de um campo magnético estático a um sistema de spin faz surgir orientações preferenciais que podem ser perturbadas através da aplicação de uma radiação eletromagnética com energia correspondente à diferença de energia entre os estados. Esse então corresponde ao princípio da técnica de RPE que observa as alterações produzidas por uma radiação nas orientações preferenciais dos spins.

Até o presente momento, o tratamento teórico empregado considerou apenas a situação para um elétron livre. Entretanto, quando se deseja analisar um elétron ligado a um átomo, e que assume um momento angular orbital, torna-se necessário levar em consideração o acoplamento spin-órbita, o que acaba impondo uma nova expressão para Hamiltoniana eletrônica, que é representa por:

$$\mathcal{H}_{spin} \simeq \sum_{\alpha\beta} \{ \beta [g_e \delta_{\alpha\beta} + 2\lambda \Lambda_{\alpha\beta}] H_\alpha S_\beta \} \quad \text{Eq.(2.50)}$$

que pode ser reescrita como:

$$\mathcal{H}_{spin} \simeq \beta \vec{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \vec{S} \quad \text{Eq.(2.51)}$$

Representando assim a Hamiltoniana já com a contribuição do acoplamento spin-órbita. Porém, agora o fator $\mathbf{g}$ não corresponde mais a um escalar e sim a um tensor.

Interação hiperfina

É sabido que qualquer momento de dipolo magnético tem associado a ele um campo magnético como o da Eq.(2.52).

$$\vec{B}_{dip} \propto \frac{1}{r^3} [3 \cdot (\vec{\mu} \circ \hat{r}) \hat{r} - \vec{\mu}] \quad \text{Eq.(2.52)}$$

Este campo magnético depende da intensidade do momento $\vec{\mu}$ e da distância $\vec{r}$ de observação com relação ao dipolo. Quando se assume uma situação em que o momento $\vec{\mu}$ é resultado da presença de um momento de spin $\vec{I}$, como descrito na Eq.(2.44), espera-se que o campo magnético $\vec{B}_{dip}$ assumira uma estrutura como:

$$\vec{B}_{dip} \propto g_N \beta_N \frac{1}{r^3} [3 \cdot (\vec{I} \circ \hat{r}) \hat{r} - \vec{I}] \quad \text{Eq.(2.53)}$$

Em que agora surge “ g_N ” como um momento giromagnético do núcleo e “ β_N ” como um magneton de Bohr do núcleo. Esse então seria o campo magnético gerado por um momento de spin $\vec{I}$. Um elétron, quando ligado a um núcleo, está sujeito aos campos elétricos e magnéticos gerados por ele. O campo magnético gerado por um núcleo e sentido pelo elétron pode ser aproximado por um campo de dipolo magnético como o da Eq.(2.53), e a presença deste campo promove o surgimento de uma energia de interação magnética com o elétron; que pode ser descrita por:

$$E = -\vec{\mu}_e \circ \vec{B}_{dip} \Rightarrow E = g_e \beta g_N \beta_N \vec{S} \circ \left\{ \frac{1}{r^3} [3 \cdot (\vec{I} \circ \hat{r}) \hat{r} - \vec{I}] \right\} \quad \text{Eq.(2.54)}$$

ou ainda;

$$E = g_e \beta g_N \beta_N \left[\frac{3 \cdot (\vec{I} \circ \vec{r}) \cdot (\vec{S} \circ \vec{r})}{r^5} - \frac{(\vec{I} \circ \vec{S})}{r^3} \right] \quad \text{Eq.(2.55)}$$

Considerando “ $\vec{I}$ ”, “ g_N ” e “ β_N ” grandezas associadas às propriedades nucleares. Partindo para a descrição quântica desta interação, a Hamiltoniana pode ser definida como:

$$\mathcal{H}_{hip} = g_e \beta g_N \beta_N \left[\frac{3 \cdot (\vec{I} \circ \vec{r}) \cdot (\vec{S} \circ \vec{r})}{r^5} - \frac{(\vec{I} \circ \vec{S})}{r^3} + \frac{8\pi}{3} (\vec{I} \circ \vec{S}) \cdot \delta(\vec{r}) \right] \quad \text{Eq.(2.56)}$$

Agora surge um terceiro termo que não aparece na descrição clássica que representa a interação de contato de Fermi, sendo “ $\delta(r)$ ” uma função delta de Dirac. Essa Hamiltoniana normalmente é expressa de uma forma compacta:

$$\mathcal{H}_{\text{hip}} = \vec{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \vec{S} \quad \text{Eq.(2.57)}$$

Tal expressão é chamada normalmente de interação hiperfina, e “ $\mathbf{A}$ ” agora é um tensor de segunda ordem. Como essa interação entre o núcleo e o elétron perturba o comportamento do estado de spin eletrônico, quando o interesse for avaliar o efeito da interação do campo magnético externo com o átomo, ela deve ser levada em consideração, pois exerce um papel importante. A Hamiltoniana completa para o estado de spin é obtida a partir da combinação entre as Eq.(2.51) e Eq.(2.57), que fornece a chamada Hamiltoniana de spin:

$$\mathcal{H}_{\text{spin}} = \beta \vec{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \vec{S} + \vec{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \vec{S} \quad \text{Eq.(2.58)}$$

Tem-se “ β ” o magneton de Bohr e “ $\mathbf{g}$ ” um tensor de segunda ordem. A partir desta Hamiltoniana de spin é possível encontrar os auto-estados do sistema com suas correspondentes auto-energias.

Equações de Bloch

Quando o interesse é avaliar o grau de orientação de um sistema de spins, a forma mais eficiente para isso seria observar a magnetização do sistema, pois esta é a grandeza que representa a resultante de todas as orientações dos momentos de dipolo presentes no meio, ou seja, uma situação de magnetização nula implica necessariamente a não existência de uma orientação preferencial. Em experimentos de RPE, uma perturbação externa provoca alterações no grau de orientação do sistema, o que conseqüentemente altera a magnetização do meio, logo a magnetização é uma grandeza importante a ser monitorada. Felix Bloch, em 1946, propôs um conjunto de equações fenomenológicas capaz de descrever o comportamento da magnetização de uma coleção de spins na presença de um campo magnético externo. As equações de Bloch são definidas como:

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma \cdot (\vec{H} \times \vec{M})_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad \text{Eq.(2.59)}$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma \cdot (\vec{H} \times \vec{M})_x - \frac{M_x}{T_2} \quad \text{Eq.(2.60)}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma \cdot (\vec{H} \times \vec{M})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad \text{Eq.(2.61)}$$

Sendo x, y e z eixos fixos no laboratório, “ $\vec{M}$ ” a magnetização do sistema, “ M_0 ” o valor de M_z no equilíbrio térmico, “ T_1 ” e “ T_2 ” os tempos de relaxação longitudinal e transversal e “ $\vec{H}$ ” o campo externo total aplicado ao sistema, que normalmente é caracterizado por:

$$\vec{H} = H_1 \cos \omega t \hat{x} + H_1 \sin \omega t \hat{y} + H_0 \hat{z} \quad \text{Eq.(2.62)}$$

Observa-se aí um campo oscilante com amplitude “ H_1 ” nas direções $\hat{x}$ e $\hat{y}$, e um campo estático com intensidade “ H_0 ” na direção $\hat{z}$. Esse campo $\vec{H}$ mimetiza a situação encontrada em um experimento de RPE de onda contínua, pois H_1 representaria a radiação incidente no sistema e H_0 o campo responsável pelo desdobramento dos níveis de energia. Sendo assim, espera-se que a solução das equações de Bloch para esse campo $\vec{H}$ deva ser algo como uma curva de absorção de energia do sistema. Então para esse campo as equações de Bloch tornam-se:

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma \cdot (-M_x H_1 \sin \omega t + M_y H_1 \cos \omega t) + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad \text{Eq.(2.63)}$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma \cdot (-M_y H_0 + M_z H_1 \sin \omega t) - \frac{M_x}{T_2} \quad \text{Eq.(2.64)}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma \cdot (-M_z H_1 \cos \omega t + M_x H_0) - \frac{M_y}{T_2} \quad \text{Eq.(2.65)}$$

A solução deste sistema de equações será simplificada se as grandezas forem descritas em relação a um referencial girante sobre o eixo-z e com frequência ω . Esta transformação de referencial permite escrever as equações de Bloch como:

$$\frac{du}{dt} = \gamma H_0 v - v \omega - \frac{u}{T_2} \quad \text{Eq.(2.66)}$$

$$\frac{dv}{dt} = -\gamma H_0 u + u \omega + \gamma M_z H_1 - \frac{v}{T_2} \quad \text{Eq.(2.67)}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = -\gamma H_1 v + \frac{(M_0 - M_z)}{T_1} \quad \text{Eq.(2.68)}$$

Resolvendo este sistema e tomando a solução estacionária, onde $\omega_0 = \gamma H_0$, e retornando ao sistema de coordenadas no referencial do laboratório, as expressões para as componentes da magnetização serão:

$$M_x = \bar{M} \left\{ (\omega_0 - \omega) \cos \omega t + \frac{1}{T_2} \sin \omega t \right\} \quad \text{Eq.(2.69)}$$

$$M_y = \bar{M} \left\{ (\omega_0 - \omega) \sin \omega t - \frac{1}{T_2} \cos \omega t \right\} \quad \text{Eq.(2.70)}$$

$$M_z = \frac{M_0 \left[(1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2 \right]}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \quad \text{Eq.(2.71)}$$

Onde;

$$\bar{M} = \frac{\gamma H_1 M_0}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \quad \text{Eq.(2.72)}$$

Considerando:

$$\vec{H}_1 = 2 H_1 \cos \omega t \hat{x} \quad \text{Eq.(2.73)}$$

Tal campo pode ser considerado como a parte real de um campo $\vec{H}_1 = 2 H_1 e^{i\omega t}$. Considerando que a magnetização total de um meio possa ser caracterizada por:

$$M = \chi H \quad \text{Eq.(2.74)}$$

em que χ é a susceptibilidade magnética, que também pode ser caracterizada como uma grandeza complexa, $\chi = \chi' + i\chi''$, pode-se dizer que:

$$M_x = 2 H_1 \chi' \cos \omega t + 2 H_1 \chi'' \sin \omega t \quad \text{Eq.(2.75)}$$

Comparando agora esta definição com a solução das equações de Bloch, observa-se que a susceptibilidade magnética é caracterizada como:

$$\chi' = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\gamma M_0 (\omega_0 - \omega)}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \right\} \quad \text{Eq.(2.76)}$$

$$\chi'' = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\gamma M_0 (1/T_2)}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \right\} \quad \text{Eq.(2.77)}$$

Pode ser mostrado que a potência média absorvida pelo sistema $P(\omega)$, relacionada com o sinal de RPE observado $f(\omega)$, é dada por:

$$\overline{P(\omega)} \propto f(\omega) \propto \omega (2 H_1)^2 \chi'' \quad \text{Eq.(2.78)}$$

Isso indica que a parte imaginária χ'' está associada à transferência de energia do campo magnético para o sistema. Pode-se inferir que a forma de linha da absorção ocorrida no sistema será dada por:

$$f(\omega) = \frac{A \gamma M_0 (1/T_2)}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \quad \text{Eq.(2.79)}$$

Assumindo que “A” é uma constante de proporcionalidade que inclui parâmetros instrumentais. Considerando agora o campo H_1 pequeno, tem-se que o termo $\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2)$ pode ser desprezado comparando-se ao termo $(1/T_2)$, e a função da forma de linha torna-se:

$$f(\omega) = \frac{A \gamma M_0 (1/T_2)}{(1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \quad \text{Eq.(2.80)}$$

A função é equivalente à função lorentziana, e com largura de linha dada por $(1/T_2)$.

Dependência do espectro com a orientação da molécula

Observa-se em Eq.(2.56) que a intensidade da interação entre os campos magnéticos e o elétron desemparelhado depende das grandezas $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$. Essas grandezas são tensores não isotrópicos, possuem dependência orientacional, o que acaba impondo à interação uma anisotropia espacial. A anisotropia espacial é a propriedade que torna o método de marcador de spin um método interessante no estudo da dinâmica molecular, pois é ela que irá informar o grau de movimentação do marcador em um determinado meio. As anisotropias dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ podem ser exemplificadas através da observação dos espectros do radical nitróxido, Fig. 2.1 (a), (b) e (c), inserido como impureza diluída em cristais diamagnéticos (para evitar interações spin-spin intermoleculares) e submetido a um campo magnético paralelo a cada uma das suas três coordenadas moleculares principais. As coordenadas moleculares do radical são definidas como na Fig. 2.1, a qual o eixo $\hat{x}$ é paralelo à ligação N-O, o eixo $\hat{z}$ é paralelo ao orbital $2p-\pi$ do nitrogênio e o eixo $\hat{y}$ perpendicular aos outros dois. Estes espectros possuem três linhas de absorção como consequência da interação do spin do elétron com o spin do núcleo de nitrogênio, ($S_I=1$), que podem assumir projeções de $m_I = +1, 0$ e -1 . A partir de espectros como os apresentados em Fig. 2.1 é possível determinar os valores para as componentes principais dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , A_{xx} , A_{yy} e A_{zz}). Com intuito de exemplificar os valores principais dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$, apresentam-se na Tab. 2.1 os valores medidos para dois tipos diferentes de marcadores de spin.

Tab. 2.1 Valores principais dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$

	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
Doxil – cadeia alifática ^a (SASL e PCSL)	5,9	5,4	32,9	2,0088	2,0058	2,0022
Doxil – Colestano ^b (CSL)	5,8	5,8	30,8	2,0089	2,0058	2,0021

(^aHubbell e McConnell, 1971; ^bJost e col., 1971)

Fig. 2.1 - Esquema do radical nitróxido usado como marcador de spin e seus espectros em diferentes condições: (a), (b) e (c) como impureza em cristal diamagnético com H_0 paralelo aos eixos x, y e z, respectivamente; (d) em solução congelada; (e) em solução de baixa viscosidade, espectro isotrópico. [figura Fig. 3 em (Marsh, 1981)].

Quando um sistema de moléculas paramagnéticas não possui uma orientação preferencial relativa ao eixo paramagnético principal com a orientação do campo magnético externo, espera-se que o espectro de RPE resultante deste sistema seja uma sobreposição de espectros correspondentes a todas as possibilidades de orientação. Este espectro contará com espectros distribuídos sobre um grande intervalo de campo e com os mais diferentes valores de intensidades. Na Fig. 2.1 (d) e (e) estão mostrados os espectros de RPE obtidos para radicais nitróxido em duas situações onde não existe direção preferencial de orientação: o espectro de pó (d) e o espectro em solução com baixa viscosidade (e). No primeiro caso, o espectro consiste de uma soma de espectros a partir de uma distribuição aleatória das moléculas no meio. No segundo caso, o espectro é resultado do tombamento rápido e isotrópico do marcador em um dado solvente. As flutuações térmicas promediam a anisotropia dos termos da hamiltoniana de spin, e os termos $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ podem ser caracterizados como a média das três direções principais: $g_0 = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3$ e $a_0 = (A_{xx} + A_{yy} +$

$A_{zz}/3$, resultando em um espectro isotrópico e independente da orientação do campo magnético aplicado.

Influência da velocidade de movimento no perfil do espectro

Fig. 2.2 - Sinais de RPE da molécula mostrada acima (Tempol), em soluções de viscosidades crescentes de A a F: 0,116 poise, 273K; 0,367 poise, 293K; 0,523 poise, 293K; 1,58 poise, 283 K; 5,77 poise, 273K; 9,4 poise, 273K .[figura Fig. 11.2 em (Smith, 1972)]

Quando observam-se os sinais de RPE para um radical nítróxido aquo-solúvel, em meios de diferentes viscosidades (η) , Fig.2.2, constata-se que o perfil do espectro é sensível à viscosidade do meio. Considerando que a difusão da molécula nos diversos meios possa ser descrita por um modelo de Stokes-Einstein, então é possível associar um tempo de correlação rotacional característico para a molécula em cada um dos meios ($\tau = (4\pi\eta r^3)/(3kT)$ onde r é o raio hidrodinâmico da partícula que difunde, k a constante de Boltzman e T a temperatura em Kelvin). Como a resposta ao tempo de correlação do perfil do espectro apresenta características muito peculiares para cada sistema, a utilização de um modelo global capaz de prever todas as alterações possíveis no perfil do espectro torna-se impraticável, devido ao seu alto grau de complexidade. A

forma de viabilizar a utilização de modelos para a perturbação espectral seria definir intervalos de aplicação, em que cada intervalo deve garantir que os comportamentos espectrais são semelhantes para uma dada perturbação. Com este intuito e utilizando-se dos tempos de correlação da molécula e da análise espectral de RPE em banda X ($\nu \approx 9 \times 10^9$ Hz), definiu-se quatro grupos principais para os espectros de radicais em solução; são eles:

$\tau < 10^{-11} s$ - A espectroscopia de RPE é insensível a flutuações mais rápidas do que $10^{-11} s$. Em caso de movimento isotrópico, o sinal de RPE do nitróxido apresenta três linhas de igual intensidade, do qual só é possível a obtenção dos valores médios de a_0 e g_0 ;

$10^{-11} \leq \tau \leq 3 \times 10^{-9} s$ - É a chamada região de movimento rápido, ou de *motional narrowing*, onde o alargamento diferencial das três linhas de RPE dá informação sobre a velocidade de movimento da molécula – corresponde ao espectro A na Fig.2.2, e no limite, ao espectro B.

$3 \times 10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-7} s$ - Nesta região as linhas de RPE, além de se alargarem, mudam de posição, sendo necessário um modelo mais complexo de simulação dos espectros.

$10^{-7} s \leq \tau$ - Nesta região o espectro é um típico espectro de pó (corresponde ao espectro F na Fig.2.2), que corresponde à soma dos sinais da molécula em todas as direções relativas ao campo externo. A RPE convencional não é mais sensível nesta faixa de movimento, sendo recomendável a utilização de outras técnicas, como transferência de saturação, ELDOR ou RPE pulsada.

Região de movimento rápido $10^{-11} \leq \tau \leq 3 \times 10^{-9} s$

Na descrição de sinais de RPE, para sondas que desenvolvem movimentos rápidos, utiliza-se a teoria desenvolvida por Redfield (1965), que se baseia no desenvolvimento da matriz densidade para encontrar os valores esperados da magnetização do sistema de spin. O desenvolvimento da matriz inicia-se a partir da definição da Hamiltoniana do elétron desemparelhando.

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_1(t) + \mathcal{H}_2(t) \quad \text{Eq.(2.81)}$$

Sendo $\mathcal{H}_0$ a contribuição da Hamiltoniana independente do tempo, $\mathcal{H}_1(t)$ corresponde às flutuações aleatórias das componentes anisotrópicas das duas interações e $\mathcal{H}_2(t)$ a contribuição do campo da radiação de microonda. Aplicando a teoria de Matriz Densidade é possível mostra que,

para um sistema de spin $S=1/2$ e $I=1$, a largura de linha não é simétrica para cada interação hiperfina, e pode ser expressa como uma função dos números quânticos m_I , Eq.(2.82).

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_{m_I} = a + bm_I + cm_I^2 \quad \text{Eq.(2.82)}$$

Isso sendo que a, b e c dependem do campo externo, dos valores médios das anisotropias dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ e do tempo de correlação das moléculas. Fica claro, então, que o alargamento é diferencial para cada linha corresponde a um dado m_I .

$$a = \left(\frac{\beta H_0}{\hbar}\right)^2 (g^0 : g^0) \left\{ \frac{2}{15} \tau_c + \frac{1}{10} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\} + I(I+1) (A^0 : A^0) \left\{ \frac{1}{20} \tau_c + \frac{7}{60} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\} \quad \text{Eq.(2.83)}$$

$$b = \left(\frac{\beta H_0}{\hbar}\right)^2 (g^0 : A^0) \left\{ \frac{4}{15} \tau_c + \frac{1}{5} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\} \quad \text{Eq.(2.84)}$$

$$c = \left(\frac{1}{\hbar}\right)^2 (A^0 : A^0) \left\{ \frac{1}{12} \tau_c - \frac{1}{60} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\} \quad \text{Eq.(2.85)}$$

Considerando $T^0 \equiv A^0$ ou g^0 , a parte anisotrópica dos tensores $\mathbf{A}$ e $\mathbf{g}$, $(T^0 : T^0)$ significa a soma dos produtos dos valores principais dos tensores A^0 e g^0 . H_0 é o campo externo e ω a frequência angular de ressonância do elétron. Pode-se reescrever a Eq.(2.82) em relação a largura de linha Lorentziana, medida pico a pico no espectro de RPE (1ª derivada), ΔH_{pp} , em função da varredura do campo magnético:

$$\Delta H_{pp}^L(m_I) = A + Bm_I + Cm_I^2 \quad \text{Eq.(2.86)}$$

Assim tem-se que:

$$\Delta H_{pp}^L(0) = A \quad \text{Eq.(2.87)}$$

$$\Delta H_{pp}^L(+1) = A + B + C \quad \text{Eq.(2.88)}$$

$$\Delta H_{pp}^L(-1) = A - B + C \quad \text{Eq.(2.89)}$$

Considerando que a área sob a linha (Lorentziana) de absorção pode ser obtida através do produto $\Delta H_{pp}^L(m_i)^2 \times h(m_i)$, em que $h(m_i)$ é a altura da linha cujo número de spin nuclear é m_i , utilizando-se dessa relação é possível escrever:

$$B = \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right) \quad \text{Eq.(2.90)}$$

$$C = \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right) \quad \text{Eq.(2.91)}$$

Portanto, reescreve-se as expressões dos parâmetros B e C, permitindo que possam ser medidos diretamente nos espectros de RPE com maior precisão.

Cálculo dos tempos de correlação (τ_c)

Um modelo simples para a difusão rotacional seria considerar que a ponta de um vetor que define a orientação de uma molécula realiza um caminho aleatório sobre uma superfície esférica, ou seja, um movimento Browniano isotrópico. A probabilidade condicional $P(\theta, \phi, t)$ que se refere ao vetor orientado ao longo de (θ, ϕ) no tempo t , depois de inicialmente estar em $(0,0)$, é dada por uma equação de difusão:

$$\frac{dP(\theta, \phi, t)}{dt} = D_R \left\{ \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} \right\} P(\theta, \phi, t) \quad \text{Eq.(2.92)}$$

Admitindo que D_R é o coeficiente de difusão rotacional. O operador angular nesta equação é idêntico ao que ocorre na equação de Schrödinger para um átomo de hidrogênio e não seria surpresa esperar que a solução de $P(\theta, \phi, t)$ seja uma expansão em harmônicos esféricos, $Y_{l,m}(\theta, \phi)$.

$$P(\theta, \phi, t) = \sum_{l,m} c_{l,m} Y_{l,m}(\theta, \phi) \exp \left\{ -l(l+1) D_R t \right\} \quad \text{Eq.(2.93)}$$

As quantidades anisotrópicas de interesse nessa equação são os tensores de segunda ordem, então $L=2$ e o tempo de correlação pode ser inserido em Eq.(2.93) através da relação

$$\tau_c = \frac{1}{6D_R} \quad \text{Eq.(2.94)}$$

Sendo que o coeficiente de difusão se relaciona com coeficiente de fricção rotacional, f_R , através da fórmula de Einstein

$$D_R = \frac{K_B}{f_R} \quad \text{Eq.(2.95)}$$

f_R pode ser obtido através da lei de Stokes

$$f_R = 8\pi\eta r_0^3 \quad \text{Eq.(2.96)}$$

“ η ” é a viscosidade do solvente e “ r_0 ” é o raio hidrodinâmico da partícula. Difundindo, obtém-se a equação de Debye para o tempo de correlação rotacional (τ_c)

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r_0^3}{3K_B T} \quad \text{Eq.(2.97)}$$

Tal tempo é análogo à equação de difusão translacional de Stokes-Einstein.

O tempo de correlação rotacional τ_c pode ser obtido a partir dos parâmetros anisotrópicos A, B e C. Os parâmetros B e C foram calculados usando-se os parâmetros dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ para marcadores de spin de cadeia alifática, e $H_0 = 3300$ G, resultando em duas expressões para o cálculo do tempo de correlação.

$$\tau_c(B) = (-1.22 \times 10^{-9}) B \quad \text{Eq.(2.98)}$$

$$\tau_c(C) = (1.19 \times 10^{-9}) C \quad \text{Eq.(2.99)}$$

Sendo que devem ser idênticos para o movimento isotrópico. Diferenças entre os dois valores são muitas vezes usadas na literatura como indicação de anisotropia no movimento.

Região de movimento lento $3 \times 10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-7} \text{ s}$

Na região de movimento lento a teoria de Redfield, não pode ser mais aplicada, pois a posição das linhas agora é dependente tanto da anisotropia do movimento como dos tempos de correlação, e a forma da linha deixa de ser do tipo Lorentziana. Em uma situação como esta, torna-se necessária a utilização de outro tratamento teórico, uma alternativa seria a utilização do método estocástico de Liouville. Esse tratamento teórico foi desenvolvido por Jack H. Freed (Freed, 1976), e depende explicitamente de parâmetros que não são diretamente medidos nos espectros, o que dificulta a sua utilização, sendo que a forma utilizada de análise ocorre através da simulação computacional dos espectros. Uma forma de se obter informações aproximadas do grau de difusão da molécula neste regime, é através da observação de parâmetros, medidos diretamente nos espectros, como $A_{\text{máx}}$ e ΔH_0 , que avaliam o grau de anisotropia do movimento.

Polaridade do Meio

Estudos demonstram que propriedades elétricas do solvente, onde a sonda está inserida, podem alterar os valores de A e g do radical. Em geral a transferência da sonda de um solvente apolar para um polar provoca aumento no a_0 e uma diminuição no g_0 . As mudanças nos termos dos tensores estão associadas a perturbações na distribuição da nuvem eletrônica ao redor do núcleo de nitrogênio. No caso do termo a_0 as mudanças estão associadas à variação da contribuição relativa das duas estruturas canônicas estáveis que o radical pode assumir, como visto abaixo (Griffith e col., 1974):

O elétron desemparelhado do radical nitróxido está localizado sobre o átomo de oxigênio na estrutura A e sobre o nitrogênio na estrutura B. Solventes que tendem a estabilizar a estrutura iônica B aumentam a densidade do elétron desemparelhado sobre o nitrogênio ocorrendo um conseqüente aumento de a_0 ou A_{zz} . Na Tab.2.2 estão apresentados valores para parâmetros a_0 e g_0 , de um marcador de spin em três meios de polaridades distintas (Griffith e col., 1974)

Tab.2.2 – Valores dos parâmetros de RPE isotrópicos de di-t-butil-nitróxido (DTBN), a 23°C.

	a₀ (G)	g₀
Hexano	15,10	2,0061
Etanol	16,06	2,0059
Água	17,16	2,0056

Em princípio, a polaridade pode ser determinada a partir da medida de uma das quatro constantes de desdobramento a_0 , A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} do grupo nitróxido. Para sondas em movimento rápido, o parâmetro a_0 pode ser medido diretamente no espectro, já para movimentos lentos, nenhum dos parâmetros anteriores podem ser medidos diretamente no espectro devido à média parcial do movimento de interação dipolar elétron-núcleo. Um método indireto para se obter a informação sobre a polaridade de uma sonda orientada aleatoriamente, seria estimar os valores médios de $\bar{A}_\perp$ e $\bar{A}_\parallel$ e obter a_0 a partir da equação

$$a_0 = \frac{1}{3}(\bar{A}_\parallel + 2\bar{A}_\perp) \quad \text{Eq.(2.100)}$$

Sendo;

$$\bar{A}_\perp = \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy}) ; \bar{A}_\parallel = A_{zz} \quad \text{Eq.(2.101)}$$

2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

(Duarte, 2000; Oliveira, 2005; Cevc e Marsh, 1987)

O DSC tem sido um dos métodos mais aplicados no estudo do comportamento térmico de bicamadas lipídicas. A sua grande vantagem com relação a outras técnicas, está no grau de precisão com que é possível realizar estudos de transição de fase gel-fluida de sistemas lipídicos. A transição principal pode ser considerada uma transição de primeira ordem e são detectadas através de um pico de calor específico. A entalpia dessa transição depende muito da interação entre as cadeias hidrocarbônicas e entre as cabeças polares vizinhas.

Princípios básicos de calorimetria

O DSC é uma técnica que avalia a diferença de capacidade térmica entre uma amostra e um sistema referência. Para isso são utilizadas duas celas, amostra e referência, monitoradas e mantidas à mesma temperatura. O experimento consiste em submeter as celas de amostra e referência a uma variação de calor controlada de maneira que as temperaturas das celas seja variada igualmente. A potência de variação de calor de cada cela é monitorada durante todo o processo. Quando uma transição de fase ocorre na amostra, uma diferença de potência requerida para a variação de calor é observada entre as duas celas. A potência requerida para manter as duas celas com temperaturas iguais é medida e convertida em capacidade térmica, e uma curva de capacidade em função da temperatura é traçada.

Considerando que um dado sistema assuma apenas fases homogêneas, é possível definir que cada fase assumida possui uma entropia molar bem definida, e uma transição de fase corresponde a uma mudança de entropia do sistema. Uma transição fase de primeira ordem é uma transição facilmente constatada em um diagrama S-T (Entropia-Temperatura), pois a função entropia na região de transição apresenta uma descontinuidade.

Para o estudo do diagrama S-T de um sistema é necessário primeiramente obter a entropia do sistema para cada temperatura de equilíbrio. A entropia é uma grandeza inacessível experimentalmente, ou seja, sua aquisição direta em experimentos é impossível; porém, existem formas de relacionar a entropia de um sistema com outras grandezas de fácil aquisição experimental, tal como a capacidade térmica, que se relaciona à entropia da seguinte forma:

$$C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_p \quad \text{Eq.(2.102)}$$

Em que considera-se aí “ C_p ” a capacidade térmica do meio, “ T ” a temperatura do meio e “ S ” a entropia do sistema. Para o momento, adotou-se a capacidade térmica “ C_p ” como a capacidade térmica do sistema durante um processo a pressão constante. Através da relação demonstrada na Eq. (2.105) é possível escrever a variação de entropia sofrida pelo sistema da seguinte forma:

$$\Delta S = \int \frac{C_p}{T} dT \quad \text{Eq.(2.103)}$$

Novamente deve-se assumir um processo a pressão constante. Com relação à Eq.(2.103), demonstra-se que através do monitoramento da capacidade térmica de um sistema juntamente com a temperatura, é possível obter informações sobre a variação de entropia do meio e conseqüentemente obter informações sobre uma provável transição de fase. A capacidade térmica a uma pressão constante é uma grandeza que também é definida como:

$$C_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p \quad \text{Eq.(2.104)}$$

Observando que “ dQ ” representa a variação de calor sofrida pelo meio, e “ C_p ” então representa a quantidade de calor que é necessária fornecer ao sistema para que o mesmo sofra uma variação de temperatura “ dT ”.

Uma forma eficiente de se obter “ C_p ” de um sistema seria aplicando uma quantidade de calor determinada ao meio e verificando qual a variação de temperatura provocada por ela. Para controlar e fornecer uma quantidade de calor específica a um dado meio, pode-se utilizar o efeito Joule sofrido por um circuito elétrico composto prioritariamente por resistores, quando submetido a uma corrente elétrica específica. O efeito Joule define a quantidade de calor dissipada por um circuito elétrico quando submetido a passagem de uma corrente “ I ” é expressa por:

$$Q_{diss} = \int P_e dt = \int I^2 R dt \quad \text{Eq.(2.105)}$$

Em que “ P_e ” representa a potência elétrica fornecida ao circuito, “ I ” a corrente elétrica que o atravessa e “ R ” a resistência ôhmica resultante. Considerando que esse circuito elétrico transfira eficientemente toda quantidade de calor dissipada por efeito Joule a um sistema qualquer, pode-se dizer que a capacidade térmica do meio é descrita por:

$$Q_{diss} = \int C_p dT \quad \text{Eq.(2.106)}$$

Permitindo escrever;

$$\int P_e dt = \int C_p \frac{dT}{dt} dt \quad \text{Eq.(2.107)}$$

Logo;

$$P_e = C_p v_{Varr} \quad \text{Eq.(2.108)}$$

Considerando “ v_{varr} ” como a velocidade da variação de temperatura do meio. O resultado da Eq. (2.108) pode ser generalizado para qualquer potência calorífica aplicada ao meio, não somente a potência elétrica. Portanto, conhecendo a potência calorífica fornecida ao sistema e a velocidade de resposta da variação da temperatura, é possível obter o C_p de um sistema.

Na técnica de DSC, a velocidade de resposta do meio a uma dada variação de temperatura, é imposta ao sistema, ou seja, no DSC o sistema é obrigado a variar um intervalo de temperatura específico em um dado intervalo de tempo, mas para isso o sistema fornece ao meio a quantidade de calor necessária.

Como experimentos de DSC acontecem a pressão constante e sem troca de partículas, é possível obter informações sobre a variação de entalpia do sistema, pois a partir da equação na forma diferencial da entalpia constata-se que:

$$dH = TdS + Vdp + \mu dN \quad \text{Eq.(2.109)}$$

Tal expressão assume uma nova forma nas condições de pressão constante e conservação de partículas,

$$dH = TdS \quad \text{Eq.(2.110)}$$

Assim, tem-se o seguinte;

$$\Delta H = \int C_p dT \quad \text{Eq.(2.111)}$$

Agora combinando os resultados da Eq.(2.103) e Eq.(2.111), pode-se escrever a relação entre essas grandezas, entalpia e entropia, na condição de temperatura constante como:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T} \quad \text{Eq.(2.112)}$$

A comparação entre os elementos da Eq.(2.112) mostra o efeito das modificações estruturais na termodinâmica de uma transição de fase.

3. Materiais e Métodos

3.1- Materiais

Anfifílicos. A anfotericina utilizada foi obtida junto a Squibb (batch 750-13 A , Squibb). O Brometo de dimetildioctadecilamônio (DODAB) junto a Sigma-Aldrich.

Fig.3. 1 - Representação esquemática da estrutura química da Anfotericina B

Fig.3. 2 - Representação esquemática da estrutura química do DODAB

Marcadores de spin. Os marcadores de spin 5- e 16- Doxil Metil Ester (MESL) foram adquiridos junto a Avanti Polar Lipids.

Fig.3.3 - Representação esquemática da estrutura química dos Marcadores de spin 5- e 16- MESL.

3.2 Métodos

Preparação das dispersões de DODAB e C₁₈TAB

A preparação das vesículas foi padronizada para todos os experimentos. A água utilizada era do tipo ultra-pura Milli-Q. Primeiramente o DODAB em pó era pesado e dissolvido em 4ml de água, de forma a obter-se uma concentração final de 2 mM. Logo após, a dispersão era aquecida à 57°C, por um período mínimo de vinte minutos, até a completa homogeneização do sistema. Em seguida a amostra era agitada por cinco minutos e depois mantida à temperatura ambiente por um período de 3 horas para a completa estabilização do sistema. As micelas de C₁₈TAB (Brometo de octadeciltrimetilamônio) foram preparadas por simples agitação do cristal de surfactante (2 mM) em água acima do ponto de “Krafft” ($\approx 38^\circ\text{C}$), e em seguida mantida à temperatura ambiente. Este protocolo de preparação das dispersões de DODAB tende a formar vesículas, principalmente unilamelares, que podem assumir diferentes tamanhos, sendo possível verificar a existência de vesículas unilamelares de até 8 μm de diâmetro. Este fato pode ser constatado na observação das dispersões de DODAB por microscopia óptica de contraste de fase (Fig.3.4).

Fig.3.4 - Imagens obtidas por microscopia óptica de contraste de fase, utilizando-se o microscópio Zeiss Axiovert 200, objetiva 63x, para dispersões de DODAB (2 mM) à temperatura ambiente. As imagens A e B representam regiões diferentes da mesma amostra. Estas amostras foram observadas no mesmo dia do preparo. (crédito : Profa.Dra. Karin do Amaral Riske)

Observando a Fig.3.4, constata-se a presença de uma textura de fundo, o que indica a presença de agregados lipídicos menores que $1\mu\text{m}$, constata-se também a presença de algumas vesículas unilamelares maiores que $1\mu\text{m}$, conforme indicado na figura. Portanto, formam-se dispersões de DODAB polidispersas e não multilamelares.

Preparação das dispersões Sonicadas

Após a preparação das vesículas conforme procedimento anterior, retirava-se uma alíquota de 3,0 mL desta solução e iniciava-se o processo de sonicação. As amostras eram sonicadas, em um recipiente cilíndrico de 15 mL de volume e 2,5 cm de diâmetro, utilizando-se do ultrassom Virsonic 550 com ponta de 11,0 mm. A potência selecionada foi de 30% da potência máxima. Durante a sonicação a amostra foi mantida à aproximadamente 60°C . O processo de sonicação foi realizado em 15 ciclos de um minuto, com trinta segundos de intervalo entre cada ciclo. Após a sonicação, as amostras eram centrifugadas à 24°C em 15000 RPM por um período de uma hora, para a retirada dos resíduos de Titânio provenientes da ponta do sonicador. Realizando o mesmo procedimento anterior de verificação da dispersão obtida por microscopia de contraste de fase, é possível verificar os efeitos do processo de sonicação sobre os agregados da dispersão (Fig.3.5).

Fig.3.5 - Imagens obtidas por microscopia óptica de contraste de fase para dispersões de DODAB sonicado (2 mM), na temperatura ambiente. As Imagens A e B representam regiões diferentes da mesma amostra. (crédito : Profa.Dra. Karin do Amaral Riske)

Na Fig.3.5 observa-se uma perda da textura de fundo observado para o DODAB não sonicado, indicando o desaparecimento dos grandes agregados lipídicos. Entretanto a dispersão obtida por

sonicação não é completamente homogênea, pois ainda é possível constatar a presença, raramente, de algumas vesículas grandes remanescentes (indicado na imagem por uma seta vermelha)

Preparação das amostras de DODAB-AB

Primeiramente foram criados filmes de AB a partir de uma solução estoque (500 μ M) de AB/Dimetilsulfóxido (DMSO)/Metanol (1:1), depois os filmes eram colocados a baixa pressão por no mínimo três horas, com intuito de retirar traços de solvente orgânico. Após, era então adicionado ao filme as dispersões de DODAB 2 mM e agitado por 5 minutos. Foram realizados experimentos com amostras em diferentes frações molares de AB, onde as principais foram: 0,38, 0,5, 0,6, 1,2, 1,8 mol%. Após o término da agitação, as amostras eram mantidas por 6 horas à temperatura ambiente, como processo de incubação, antes do início dos experimentos.

Observando novamente as dispersões obtidas por microscopia óptica de contraste de fase, constata-se (Fig.3.6) que a presença da AB no meio não provoca alterações significativas ao padrão de resposta dos mesmos, pois constata-se grande semelhança aos obtidos na ausência de AB.

Fig.3.6 - Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase para dispersões 2mM de DODAB não sonificado (A) e DODAB sonificado (B), na temperatura ambiente e na presença de Anfotericina B na fração molar de 1,2 mol%.(crédito : Profa.Dra. Karin do Amaral Riske)

Na Fig.3.6 fica nítida a diferença entre a dispersão de DODAB não sonificado e a dispersão de DODAB sonificado, onde observa-se que o DODAB não sonificado apresenta uma textura de fundo

muito mais evidenciada que as dispersões de DODAB sonicado, o qual apresenta-se praticamente sem textura.

Medidas de Absorção Óptica

As medidas de absorbância foram realizadas em um Espectrofotômetro HP 8452 A, com controle de temperatura Julabo F25, e com cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm.

Definição do parâmetro C

O parâmetro “C” é um parâmetro totalmente empírico, definido pela primeira vez neste trabalho, que tem como função avaliar a fração de moléculas de AB no estado monomérico de uma solução.

O parâmetro “C” foi definido a partir da observação dos espectros de Absorção Óptica das diversas amostras de AB nos diferentes meios, principalmente nos bons e maus solventes. Observando esses espectros foi possível constatar que amostras de AB monomérica em DMSO, apresentavam valores para a razão entre a intensidade do pico em 388 nm e as intensidades nos demais picos (412 nm, 368 nm, 352 nm) sempre muito semelhantes, não importando a concentração de AB utilizada. Este fato permitiu inferir que a razão entre os picos, para o estado monomérico, é uma propriedade específica do estado, que poderia ser utilizada como um identificador deste estado.

Avaliando-se oito amostras de AB em DMSO, em diferentes concentrações, foi possível elaborar uma estimativa média para a razão entre os picos do espectro típico de monômero, apresentados na Tab.3. 1. O mesmo procedimento de análise foi executado para a AB no estado agregado, em água, e observou-se que a razão entre as absorbâncias, nas mesmas posições que as observadas para o estado monomérico, também apresentavam um comportamento bem reprodutível, o que permitiu a definição de um comportamento médio para o estado agregado. Este comportamento também é apresentado na Tab.3. 1.

Tab.3. 1 - Razões entre os picos de intensidades de absorção da AB no estado agregado e no estado monomérico (água e DMSO). As amostras analisadas possuíam diferentes concentrações de AB.

	AB - Agregada			AB - Monomérica		
	412 / 388	368 / 388	352 / 388	412 / 388	368 / 388	352 / 388
Picos						
Razão	$0,58 \pm 0.05$	$1,11 \pm 0.04$	$1,25 \pm 0.07$	$1,01 \pm 0.01$	$0,69 \pm 0.03$	$0,38 \pm 0.05$

* Média obtida a partir de 10 amostras

* Média obtida a partir de 8 amostras

De posse do comportamento médio das razões entre os picos de absorção, foi possível definir um parâmetro capaz de quantificar o quanto um espectro qualquer se assemelha ao espectro da AB no estado monomérico. Este parâmetro foi chamado o parâmetro “C”, e avalia a razão entre o primeiro pico de absorção (412 nm) e o segundo pico (388 nm), obtidos para o espectro a ser analisado e os espectros padrões da AB. Definiu-se o parâmetro “C” somente utilizando os picos de 388 e 412 nm, pois trata-se das duas transições de maior probabilidade de ocorrência e por corresponder a uma região onde o espalhamento da AB agregada é minimizado. O parâmetro “C” assume o valor “1” quando a razão do espectro a ser analisado for idêntica à razão da AB no estado monomérico, e assume o valor “0” quando a razão for semelhante à razão da AB agregada. A definição acima citada pode ser resumida na expressão Eq.(3.1).

$$C = \frac{\left[\frac{A_{412}}{A_{388}} \right]_{Exp} - \left[\frac{A_{412}}{A_{388}} \right]_{Ag}}{\left[\frac{A_{412}}{A_{388}} \right]_M - \left[\frac{A_{412}}{A_{388}} \right]_{Ag}} \quad \text{Eq.(3.1)}$$

Onde “A” representa os valores da absorbância na posição de comprimento de onda em subscrito, “Exp” indica a razão obtida no espectro a ser analisado, “Ag” e “M” representam os estado de associação agregado e monomérico, respectivamente. A forma de verificar a qualidade da proposta do parâmetro “C” seria obter o mesmo para uma combinação simples entre dois espectros padrão da AB, no estado monomérico e no estado agregado (Fig.3.7), para diferentes proporções, e então verificar se o mesmo responde satisfatoriamente à variação da relação.

Fig.3.7 - Espectros de AB a $24\mu\text{M}$ em diferentes solventes: (—) água e (---) DMSO/Metanol

Os espectros utilizados para a combinação e posterior cálculo do parâmetro “C” correspondem aos espectros obtidos na Fig.3.7 multiplicado pela fração de moléculas presentes na dispersão hipotética.

Fig.3.8 - Teste de viabilidade do parâmetro “C”. Em (A) apresenta-se a combinação entre o espectro característico da AB no estado agregado e o espectro do estado monomérico, para diferentes relações de AB monomérica : (—) 0% de AB monomérica, (---) 30% de AB monomérica – 70% de AB agregada e (.....) 60% de AB monomérica – 40% de AB agregada. Em (B) apresenta-se os valores obtidos para o parâmetro “C” para as diferentes relações de AB no estado monomérico.

Como pode ser observado na Fig.3.8 o parâmetro “C” não possui um comportamento linear com o aumento da fração de AB no estado monomérico. Contudo, o parâmetro apresenta uma forte dependência com a fração de AB, demonstrando assim que o parâmetro é satisfatório para os fins deste projeto.

Preparação das amostras de marcador de spin

Foram preparados filmes de marcadores através de soluções de marcadores em clorofórmio, secos com fluxo de N₂, e colocados à baixa pressão por duas horas com o intuito de retirar todo traço de solvente orgânico. Dispersões anfífilas com marcador são criadas adicionando as dispersões ao filme de marcador e agitando por cinco minutos. Os filmes são preparados para uma concentração final de no máximo 0,6 mol% relativo à concentração de anfílico.

Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os espectros de RPE foram obtidos em um espectrômetro EMX da Bruker, com amplitude de modulação de 1,0 G e potência de microondas de 10 mW. A temperatura foi controlada, e variada no intervalo de 15° C a 50°C, por um aparelho BVT-2000 da Bruker (Eurotherm), e a temperatura na amostra foi verificada com um termopar Fluke 51 K/J.

Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura foram realizadas em um aparelho Microcal VP-DSC. A varredura foi realizada sempre como curva de aquecimento e a velocidade de varredura foi definida em 45°C/h . Os perfis obtidos e analisados correspondem sempre à segunda varredura de aquecimento. As análises foram realizadas no programa Microcal Origin 7.0 e a linha de base ajustada como um polinômio de terceiro grau.

Para justificar a escolha do valor da velocidade de varredura de aquecimento 45°C/h, verificou-se o comportamento para o pico “T_m” em função da velocidade de varredura, para o intervalo de 10 a 90°C/h; não constatou-se a ocorrência de uma influência significativa ao padrão do pico de “T_m” até aproximadamente 60°C/h.

4. Resultados e Discussões

4.1 Caracterização estrutural do sistema DODAB

O foco deste projeto é o estudo das propriedades Físico-químicas envolvidas na interação entre as moléculas de AB e dispersões de DODAB, não sonicada (DODAB^{NS}) e sonicada (DODAB^S). É sabido que o comportamento da interação AB-agregados lipídicos é extremamente dependente de propriedades estruturais dos agregados (Bolard e col., 1984; Bolard, 1986) os quais podem determinar diversos comportamentos do sistema. O estudo detalhado da interação AB-agregado lipídico requer, primeiramente, um conhecimento mínimo das propriedades estruturais dos agregados envolvidos.

Como já discutido anteriormente, a estrutura formada por agregados de DODAB sonicado (DODAB^S) em solução aquosa ainda é objeto de discussão na literatura (Brito e Marques, 2005; Saveyn e col., 2008). As diversas discussões publicadas giram em torno de questões como a formação ou não de vesículas e a possibilidade da existência de fragmentos de bicamada. Um estudo estrutural detalhado deste sistema requer grande investimento de tempo e a utilização de diversas técnicas experimentais. Todavia, este esforço de caracterização estrutural do sistema sonicado não foi realizado neste projeto, que se concentrou apenas na obtenção de conhecimento estrutural capaz de auxiliar na interpretação dos resultados quando o sistema interage com as moléculas de AB.

Portanto, neste item são apresentados alguns resultados experimentais obtidos com as técnicas de turbidez, RPE e DSC, para os sistemas DODAB não sonicado (DODAB^{NS}) e DODAB sonicado (DODAB^S).

4.1.1 Caracterização estrutural do DODAB^S por turbidez

O processo de sonicação é um procedimento capaz de provocar a fragmentação de estruturas vesiculares, em pequenos agregados. Uma das formas de se verificar a quebra das vesículas em agregados menores é monitorar a dispersão com a técnica de Turbidez.

A turbidez é uma técnica espectroscópica que avalia a quantidade total de luz espalhada por um determinado meio e a correlaciona com propriedades de tamanho das entidades espalhadoras (ver apêndice E e técnicas experimentais). A forma pela qual a Turbidez relaciona a quantidade de luz espalhada com o tamanho da entidade espalhadora não corresponde a um modelo simples, o que

impõe uma série de dificuldades à obtenção de resultados quantitativos de tamanho. Apesar do acesso dificultado na obtenção de informações quantitativas, a Turbidez é uma técnica que permite, com certa simplicidade, obter informações qualitativas sobre tamanho dos agregados.

A interpretação qualitativa dos resultados experimentais de Turbidez pode ser realizada a partir de um critério muito simples: quanto maior a dimensão das entidades espalhadoras presentes no meio, maior será a quantidade de luz espalhada, e maior será a Turbidez do meio.

Neste trabalho as medidas de Turbidez foram realizadas em um espectrofotômetro comum de feixe único. Os resultados obtidos são apresentados em função da grandeza Absorbância, que se relaciona com a Turbidez, como descrito na introdução teórica (item 2.2).

Variação da Turbidez com o tempo de sonicação

O tempo de sonicação, juntamente com a potência empregada, determina a quantidade de energia fornecida ao sistema. A quantidade de energia aplicada ao sistema irá determinar a capacidade de quebra dos agregados na dispersão, ou seja, quanto maior a quantidade de energia fornecida, menor deveriam ser os agregados formados. Entretanto, existe um limite onde o procedimento de sonicação não é mais capaz de promover quebras, devido às características do sistema e do próprio procedimento empregado, e esse limite de quebra constitui o que se chama de sistema sonicado.

O sistema sonicado resultante irá depender do protocolo de sonicação empregado e do sistema lipídico. Existem diversos protocolos de sonicação definidos na literatura, todos a princípio levariam ao mesmo resultado, ou seja, a formação de pequenos agregados. Entretanto, a definição do controle de quão pequenos os agregados devem ficar não é uma tarefa trivial. Normalmente, protocolos de sonicação baseiam-se em técnicas auxiliares, para de forma empírica definir parâmetros como potência empregada e tempo de duração da sonicação. Os parâmetros de potência e duração do processo são extremamente dependentes do método de sonicação e do modelo de equipamento utilizado. Com o objetivo de padronizar um protocolo de sonicação, realizou-se o monitoramento da Turbidez da solução em função do tempo de sonicação, para uma potência pré-fixada de 30% da potência total do equipamento. O resultado obtido para a Turbidez em função do tempo de sonicação é apresentado na Fig.4.1.

A Fig.4.1(A) apresenta alguns perfis de Absorbância de dispersões de DODAB em função do comprimento de onda da luz incidente, e em diferentes tempos de sonicação. Através destes, torna-se evidente que o processo de sonicação provoca alterações drásticas no comportamento da Turbidez do meio. À medida que o tempo de sonicação aumenta, a Absorbância tende a diminuir,

demonstrando assim que o tempo de sonicação influencia diretamente na Turbidez. Vale ressaltar que os perfis apresentados são resultados de medidas sequenciais, ou seja, são espectros obtidos da mesma amostra mas em etapas de sonicação diferentes. É importante notar também que os perfis de Turbidez foram obtidos antes do procedimento de centrifugação, que elimina contaminantes provenientes da sonicação.

Fig.4.1 - Avaliação do efeito do processo de sonicação sobre o comportamento da Absorbância (Turbidez) de dispersões de DODAB a 2 mM e à temperatura ambiente (23° C). Em (A) apresenta-se o perfil de Absorbância em função do comprimento de onda da luz incidente para os diferentes tempos de sonicação, e em (B) apresenta-se o valor da Absorbância no comprimento de onda de 250 nm em função do tempo de sonicação do sistema. (Ver procedimento de sonicação no item 3.2)

A diminuição na intensidade da Absorbância em função do tempo de sonicação indica que grandes vesículas espalhadoras estão se tornando menores. A diminuição da Turbidez é mais bem evidenciada quando se monitora o comportamento da Absorbância para um comprimento de onda fixo, como 250 nm, em função do tempo de sonicação. Sendo assim, na Fig.4.1(B) apresenta-se o comportamento da Absorbância em 250 nm em função do tempo de sonicação. Pode-se ver que o processo de sonicação possui um limite de influência sobre a Turbidez do meio: para períodos de sonicação superiores a 10 minutos, a Absorbância não sofre mais grandes modificações.

Ao término deste procedimento de monitoramento da Turbidez de dispersões sonicadas, foi possível concluir que, para o protocolo utilizado, o sistema DODAB sofre uma redução drástica de tamanho, sendo o limite de redução de tamanho atingido em um período de sonicação de 15 minutos de duração. É importante salientar que os resultados obtidos anteriormente não eliminam a

possibilidade da presença de vesículas em solução, mas demonstram que, se elas existem, devem possuir um diâmetro médio consideravelmente menor que o encontrado no sistema não sonificado.

Estabilidade da dispersão com o tempo

O processo de sonicação impõe diversas modificações à dispersão lipídica. Em muitos casos, o sistema encontra-se em condições desfavoráveis a sua estabilidade, ou seja, muitos sistemas sonicados não se encontram em equilíbrio termodinâmico. Acredita-se que o equilíbrio termodinâmico de uma dispersão sonicada possa ser atingido através da formação de agregados maiores, mediante processos de fusão e/ou aglomeração. Para certificar-se da estabilidade do sistema sonificado, torna-se importante observar seu comportamento em função do tempo de preparo da dispersão, principalmente durante o período normal de aquisição de um experimento.

O comportamento da Absorbância no comprimento de onda de 250 nm em função do tempo de preparo para sistemas DODAB^S é apresentado na Fig.4.2(A). O resultado encontrado indica que o sistema apresenta-se instável até aproximadamente três horas após o seu preparo, e observa-se um crescimento no valor de Absorbância, de aproximadamente 2.5 % durante este período. Após este primeiro instante, curiosamente, o sistema atingiu uma estabilidade, mantendo-se neste patamar por um período de até 12 horas. O nível de estabilidade atingido pelo sistema DODAB^S demonstra que os agregados que o compõem ainda podem ser caracterizados como pequenos agregados, pois o estado final atingido está longe de ser caracterizado como típico de grandes vesículas (Absorbância_{250nm} ~ 1,6)

Com o objetivo de comparar o comportamento da estabilidade das dispersões de DODAB^S com a de outros sistemas lipídicos sonicados, monitorou-se o comportamento da estabilidade para o sistema sonificado de dispersões de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC^S). O DPPC foi escolhido como lipídio comparativo pois possui uma carga efetiva zero na região da cabeça polar e uma cauda hidrocarbônica composta de 16 carbonos. Os resultados de estabilidade para o DPPC^S são apresentados na Fig.4.2(B), onde novamente apresenta-se o comportamento da Absorbância em função do tempo de preparo.

O comportamento da Absorbância para os agregados sonicados de DPPC, na mesma concentração e condição de preparo do DODAB, demonstra que, em apenas duas horas após o preparo da dispersão, a Absorbância em 250 nm já sofreu um aumento enorme, de aproximadamente 150 %, e sem ainda atingir uma estabilidade. O monitoramento do sistema DPPC^S foi interrompido em aproximadamente duas horas, pois se considerou que o resultado já era satisfatório para o momento. O grande aumento de absorbância apresentado na Fig.4.2(B) indica

que muito provavelmente neste sistema estão ocorrendo processos de fusão e/ou aglomeração dos agregados de DPPC^S, pois somente estes efeitos justificariam um aumento tão significativo de Absorbância.

Fig.4.2 - Comportamento da Absorbância de dispersões lipídicas sonicadas (2 mM), observadas no comprimento de onda de 250 nm e à temperatura ambiente. Em (A) apresenta-se o resultado para o sistema DODAB^S em (B) apresenta-se o resultado para o sistema DPPC^S (2mM).

Comparando as duas curvas (A) e (B), constata-se que o crescimento observado para o sistema DODAB^S é muito inferior ao apresentado pelo sistema de DPPC^S, demonstrando assim que o sistema DODAB^S apresenta uma condição muito mais estável que a do sistema DPPC^S. Como todas as medidas foram realizadas em água, pode-se propor que a justificativa para a maior estabilidade do DODAB^S estaria associada a sua maior densidade de carga superficial, que então atuaria no efeito de repulsão eletrostática entre os agregados e impediria os agregados de se aproximarem formando agregados maiores, fato que não ocorre no DPPC^S.

Estabilidade da dispersão com a variação da temperatura

Outra preocupação com o sistema DODAB^S foi quanto à estabilidade da dispersão perante uma variação de temperatura. O aumento da temperatura aumenta a difusão dos agregados, que por sua vez pode aumentar a colisão entre eles e pode induzir graus de aglomeração diferentes no sistema. Para tanto, observou-se a estabilidade da dispersão quanto à variação de temperatura no intervalo de 10 a 55°C. Para cada temperatura assumida pelo sistema, esperou-se um período de 15

minutos, de forma a garantir a homogeneização da amostra. Os resultados obtidos com este procedimento são apresentados na Fig.4.3.

Fig.4.3 - Efeito da temperatura sobre o perfil de Absorbância (Turbidez) das dispersões DODAB^S (2 mM). Em (A) apresenta-se o perfil de Absorbância em função do comprimento de onda para o DODAB^S a 10°C (—) e a 55°C (.....), já em (B) apresenta-se o comportamento da Absorbância em 250nm em função da temperatura do meio.

Novamente, apresentam-se os perfis de Absorbância (Turbidez) em função do comprimento de onda da luz incidente, e em função da temperatura, para os valores de Absorbância em 250 nm. Os resultados obtidos demonstram que a Turbidez sofre uma pequena queda com o aumento de temperatura, indicando assim que o comportamento da Turbidez está sendo influenciado apenas pela resposta das propriedades ópticas dos agregados lipídicos a uma variação de temperatura, não havendo perturbações devido à aglomeração e/ou fusão.

Ao término deste item pode-se concluir que com a técnica de Turbidez é possível demonstrar: o efeito drástico da diminuição de tamanho dos agregados de DODAB^S com relação aos do DODAB^{NS}; que os agregados formados em DODAB^S são mais estáveis que os encontrados no DPPC^S; e que os agregados, num curto período de tempo, são estáveis quanto à variação de temperatura.

4.1.2 Caracterização por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A RPE é uma técnica poderosa capaz de monitorar o movimento e/ou o grau de organização de uma sonda paramagnética num determinado ambiente. A utilização da RPE neste momento teve como objetivo monitorar o grau de mobilidade e/ou ordem da sonda inserida no ambiente lipídico de agregados de DODAB não sonificado (DODAB^{NS}) e DODAB sonificado (DODAB^S), e assim obter informações sobre o a fluidez desses ambientes.

O estudo comparativo entre os ambientes encontrados em DODAB^{NS} e DODAB^S, utilizando RPE, já foi realizado no grupo de Biofísica-IFUSP em projetos anteriores (Benatti e col., 2001). Entretanto, naquela ocasião, o sistema DODAB^S utilizado era resultado do processo de sonificação por banho ultra-sônico; neste trabalho, o sistema utilizado foi obtido a partir da sonificação por ponta. A diferença no processo de preparação das dispersões não possibilita que os resultados obtidos com o sistema sonificado por banho sejam extrapolados diretamente para o sistema aqui usado, pois os processos possuem diferenças de intensidade e frequência, que podem introduzir variações, tornando então necessária a realização de uma nova caracterização estrutural para este sistema. Para tanto, inicia-se apresentando os espectros típicos dos marcadores 5 e 16-MESL, incorporados em dispersões de DODAB^{NS}.

A resposta dos marcadores inseridos ao ambiente DODAB^{NS} (Fig.4.4) confirma a idéia da existência de bicamada neste meio, pois a impressão digital deste ambiente é o gradiente de mobilidade/ordem existente entre os espectros obtidos com o marcador 5-MESL e 16-MESL - fato que ocorre para todas as temperaturas observadas.

Fig.4.4 - Espectros de RPE obtidos com os marcadores 5- e 16-MESL incorporados em sistemas lipídicos de DODAB^{NS} a 2 mM, em diferentes temperaturas de aquisição. Espectros com varredura: 100 G.

Quando os mesmos marcadores anteriores são inseridos no ambiente lipídico do sistema DODAB^S, a resposta espectral padrão observada altera-se, e os perfis assumem formas como as apresentadas na Fig.4.5.

Fig.4.5 - Espectros de RPE obtidos com os marcadores 5- e 16-MESL incorporados em sistemas lipídicos de DODAB^S a 2 mM, em diferentes temperaturas de aquisição. Espectros com varredura: 100 G.

Comparando os espectros obtidos para DODAB^{NS} (Fig.4.4) e DODAB^S (Fig.4.5), é possível verificar grandes diferenças entre eles, principalmente para temperaturas abaixo de 40°C, na faixa de temperatura na qual o DODAB^{NS} encontra-se na fase gel e seus sinais apresentam alto grau de anisotropia. Porém, os perfis obtidos para o DODAB^S apresentam-se com menor anisotropia.

Os espectros obtidos em DODAB^S, a baixas temperaturas, são espectros anômalos quando observados com relação a outros sistemas lipídicos puros na fase gel. Estes espectros apresentam um perfil que dificilmente pode ser explicado como consequência do movimento de marcadores em uma única fase lipídica, pois num mesmo espectro é possível constatar a presença de um sinal isotrópico, típico de regiões com baixo grau de empacotamento (como a fase fluida de lipídios), e

também é possível constatar a presença de um sinal anisotrópico, típico de regiões ordenadas com alto grau de empacotamento (como uma fase gel). Esta constatação indica que o sinal encontrado em dispersões de DODAB^S é na verdade o resultado de uma composição de sinais, ou seja, uma coexistência de sinais, consequência da presença de ambientes com empacotamentos muito distintos.

Espectros qualitativamente semelhantes aos apresentados na Fig.4.5 já foram obtidos anteriormente (Benatti, e col., 2001), com o procedimento de sonicação por banho para obter o DODAB^S. Naquela ocasião, duas propostas para tentar justificar estes perfis de RPE encontrados foram elaboradas: (1) a coexistência de vesículas, compostas de bicamadas e responsáveis pelo sinal mais anisotrópico à baixa temperatura (fase gel) com agregados tipo micelas, ou vesículas muito pequenas, onde os lipídios não estariam na fase gel e seriam responsáveis pelo sinal mais isotrópico; (2) considerar que o sistema é composto por fragmentos de bicamadas (bicelas), onde existiria uma coexistência de dois domínios com empacotamentos distintos, sendo um domínio correspondente às bordas do agregado, com alta mobilidade, tipo fase fluida do DODAB^{NS}, e um outro domínio correspondente ao centro do fragmento, o qual formaria uma bicamada e forneceria a informação de ambiente empacotado, tipo fase gel, à baixa temperatura.

A constatação de ambiente composto, ou coexistência de sinais, em sistemas DODAB^S pode ser melhor visualizada por um método simples, proposto também anteriormente (Benatti, e col., 2001), considerando ser possível descrever espectros experimentais obtidos em DODAB^S através da soma de dois sinais típicos de regiões com empacotamentos distintos, como por exemplo: a soma entre um sinal do marcador 16-MESL inserido em vesículas de DODAB na fase gel (baixa mobilidade), e um sinal do marcador 16-MESL inserido em micelas de C18TAB (alta mobilidade), sendo ambos na mesma temperatura. Então, esta soma de sinais foi realizada para espectros típicos de 16-MESL, a 30°C, obtidos em ambiente vesicular e em ambiente de micela, e o resultado é apresentado na Fig.4.6.

No espectro soma resultante, Fig.4.6 (2), são destacadas as contribuições de cada espectro característico, sinal isotrópico e sinal anisotrópico, para a constituição do espectro resultante, com destaque para os picos de campo baixo, onde são indicadas em azul as amplitudes “A” e “B”. O espectro soma resultante indica ser possível, mesmo sem decompor o espectro nas componentes originais, visualizar amplitudes características de um e outro sinal. A comparação entre o espectro experimental e o obtido com a soma de espectros (Fig.4.6) é apresentada na Fig.4.7.

Fig.4.6 - Apresenta espectros característicos de 16- MESL incorporados em: (1) (—) 2mM de DODAB^{NS} e (---) 2mM de C18TAB à temperatura de 30°C , juntamente com o resultado da soma entre os espectros (2) (—) C18TAB + DODAB na proporção de 25% e 75% respectivamente, calculados através das áreas (2ª integral) normalizadas dos espectros. Espectros com varredura: 100 G.

Fig.4.7 - Comparação entre o espectro experimental do marcador 16-MESL, a 30°C, incorporado em 2mM de DODAB^S (—) , com o espectro soma apresentado na Fig.4.6 (---). Espectros com varredura: 100 G.

O espectro soma utilizado na comparação com o experimental possui uma proporção de 75% de sinal anisotrópico e 25% de sinal isotrópico. Entretanto, não é possível afirmar que seja esta a relação entre lipídios em regiões mais ordenada e menos ordenada, pois os valores encontrados são dependentes da afinidade do 16-MESL pelas diferentes regiões. Por exemplo, foi observado que as partições dos marcadores 16-MESL e 16-SASL entre as duas regiões são diferentes: o 16-MESL tem maior afinidade pela região mais rígida do que o 16-SASL (Benatti e col., 2001). A boa sobreposição indica que realmente a proposta de dois ambientes é consistente, permitindo assumi-la como uma boa descrição do sistema. Porém, este resultado não garante que a fase ordenada encontrada no DODAB^S, seja uma fase gel idêntica à encontrada em sistemas vesiculares DODAB^{NS}, pois apesar de serem muito semelhantes à 30°C, os sinais para temperaturas mais baixas, como 15°C, apresentam-se com características de empacotamento diferentes, sendo a fase gel do DODAB^{NS} mais ordenada que o sinal anisotrópico do DODAB^S. Outra observação referente aos resultados da Fig.4.7 seria que não é possível responder se estes sinais são oriundos de diferentes ambientes em um mesmo agregado ou são sinais de dois agregados distintos. Esta é uma questão que permanece em aberto. O que se pode dizer é que a troca de marcadores de spin entre os dois meios é lenta na escala do RPE (10^{-9} s).

A dificuldade agora está em como interpretar este espectro composto de forma a obter informações sobre o grau de mobilidade médio das sondas inseridas nestes agregados. O parâmetro mais fácil de ser obtido destes espectros compostos é a largura do pico central, conhecida como ΔH_0 , que decresce com o aumento de mobilidade da sonda. Esse é um bom parâmetro para sinais únicos, e no caso de sinais compostos ele é incapaz de distinguir o ambiente no qual a sonda está inserida, fornecendo assim uma informação média global do sistema.

A comparação dos valores de ΔH_0 obtidos para o DODAB^S com os obtidos para sonda inserida no ambiente de DODAB^{NS} fornece uma idéia da diferença média de mobilidade dos marcadores de spin incorporados nos agregados. Sendo assim, apresenta-se na Fig.4.8 os valores de ΔH_0 para os marcadores 5- e 16-MESL, nos dois sistemas.

Como esperado, verifica-se na Fig.4.8 que o sistema DODAB^S, a baixas temperaturas, em média, possui maior fluidez do que o sistema DODAB^{NS}. Outra observação importante está relacionada ao comportamento do parâmetro em função da temperatura; para o sistema DODAB^{NS} observa-se a grande diminuição de mobilidade, por volta de 40°C, que pode ser identificado como a transição de fase gel-fluida do sistema lipídico. Porém, para o sistema DODAB^S, não se observa com boa definição esta mesma diminuição de mobilidade, apenas observa-se um aumento gradual da mobilidade em função da temperatura, indicando que, se existe uma transição de fase, ela é pouco cooperativa.

Fig.4.8 - Comparação entre os parâmetros ΔH_0 obtidos para os espectros dos marcadores 5- e 16-MESL inseridos em sistemas DODAB^{NS} (■) e DODAB^S (□), em função da temperatura.

Espectros associados a marcadores com alta taxa de difusão são analisados a partir da teoria de Redfield (ver item 2.3). Os parâmetros escolhidos nesta etapa para monitorar o movimento das sondas nas dispersões a altas temperaturas foram os tempos de correlação “ τ_B ” e “ τ_C ”, os quais estão relacionados ao coeficiente de difusão rotacional da sonda utilizada. Estes parâmetros são obtidos a partir da relação entre as alturas dos picos espectrais, e devem assumir valores semelhantes para situações onde a sonda descreva movimentos isotrópicos. Portanto, para comparar as estruturas das fases fluidas de DODAB^{NS} e DODAB^S, foram calculados os tempos de correlação rotacional do 16-MESL incorporado aos agregados. Os tempos τ_B e τ_C são parecidos, indicando movimentos razoavelmente isotrópicos. Entretanto, é muito curioso observar que a fase fluida das bicamadas lipídicas (região central, monitorada pelo 16-MESL) presentes em dispersões de DODAB^{NS} é mais fluida do que a estrutura dos agregados de DODAB^S, nas mesmas temperaturas (menores tempos de correlação). Resultados semelhantes foram encontrados com o marcador de spin derivado de ácido esteárico, 16-SASL (Benatti, e col., 2001). Para comparação, estão colocados na Fig.4.9 os valores dos tempos de correlação rotacional encontrados para o 16-MESL em micelas de C18TAB: em uma micela a fluidez ainda é muito maior do que aquela observada em bicamadas fluidas de DODAB^{NS} (menores τ s). Ainda comparando os agregados de DODAB^{NS} e DODAB^S, os valores dos desdobramentos hiperfinos isotrópicos estão mostrados na Fig.4.10 (ver

item 2.3 – Polaridade do meio. O “ a_0 ” é um parâmetro que tende a aumentar quando aumenta a probabilidade de formação de ligações de hidrogênio com o grupo N-O). Apesar de semelhantes, a presença de moléculas de água em DODAB^{NS} parece ser ligeiramente menor do que em DODAB^S (menor valor de a_0 , ver item 2.3) sendo que as micelas de C18TAB, como esperado, são, sem dúvida, muito mais hidratadas.

Fig.4.9 - Comparação entre os tempos de correlação rotacional do 16-MESL incorporado em DODAB^{NS} (■), DODAB^S (□) e C18TAB (★).

Fig.4.10 - Comparação entre os desdobramentos hiperfinos isotrópicos do 16-MESL incorporado em DODAB^{NS} (■), DODAB^S (□) e C18TAB (★).

Ao término deste procedimento é possível concluir que realmente a técnica de RPE é capaz de distinguir a existência de dois ambientes com empacotamentos distintos no sistema DODAB^S. Como consequência, as sondas no ambiente DODAB^S, a baixas temperaturas, apresentam-se, em média, com maior mobilidade do que as sondas inseridas no ambiente DODAB^{NS}. A menor fluidez observada a altas temperaturas para agregados de DODAB^S, comparada a de bicamadas de DODAB^{NS} é intrigante, e necessita maior investigação quanto à estrutura dos agregados presentes em DODAB^S.

4.1.3 Caracterização por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O uso da técnica de DSC tem como objetivo principal a obtenção da variação da capacidade calorífica dos sistemas em resposta a uma curva de aquecimento. O estudo das propriedades de capacidade calorífica de uma dispersão lipídica é interessante, pois através dele é possível a obtenção de informações sobre o comportamento termodinâmico da fase lipídica, permitindo avaliar a interação entre as moléculas que a compõem. Inicia-se este item apresentando o comportamento padrão de uma transição de fase em sistema DODAB^{NS} e em seguida apresenta-se o comportamento para o sistema DODAB^S.

Comportamento padrão para o sistema DODAB^{NS}

Quando o sistema DODAB^{NS} é submetido a um aquecimento de 5 a 60°C, a pressão constante, observa-se que o excesso de capacidade calorífica ($\Delta C_p = C_p^{\text{DODAB} + \text{buffer}} - C_p^{\text{buffer}}$) por mol de lipídio possui uma dependência com a temperatura conforme apresentado na Fig.4.11.

Fig.4.11 - Reprodutibilidade dos termogramas de aquecimento, obtidos para dispersões de DODAB^{NS} (2 mM), em diferentes dias de preparo (perfis nas diferentes cores). Velocidade de varredura: 45 °C/h.

No perfil apresentado na Fig.4.11 constata-se a presença de dois picos, T_p e T_m . A presença destes picos, durante o processo de aquecimento, pode ser interpretada como o efeito de transições de fase endotérmicas. Um perfil de ΔC_p em função da temperatura, como o apresentado para o sistema DODAB^{NS}, é analisado como consequência de dois eventos subsequentes: um evento correspondendo à região do primeiro pico e um segundo evento correspondendo à região do segundo pico.

O evento associado ao primeiro pico (T_p) da curva de ΔC_p , em sistemas lipossômicos comuns como os compostos por PC (fosfatidilcolina), é normalmente associado a uma transição entre estados do tipo gel $\rightarrow$ ripple, comumente denominado de pré-transição. A pré-transição é tratada como uma alteração na estrutura do estado gel, onde alguns lipídios do sistema sofrem um rearranjo espacial que favorece a formação de uma estrutura ondulada ripple, na tentativa de minimizar os efeitos da interação entre as cabeças polares (Seddon e Cevc, 1993).

Estudos de caracterização estrutural da correspondente transição T_p , para o sistema DODAB^{NS} ainda permanecem escassos na literatura. Atualmente não é possível afirmar que o primeiro pico (T_p) corresponde a uma transição do tipo gel $\rightarrow$ ripple. A proposta até o momento considera que o sistema na fase gel sofre transição para a uma fase intermediária, que ainda não possui propriedades características de uma fase fluida, mas também não pode ser caracterizada como uma típica fase gel.

A transição da fase gel para a fase intermediária do sistema DODAB^{NS} possui algumas propriedades interessantes, sendo uma delas o fato de estar condicionada ao estado de organização inicial da própria fase gel. Observou-se que sistemas que não sofrem resfriamento a temperaturas abaixo de 15°C não apresentam o primeiro pico (T_p) no termograma de aquecimento, fato que é observado normalmente em sistemas resfriados. Esta afirmação pode ser constatada na Fig.4.12, onde se apresentam os termogramas para o sistema DODAB^{NS} resfriado (A) e para o não resfriado (B). Outra constatação interessante sobre o resultado da Fig.4.12 está relacionado à análise das variações de entalpia dos picos T_m , pois para ambas as medidas não se observaram diferenças significativas entre os valores obtidos. Isso indica que a transição T_p não deve estar contribuindo significativamente para a transição principal. Observou-se também que a T_p somente é observada para varreduras de aquecimento: em varreduras de resfriamento a T_m sofre um deslocamento, para valores menores, e a T_p desaparece (resultados não apresentados). Estes resultados são muito interessantes, porém, o estudo detalhado do comportamento desta transição não é objeto do presente trabalho, e deverá ser mais bem explorado no futuro.

Fig.4.12 - Termograma de aquecimento para as dispersões de DODAB^{NS} (2 mM) resfriado abaixo de 15°C (A) e não resfriado abaixo de 15°C (B). Velocidade de varredura: 45°C/h

O evento associado ao segundo pico de variação de capacidade calorífica (T_m), apresentado na Fig.4.11, corresponde ao que realmente denomina-se de transição principal de primeira ordem e associa-se a uma transição do sistema para o estado fluido. O estado fluido é um estado com grande desordem molecular e com características bem diferentes às encontradas para o estado gel. No

trabalho foram realizadas diversos experimentos de DSC para o sistema DODAB^{NS}; sendo assim, os parâmetros médios obtidos para as transições “T_p” e “T_m” são apresentados na Tab.4.1.

Tab.4.1 - Parâmetros médios obtidos para o comportamento dos picos de ΔC_p , observados nos termogramas do sistema DODAB^{NS} (2mM).

	Temp. (°C)	Δt (°C)	ΔH (kcal/mol)
T _p	35,5 ± 0.3	0,7 ± 0.3	4,9 ± 2.5
T _m	44,9 ± 0.1	0,4 ± 0.1	9,6 ± 1.4

* Os valores apresentados constituem o resultado da média de quatorze amostras de DODAB^{NS} a 2mM.

Na Tab.4.1, “Temp.” corresponde à posição no centro do pico de transição, “ Δt ” corresponde à largura do pico de transição a meia altura e “ ΔH ” é a variação de entalpia de transição.

Comportamento padrão para o sistema DODAB^S.

Como já foi dito, o processo de sonicação de sistemas lipossômicos pode promover diversas alterações no grau de organização e de interação das moléculas que compõem o agregado. Com o uso da técnica de DSC é possível avaliar algumas destas modificações através do comportamento da variação da capacidade calorífica do sistema. Sendo assim, inicia-se este item apresentando, na Fig.4.13, alguns perfis de “ ΔC_p ” obtidos para o sistema DODAB^S.

Fig.4.13 - Reprodutibilidade dos termogramas de aquecimento, obtidos para dispersões de DODAB^S (2 mM), em diferentes dias de preparo (perfis nas diferentes cores). Velocidade de varredura: 45°C/h.

Como se pode observar na Fig.4.13, os termogramas obtidos para o sistema DODAB^S ainda apresentam picos em seu perfil característico, mas muito largos. Não se observa a presença de picos na região de temperatura de 45°C, que corresponde à temperatura T_m no sistema DODAB^{NS}. Este fato indica que não devem existir regiões significativas de típica fase gel nos agregados lipídicos de DODAB^S. Portanto, os resultados de DSC apontam para a 2ª hipótese levantada no item anterior: a existência de fragmentos de bicamada (bicelas), onde coexistiriam fase gel e fase fluida a baixas temperaturas, e não a existência de uma pequena população de vesículas, que seria responsável pela fase gel a baixas temperaturas. Os picos de “ ΔC_p ” para o termograma de DODAB^S representam o comportamento termotrópico do sistema sonificado, ainda não muito bem compreendido.

Realizando uma análise qualitativa dos resultados da Fig.4.13, é possível constatar que a reprodutibilidade do perfil de “ ΔC_p ” para o sistema DODAB^S não é boa, e indica que o procedimento de sonicação pode imprimir flutuações à distribuição de agregados. Tentar justificar estas pequenas variações entre as amostras torna-se uma tarefa árdua e não será aqui realizada.

Nos perfis apresentados na Fig.4.13, é possível a visualização nítida de pelo menos dois picos, T_1 e T_2 , que podem apresentar intensidades relativas diferentes nas várias amostras; porém, as posições de ocorrência dos picos apresentam certa reprodutibilidade e indicam que os picos podem estar associados a características específicas do sistema. O procedimento de sonicação foi reproduzido mais algumas vezes, e o resultado médio para os parâmetros obtidos, a partir dos picos de ΔC_p , são apresentados na Tab.4.2.

Tab.4.2 - Parâmetros médios obtidos para o comportamento dos picos de ΔC_p observados nos termogramas do sistema DODAB^S(2mM).

	Temp. (°C)	Δt (°C)	ΔH (kcal/mol)
T₁	37,0 ± 0.9	5 ± 2	5 ± 1
T₂	41,6 ± 0.3		

*Os valores apresentados constituem o resultado da média de sete amostras DODAB^S à 2mM.

Onde T_1 e T_2 correspondem às posições médias de ocorrência dos picos, Δt corresponde à largura média à meia altura do pico que compreende T_1 e T_2 , e ΔH representa a variação de entalpia sofrida pelo sistema na região dos dois picos. O valor de ΔH é aproximadamente metade do valor encontrado para a transição principal de DODAB^{NS} (ver Tabela 4.1).

Para facilitar avaliação dos efeitos causados pelo processo de sonicação ao perfil de “ ΔC_p ” do sistema DODAB^S, comparou-se os perfis obtidos para o sistema DODAB^S e os obtidos para o DODAB^{NS}. A comparação entre eles é apresentada na Fig.4.14.

Através da Fig.4.14 é possível constatar que o perfil obtido para o sistema DODAB^S apresenta-se com picos muito menos intensos e cooperativos que os encontrados no sistema DODAB^{NS}, em posições diferentes e com o intervalo de temperatura de ocorrência maior. A suavização da passagem entre as fases, no sistema DODAB^S, pode ser interpretada como perda da cooperatividade da transição, o que estaria de acordo com a presença de fragmentos de bicamadas.

Fig.4.14 - Comparação entre os termogramas padrões obtidos para dispersões (2 mM) de DODAB^{NS} (.....) e DODAB^S (—). Velocidade de varredura: 45 °C/h.

Os resultados obtidos com DSC para o DODAB^S corroboram os obtidos por RPE, através do qual monitorando-se os valores de largura de linha, também constatou-se uma suavização da transição de fase, juntamente com uma diminuição média do empacotamento molecular na fase gel.

Para reforçar a discussão acima, analisa-se agora o comportamento da variação de entalpia por mol em função da temperatura (Fig.4.15). Constata-se que o sistema DODAB^S necessita de uma menor quantidade de energia para assumir um novo estado. A diminuição na entalpia pode ser consequência da presença de lipídios na fase desordenada, pois como a normalização da variação de entalpia no pico de “ ΔC_p ” é realizada sobre a quantidade total de lipídios, tem-se que os lipídios na fase desordenada não contribuem significativamente com a variação de entalpia, e parte da diminuição da energia média absorvida por molécula se deve a lipídios nesta fase. Porém, esta proposta justifica parcialmente a diminuição da variação de entalpia, pois como o perfil de DODAB^S difere do perfil de transição observado para o sistema DODAB^{NS}, espera-se também que

a diminuição na entalpia possa estar refletindo uma variação na estrutura das fases ordenadas do sistema.

Fig.4.15 - Comparação entre o comportamento da variação de entalpia “ ΔH ” em função da temperatura, para dispersões (2 mM) de DODAB^{NS} (.....) e DODAB^S (—).

Após este procedimento com DSC, pode-se concluir que o comportamento encontrado nos sistemas estão em convergência com os resultados apresentados anteriormente na literatura (Brito e Marques, 2005; Benatti e col., 1999; Cocquyt e col., 2004). Com eles, concluímos a não existência de uma extensa região de fase gel a baixas temperaturas, em DODAB^S, o que teria dado origem a um pico estreito, mesmo que pouco intenso, em torno de 45 $^{\circ}\text{C}$. Portanto, os resultados sugerem a presença de fragmentos de bicamadas ou bicelas, onde coexistiriam fase e fase fluida.

4.2 Interação da AB com dispersões de DODAB

Após a caracterização estrutural realizada no item 4.1, torna-se possível iniciar o estudo detalhado das consequências da interação entre a AB e as dispersões de DODAB. Nos próximos itens serão apresentados resultados obtidos para o monitoramento dessa interação, com as diferentes técnicas experimentais já apresentadas, seguindo a mesma ordem de apresentação do item anterior: primeiramente, os resultados obtidos com a espectroscopia de Absorção Óptica; em seguida, os resultados com RPE e, por fim, os resultados com DSC.

4.2.1 Monitoramento da interação AB - dispersões de DODAB por Absorção Óptica

Como já discutido anteriormente, a AB é uma molécula pouco solúvel em água. Sistemas lipídicos, em meio aquoso, formam pequenos ambientes apolares que constituem uma nova fase no meio aquoso, normalmente chamada de fase lipídica. A presença deste novo ambiente pode promover perturbações no equilíbrio do sistema AB-água, induzindo uma redistribuição das moléculas nos diferentes ambientes (Witzke e Bittman, 1984; Chen e Bittman, 1977; Strauss, 1981). A quantidade de moléculas de AB distribuída nos diferentes ambientes será determinada por características específicas da própria molécula e por características do próprio ambiente constituído no meio.

Diferentes propriedades da fase lipídica podem influenciar a partição da AB em meio aquoso. Uma destas propriedades seria com relação ao tamanho característico dos agregados lipídicos formados na dispersão. Existem diferentes evidências demonstrando que lipossomos com tamanhos característicos diferentes tendem a imprimir equilíbrios de partição diferentes à AB (Bolard, e col., 1984; Milhaud e col., 1989). A justificativa para essa diferença pode estar associada ao fato dos diferentes sistemas possuírem diferentes raios de curvatura, o que pode modular a acessibilidade da AB ao ambiente apolar. A técnica de Absorção Óptica apresenta-se como uma das principais ferramentas para o monitoramento dos diferentes estados de associação da AB nos diferentes meios em que ela possa estar. Desta forma, a Absorção Óptica será utilizada neste momento com o objetivo de avaliar as influências da presença do ambiente lipídico no estado de associação da AB.

Antes de iniciar a apresentação dos dados propriamente ditos, é preciso, primeiramente, demonstrar como foi realizada a análise do perfil de absorção, pois os espectros obtidos para AB, principalmente na presença de dispersões de DODAB^{NS}, não apresentaram um comportamento padrão, e uma forma alternativa de análise foi elaborada.

Análise do espectro de Absorção Óptica da AB em dispersões de DODAB

A aquisição de um espectro de Absorção Óptica tradicional, em um espectrofotômetro de feixe único, ocorre coletando-se primeiramente o perfil de absorção da solução na ausência da molécula a ser estudada, que é chamado vulgarmente de “espectro branco”. Em seguida coleta-se o espectro da solução completa, já com presença da molécula a ser estudada. Então, realiza-se a subtração entre o espectro completo e o espectro branco, obtendo-se o espectro da molécula de interesse. Entretanto, este procedimento não pode ser realizado para o sistema AB_DODAB^{NS}, pois, ao coletar os perfis de absorção do sistema, deparou-se com espectros como os apresentados na Fig.4.16. Isto fez surgir o questionamento sobre como analisar essas curvas, já que o perfil da AB em presença de DODAB^{NS} apresenta-se menos intenso em algumas regiões de comprimento de onda, em comparação ao perfil de espalhamento do DODAB^{NS}, portanto a subtração dos espectros forneceria como resultado absorbâncias negativas. Este fato indica que a partição da AB no ambiente lipídico está alterando as propriedades dos agregados de DODAB, pois reduz a intensidade do espalhamento da luz.

Fig.4.16 - Comportamento da Absorbância em função do comprimento de onda da luz incidente para dispersões de DODAB^{NS} (2 mM) na presença (.....) e na ausência (—) de 24μM de AB (1,2 mol %), nos dois estados da fase lipídica, fase gel e fase fluida.

Para tentar solucionar este problema, considerou-se primeiramente que o perfil de absorção observado para soluções de DODAB^{NS}, na ausência de AB, é prioritariamente resultado do efeito de espalhamento de luz, ou seja, o perfil observado para o DODAB^{NS} representa o comportamento da

Turbidez do meio. Em seguida, recorreu-se à teoria de espalhamento de luz, para de uma forma empírica tentar ajustar um perfil de Turbidez sob o perfil de absorção da AB, e assim possibilitar a subtração do efeito de espalhamento da dispersão de DODAB^{NS} na presença de AB.

Para obtenção do efeito de espalhamento do sistema DODAB^{NS} em presença de AB, definiu-se primeiramente dois intervalos, de 230 a 260 nm e de 460 a 820 nm, como intervalos característicos do puro espalhamento da dispersão (estas regiões estão indicadas na Fig.4.16). Considerando o espectro nestes dois intervalos de comprimento de onda, ajustou-se, então, uma função de intensidade de espalhamento de 230 e 820 nm. Com isto, esperava-se mimetizar o efeito de espalhamento sob a absorção da AB. A função espalhamento utilizada neste procedimento é apresentada em Eq.(4.1), a qual foi definida em detalhes no apêndice E.

$$A = -\log \left[1 - \left(P_1 + \frac{P_2}{\lambda^{P_3}} \right) \right] \quad \text{Eq.(4.1)}$$

O “A” representa a grandeza absorbância, “ λ ” é o comprimento de onda da luz incidente e os “P’s” representam os parâmetros ajustáveis da função. Na Fig.4.17 apresenta-se a sobreposição do resultado obtido para o ajuste com a função de espalhamento, Eq.(4.1), o espectro experimental, juntamente com o resultado da subtração entre os espectros, para o sistema DODAB^{NS} na fase fluida.

Fig.4.17 - Comparação entre o espectro de absorção óptica obtido para a dispersão AB_DODAB^{NS} (1,2 mol%) na fase fluida (—) e o perfil de Turbidez (.....) obtido a partir do ajuste da curva experimental com a Eq.(4.1) ($P_1=0,0$, $P_2=50791,2$, $P_3= 2,004$). Em detalhe na figura apresenta-se o resultado para a subtração entre as duas curvas apresentadas. ($T = 50^\circ\text{C}$).

Observando a Fig.4.17, constata-se que o ajuste apresenta boa sobreposição com o espectro experimental, indicando assim que o modelo empregado comporta-se satisfatoriamente. O resultado da subtração entre os espectros apresenta um perfil muito semelhante ao encontrado para AB apenas na presença de água (Fig.4.19). Desta forma, adotou-se este procedimento para a análise de todos os espectros da AB na presença de DODAB^{NS}.

A discussão realizada anteriormente concentrou-se em dispersões de DODAB^{NS}, pois a situação de análise para as dispersões de DODAB^S é muito diferente. Como a Turbidez do sistema DODAB^S é muito inferior à intensidade de absorção da AB, a influência do espalhamento de luz sobre o perfil de absorção é muito pequena. Portanto, a realização do procedimento padrão de aquisição é suficiente para uma boa análise do espectro, com exceções apenas para situações onde as concentrações de AB sejam extremamente pequenas, o que não foi o caso neste trabalho. Na Fig.4.18 são apresentados os perfis de Absorbância encontrados para dispersões de DODAB^S na ausência e presença de AB.

Fig.4.18 - Comportamento da Absorbância em função do comprimento de onda da luz incidente para dispersões de DODAB^S (2 mM) na presença (.....) e na ausência (—) de 24 μ M de AB (1,2 mol %) à temperatura ambiente (23°C).

Após a definição do procedimento de análise dos espectros de absorção, pode-se então partir para a apresentação dos dados propriamente ditos.

Resultados experimentais

Inicia-se apresentando os dados que monitoraram o efeito do tamanho/estrutura do agregado lipídico sobre o estado de associação da AB. O efeito de tamanho/estrutura dos agregados sobre a partição da AB pode ser observado quando se compara o comportamento da AB na presença de um sistema sonificado (ou seja, fragmentado) (DODAB^S) e um sistema não sonificado, que tende a formar grandes lipossomos (DODAB^{NS}). Ambos estão à temperatura ambiente (23° C) (Fig.4.19).

O perfil do espectro de Absorção Óptica da AB é uma característica capaz de informar o estado de associação da mesma num determinado meio. Desta forma, quando se analisa a Fig.4.19(A), que apresenta espectros da AB em água e na presença dos agregados de DODAB^S, observa-se que o perfil preto, AB dispersa em água, possui características de AB no estado agregado; já o perfil vermelho, onde apresenta-se a AB na presença de DODAB^S, mostra-se um perfil característico de AB no estado monomérico (ver Fig.1.6 no item 1.1). Esse resultado, então, demonstra que a presença do ambiente lipídico realmente impõe ao sistema uma nova forma de organização. Para esse caso, predominantemente o estado monomérico.

Fig.4.19 - Perturbação ao espectro de absorção óptica da AB (24μM), na temperatura ambiente (23°C) e dispersas em água (—), devido à presença de sistemas lipídicos (.....), DODAB^S (A) e DODAB^{NS} (B).

Na Fig.4.19(B), novamente são apresentados espectros de AB em duas situações: em preto o espectro de AB dispersa em água e em vermelho a mesma amostra misturada a dispersão de DODAB^{NS}. Como é facilmente visualizado, o perfil de absorção para a AB na presença do DODAB^{NS} possui novamente características diferentes ao padrão em água somente. Entretanto, apresenta-se numa forma mais complexa do que o encontrado em DODAB^S, pois se observa que o espectro aparenta ser uma sobreposição de sinais, ou seja, uma combinação entre o espectro da AB no estado monomérico e o espectro da AB no estado agregado. Isso indica uma coexistência de populações neste meio.

Portanto, os resultados mostrados na Fig.4.19 demonstram que, para as concentrações de AB e DODAB utilizadas, praticamente toda a AB na presença de DODAB^S encontra-se no estado monomérico, e somente parte da AB na presença do sistema DODAB^{NS} encontra-se no estado monomérico. Esse resultado, então, justifica a proposta de que agregados de diferentes tamanhos/estruturas perturbam o sistema diferentemente, e propõe que o ambiente lipídico em DODAB^S permite à AB permanecer no estado monomérico mesmo a grandes concentrações, diferentemente de quando somente dispersa em água.

A afirmação de que a AB no estado monomérico está acomodada no ambiente lipídico pode ser confirmada quando se avalia a posição espectral do primeiro pico de absorção do perfil monomérico (transição 0-0, $\lambda \approx 414$ nm), pois, conforme discutido no apêndice B, a posição do pico de absorção da AB no estado monomérico depende de características físicas do meio onde ela está inserida. A AB no estado monomérico, dispersa em água ($\epsilon = 79$), possui a posição correspondente ao primeiro pico de absorção em 409 nm; já a AB monomérica inserida em DMSO ($\epsilon = 47$) tem sua posição de primeiro pico deslocada para 417 nm. Como a resposta da AB em presença da dispersão lipídica indica uma posição de primeiro pico em 414 e 415 nm, tem-se que o ambiente observado pela AB se assemelha muito mais a um ambiente com comportamento similar ao DMSO do que a um ambiente similar à água. Portanto, é possível considerar que para ambos os sistemas, DODAB^{NS} e DODAB^S, o centro absorvedor de luz (heptaeno) da AB no estado monomérico está inserida em um ambiente relativamente hidrofóbico do agregado lipídico.

Com os resultados anteriores, de resposta à variação de tamanho do agregado lipídico, torna-se interessante tentar avaliar outras propriedades do ambiente lipídico que podem influenciar a partição ou grau de organização da AB. Estudos sinalizam que o estado de organização das cadeias hidrocarbônicas pode influenciar o comportamento da AB no meio aquoso (Bolard, 1986; Coutinho e Prieto, 1995), pois propõe-se que a AB interaja diferentemente com lipossomos que estejam na fase gel e lipossomos que estejam na fase fluida. Como este estudo ainda não havia sido realizado para dispersões de DODAB, achou-se interessante a realização do mesmo. Portanto, com esse

intuito avaliou-se o padrão de resposta da AB quanto às propriedades de organização das cadeias hidrocarbônicas do sistema DODAB^{NS}. Sendo assim, para a realização desta análise, observaram-se os espectros de absorção da AB na presença dos sistemas DODAB^{NS} na fase gel (23° C) e na fase fluida (50° C), onde os resultados obtidos são apresentados na Fig.4.20.

Avaliando-se o perfil de absorção obtido para o sistema DODAB^{NS} fase gel e DODAB^{NS} fase fluida, Fig.4.20, observa-se nitidamente que a maior proporção de AB no estado monomérico é encontrada para o sistema DODAB^{NS} na fase gel, pois se observa uma menor contribuição da banda de valores inferiores (336 nm), típica de AB no estado agregado, e uma maior presença das bandas vibrônicas (416 nm), indicando então que a fase fluida do sistema DODAB^{NS} possui um ambiente com menor facilitação ao estado monomérico da AB.

Fig.4.20 - Comparação entre as influências sobre o espectros de absorção da AB 24µM, dispersas em água, devido a presença de sistemas lipídicos DODAB^{NS} na fase gel (.....) (T = 23°C) e sistemas DODAB^{NS} na fase fluida (—) (T = 50°C).

Para melhor analisar a fração de AB que se apresenta no estado monomérico, para o sistema na fase gel e na fase fluida, definiu-se um método onde se comparou os espectros experimentais obtidos nos diferentes sistemas com espectros padrões, que sabidamente são resultados da AB no estado monomérico e no estado agregado. O resultado da comparação dos espectros pode ser avaliado a partir do parâmetro chamado de “C”, que assume o valor “1” para o espectro da AB

monomérica e assume um valor “0” para o espectro da AB no estado agregado, em solução aquosa. Este parâmetro foi definido na Eq.(3.1) (para maiores detalhes, olhar item 3.2).

$$C = \frac{\left[\frac{A_{414}}{A_{388}} \right]_{Exp} - \left[\frac{A_{414}}{A_{388}} \right]_{Ag}}{\left[\frac{A_{414}}{A_{388}} \right]_M - \left[\frac{A_{414}}{A_{388}} \right]_{Ag}}$$

Sendo assim, calculou-se então o parâmetro C para a AB na presença do DODAB^{NS}, na fase gel e na fase fluida, onde os valores obtidos foram de 0,66 e 0,47, respectivamente. Considerando a curva simulada para a variação do parâmetro C em função da concentração de AB no estado monomérico (ver Fig.3.8 do item 3.2) como uma curva de calibração, pode-se então tentar propor uma estimativa para a fração de AB monomérica na presença do sistema DODAB^{NS}. Realizando-se esta estimativa, obteve-se que para a fase gel, a fração de AB monomérica é de aproximadamente 40% da concentração total de AB (24μM), e para a fase fluida a fração de AB é de aproximadamente de 23% da concentração total.

Como foi observado anteriormente, o sistema DODAB^S favorece em muito a permanência da AB no estado monomérico. O estado de associação da AB no ambiente lipídico é uma propriedade que depende de vários fatores, sendo um dos mais importantes a relação molar AB:lipídio. Acredita-se que à medida que a relação molar aumenta, ou seja, aumenta-se a concentração de AB mantendo-se a concentração de lipídio constante, agregados de AB começam a surgir até mesmo no próprio ambiente lipídico (Gagos e col., 2001; Milhaud e col., 2002). Como discutido anteriormente (item 1.1), considerando a menor toxicidade da AB no estado monomérico, tem-se então um maior interesse em trabalhar com a AB em sua totalidade no estado monomérico. Portanto, torna-se interessante tentar avaliar o limite de concentração em que a totalidade de AB se mantém no estado monomérico, para uma concentração fixa de lipídio. O estudo de variação da relação molar de AB foi realizado, e o resultado é apresentado na Fig.4.21.

Fig.4.21 - Espectros de absorção óptica da AB para diferentes frações molares de AB: **0,5 mol%** (**10 μM**) , **0,6 mol%** (**12 μM**), **1,2 mol%** (**24 μM**) e **1,8 mol%** (**36 μM**) , na temperatura ambiente (23°C) e na presença de DODAB^S (2 mM)

Na Fig.4.21 são apresentados alguns espectros obtidos para o sistema AB_DODAB^S, em diferentes relações molares de AB. Observando os perfis obtidos, aparentemente todos os espectros apresentam um comportamento de AB em sua totalidade monomérico. Porém, para a confirmação desta impressão deve-se novamente utilizar-se do parâmetro C, que permite avaliar as diferentes amostras de AB_DODAB^S, nas diferentes relações molares, e quantificar a fração de AB na forma monomérica. Desta forma, os resultados médios do parâmetro são apresentados na Fig.4.22.

Fig.4.22 - Comportamento do parâmetro “C” obtido para o sistema AB_DODAB^S, em função da relação molar AB:lipídio (A). Comportamento da Absorbância obtida nos espectros de absorção do sistema AB_DODAB^S, para as posições 414 nm (■) e 388nm (●) nas diferentes relações molares (B).

Na Fig.4.22(A) apresenta-se o resultado do parâmetro C, prioritariamente para três relações, os pontos pretos no gráfico, onde foram calculados valores médios e incertezas, com o estudo de 5 amostras para cada relação. Essas representam as relações que mais freqüentemente foram utilizadas no trabalho. Avaliando-se então a resposta para essas três relações, verifica-se primeiramente que o sistema apresenta uma grande incerteza em todas as medidas, muito devido à não reprodutibilidade no preparo do sistema DODAB^S. Mas, apesar disto, ainda é possível constatar uma tendência de comportamento da AB, onde observa-se que, à medida que se aumenta a relação molar, o parâmetro se afasta da unidade.

Os pontos, (★), na Fig.4.22(A) representam medidas realizadas a partir de um mesmo preparo de DODAB^S, portanto, menos influenciadas pelos efeitos referentes ao preparo da dispersão. Observando o comportamento do parâmetro em função da relação molar, constata-se que estes seguem a mesma tendência apresentada para as três principais relações, indicando que o espectro da AB está se tornando menos parecido com o espectro da AB monomérica conforme se aumenta a relação de AB. Com este resultado é possível propor que o limite para AB manter-se, prioritariamente, no estado monomérico, em dispersões de DODAB^S 2mM, está próximo da relação de 1,2 mol%: para relações maiores já se teria o início da formação de alguns agregados.

Para enfatizar a discussão, apresenta-se na Fig.4.22(B), os valores de Absorbância para os picos de absorção, 414 nm e 388 nm, obtidos nos espectros experimentais a partir dos quais

calculou-se o parâmetro C, apresentados como pontos vermelhos na Fig.4.22(A). Como também pode ser constatado, é possível observar uma perda de linearidade nos picos de absorção próximo à relação 1,2 mol%, indicando também uma mudança de padrão na absorção para relações maiores.

Para complementar os resultados anteriores, um controle importante ao sistema AB_DODAB^S seria observar o comportamento do estado de organização da AB em função da variação de temperatura. Desta forma, verificou-se o comportamento dos espectros de absorção de AB para uma variação da temperatura, no intervalo de 25°C a 45°C, e o resultado encontrado é apresentado na Fig.4.23.

Fig.4.23 - Espectros de absorção da AB na presença do sistema DODAB^S em quatro diferentes temperaturas (25, 35, 40, 45°C) (A). Valores da Absorbância, obtidos nos espectros apresentados em (A) e em mais alguns espectros complementares, para a posição de 414 nm, em função da temperatura (B).

O resultado obtido indica que o estado de organização da AB altera-se muito pouco em função da variação de temperatura, indicando que a associação entre AB_DODAB^S possui grande estabilidade. Vale salientar que o intervalo de aquisição para cada temperatura foi de apenas 15 minutos.

4.2.2 Monitoramento por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foi utilizada com o intuito de avaliar as modificações estruturais induzidas no ambiente lipídico de dispersões de DODAB por moléculas de AB. As dispersões estudadas foram as de DODAB^S e DODAB^{NS}, as quais foram monitoradas novamente com os marcadores 5- e 16-MESL, em presença de AB e em diferentes temperaturas.

O efeito da interação da AB em dispersões de DODAB^{NS}

Os efeitos induzidos pela AB em um dado ambiente lipídico têm sido objeto de diversos estudos na literatura (Fournier e col., 1998; Gabrielska e col., 2006; Wojtowicz e col., 1998). O interesse nestes estudos ocorre devido à possibilidade de se obter informações sobre o mecanismo de ação da AB, já que dispersões lipídicas podem constituir modelos miméticos de uma membrana plasmática celular. Atualmente, acredita-se que a composição lipídica modula as propriedades de interação entre a AB e um dado sistema lipídico. A avaliação por RPE da interação da AB com dispersões de DODAB ainda é um tópico pouco explorado na literatura, pois na busca realizada não foram encontrados relatos anteriores. Como o DODAB é um lipídio que possui uma cabeça polar carregada positivamente e com baixo volume de ocupação, torna-se interessante a avaliação do comportamento da interação para este sistema.

Sabe-se que dispersões de DODAB^{NS} formam vesículas em meio aquoso (ver item 3.2). A presença de vesículas de DODAB em soluções de AB faz com que parte da AB assumam um estado de organização monomérico, conforme já discutido, e a molécula de AB certamente está inserida no ambiente lipídico. A inserção da AB no ambiente lipídico pode induzir perturbações ao grau de organização deste ambiente, e essas perturbações, dependendo da intensidade, podem ser monitoradas pela técnica de RPE. Portanto, o RPE é empregado com o objetivo de observar os efeitos da AB sobre o grau de organização das cadeias hidrocarbônicas. Importante ressaltar que os resultados de Absorção Óptica, obtidos anteriormente, não eliminam a possibilidade de existir também AB no estado agregado inserida no ambiente lipídico. Sendo assim, será discutido aqui apenas o efeito global da presença da AB sobre o comportamento da fase lipídica, não será abordado o efeito com relação ao estado de agregação da AB.

A análise dos resultados será apresentada em duas etapas, que foram divididas de acordo com a temperatura de transição de fase (T_m) do sistema DODAB^{NS}, pois, o estado de organização das cadeias pode alterar as interações entre AB e as dispersões de DODAB. Primeiramente, avaliou-se o efeito da AB sobre a fase gel do sistema, e, como uma segunda parte, avaliou-se o efeito da AB sobre a fase fluida.

Efeitos da interação da AB sobre a fase gel do DODAB^{NS}

Espectros associados a marcadores com baixa difusão podem ser analisados a partir de um conjunto de parâmetros empíricos. Um parâmetro empírico que monitora bem o grau de mobilidade destas sondas neste tipo de ambiente lipídico, é o parâmetro conhecido como: desdobramento máximo hiperfino ou " $A_{\text{máx}}$ ", onde este tende a assumir valores maiores à medida que a mobilidade da sonda diminui.

A fase gel foi avaliada utilizando-se os marcadores 5- e 16-MESL em diferentes temperaturas. O 5-MESL é uma sonda que possui a propriedade de monitorar a mobilidade da região mais próxima à superfície da bicamada lipídica, já o 16-MESL é um marcador que monitora regiões mais internas na bicamada. Inicia-se este item apresentando-se os resultados para o efeito da AB sobre o empacotamento da região mais superficial da bicamada (5- MESL).

O perfil espectral obtido para o marcador 5-MESL inserido em DODAB^{NS} pode ser visualizado na Fig.4.24, onde se apresenta uma comparação entre espectros de 5-MESL, à 15°C e 30°C, na presença e na ausência de AB. Estes espectros representam medidas obtidas no mesmo dia de aquisição e nas mesmas condições experimentais.

O estudo do efeito da AB sobre o estado de organização da fase lipídica foi realizado para duas frações molares de AB: 0,5 mol% (10 μ M) e 1,2 mol% (24 μ M), mas para o momento apenas serão apresentados os resultados obtidos para a relação de 1,2mol%. Na Fig.4.25 apresentam-se os resultados para o parâmetro $A_{\text{máx}}$ obtidos a partir dos espectros do marcador 5-MESL.

Avaliando o comportamento do parâmetro $A_{\text{máx}}$ em função da temperatura, observa-se que a presença da AB no meio não produziu grandes modificações ao valor do parâmetro, indicando assim que, em média, os sistemas observados possuem empacotamento semelhante. Uma hipótese que poderia justificar esses resultados seria considerar que a quantidade de AB solubilizada no ambiente lipídico não é capaz de promover alterações significativas, ou, então, pode-se considerar que a AB encontra-se distribuída de tal forma no agregado que acaba não perturbando o sistema significativamente.

Após avaliação da região mais próxima à superfície da bicamada, utilizando o marcador 5-MESL, partiu-se para a avaliação dos efeitos da AB sobre a região mais central da bicamada, através do marcador 16-MESL, que nessa essa faixa de temperatura pode ter os espectros analisados com o mesmo parâmetro utilizado na a análise do marcador 5-MESL, ou seja, o parâmetro $A_{\text{máx}}$. Os espectros obtidos e os parâmetros levantados dos espectros são apresentados na Fig.4.26 e Fig.4.27, respectivamente.

Fig.4.24 - Espectros de RPE obtidos para o marcador 5-MESL inserido no sistema DODAB^{NS} (2 mM), na ausência (—) e na presença de AB 1,2 mol % (—), para duas temperaturas na fase gel.

Fig.4.25 - Parâmetro $A_{\text{máx}}$, em função da temperatura, obtido para o marcador 5-MESL incorporado em DODAB^{NS} (2 mM), na ausência (■) e na presença de AB 1,2 mol% (□). Espectros com varredura de 100 G.

Fig.4.26 - Espectros de RPE obtidos para o marcador 16-MESL inserido no sistema DODAB^{NS} (2 mM), na ausência (—) e na presença de AB 1,2 mol % (—), para duas temperaturas na fase gel. Espectros com varredura de 100 G.

Fig.4.27 – Parâmetro $A_{\text{máx}}$, em função da temperatura, obtido para o marcador 16-MESL incorporado em DODAB^{NS} (2 mM), na ausência (■) e na presença de AB 1,2 mol% (□).

Os resultados apresentados na Fig.4.27 demonstram que para este parâmetro, $A_{\text{máx}}$, a AB também não provoca grandes perturbações em seus valores, informando que o efeito da AB sobre o empacotamento da região central da bicamada lipídica é praticamente inexistente.

Após estes procedimentos, pode-se concluir que o efeito da AB sobre o empacotamento da bicamada de DODAB^{NS} na fase gel, para a máxima fração molar usada (1,2 mol %), é muito pequeno. Porém, sabe-se que a AB encontra-se solubilizada no ambiente lipídico, conforme as medidas de Absorção Óptica. Indicando assim que a AB deve possuir baixa penetrabilidade na região hidrofóbica da bicamada, e sua presença na superfície altera pouco a estrutura da bicamada na fase gel. É interessante observar que moléculas que penetram na bicamada lipídica, como o colesterol, mesmo a muito baixas concentrações alteram a estrutura da bicamada, de modo a ser monitorado por RPE (Bentatti e col., 2008; Subczynski e Kusumi, 1986).

Efeitos da interação da AB sobre a fase fluida do DODAB^{NS}

Nesta etapa utilizaram-se novamente os marcadores 5-MESL e 16-MESL, com o intuito de verificar as influências da AB sobre a fase lipídica. Entretanto, os resultados obtidos para o marcador 5-MESL serão omitidos, devido à grande semelhança entre os espectros obtidos na presença e na ausência de AB, indicando que o efeito da AB é muito pequeno sobre o empacotamento desta região da bicamada.

Na Fig.4.28 são apresentados os espectros experimentais obtidos para o marcador 16-MESL, à 45°C e 50°C, e na Fig.4.29 são mostrados os resultados para os tempos de correlação rotacional τ_B e τ_C obtidos para as mesmas duas temperaturas.

Com os resultados apresentados na Fig.4.29, constata-se que a AB não provoca um efeito pronunciado sobre a difusão da sonda, mas pode-se dizer que existe um pequeno efeito sobre ela, pois se observa que para ambos os tempos de correlação o sistema na presença de AB apresenta valores um pouco maiores do que na ausência da mesma. Isto mostra que para a região do C-16 da cadeia hidrocarbônica a sonda está se difundindo um pouco mais lentamente, ou seja, a AB aumentou a microviscosidade do ambiente lipídico do sistema DODAB^{NS} na fase fluida.

Fig.4.28 - Espectros de RPE obtidos para o marcador 16-MESL inserido no sistema DODAB^{NS} (2 mM), na ausência (—) e na presença de AB 1,2 mol % (—), para duas temperaturas na fase fluida. Espectros com varredura de 100 G.

Fig.4.29 – Parâmetros “ τ_B ” e “ τ_C ”, em função da temperatura, obtidos para o marcador 16-MESL incorporado em DODAB^{NS} (2 mM), na ausência (■) e na presença (□) de AB 1,2 mol% .

O perfil de RPE obtido com o marcador 16-MESL, para essa faixa de temperatura, permite também obter informações quanto à polaridade do meio (ver item 2.3 – Polaridade do meio). Então, com o intuito de avaliar os efeitos da AB sobre a polaridade do ambiente lipídico na região do

carbono 16, monitorou-se o valor de “ a_0 ” para as duas temperaturas, 45°C e 50°C, e os resultados são apresentados na Fig.4.30.

Fig.4.30 – Parâmetro desdobramento hiperfino isotrópico a_0 , obtido a partir dos espectros do marcador 16-MESL inserido no ambiente lipídico do sistema DODAB^{NS}, na ausência (■) e na presença de AB 1,2 mol% (□), e em função da temperatura.

Os resultados de a_0 , na Fig.4.30, quando analisado com relação aos valores médios, demonstram que a AB induz uma pequena diminuição no valor de “ a_0 ” e estaria associada a uma pequena diminuição da polaridade na região do C-16. Mas como a incerteza associada a cada medida está consideravelmente elevada, tem-se que esta tendência não é confiável e a conclusão deve limitar-se a considerar que a polaridade do meio não se altera significativamente.

Após as análises dos efeitos da AB sobre a fase fluida do sistema DODAB^{NS}, pode-se concluir que a AB, na fração molar de 1,2 mol%, induz um pequeno aumento no empacotamento da região central da bicamada. Entretanto, nenhuma alteração foi observada para o sistema na fase gel, o que pode indicar que a posição da AB no agregado lipídico modifica-se da fase gel para a fase fluida do sistema. Talvez, esse pequeno enrijecimento da fase fluida seja causado pela penetração da AB na região superior das cadeias lipídicas, o que refletiria na mobilidade das cadeias no interior da bicamada. Este efeito também foi observado com moléculas polares, que se ligam a bicamadas lipídicas, provavelmente com pequena inserção na região da cadeia hidrocarbônica (Duarte e col., 2008; Fernandez e Lamy-Freund, 2000)

O efeito da interação da AB em dispersões de DODAB^{NS}

Ao contrário do encontrado para o sistema AB_DODAB^{NS}, onde parte da AB se mantinha no estado agregado, considerando a fração molar da AB de 1,2 mol%, as dispersões de DODAB^S permitem, na sua quase totalidade, que a AB permaneça inserida no ambiente lipídico em estado monomérico, indicando assim que os efeitos observados poderão ser associados à AB monomérica.

A apresentação dos resultados será separada em dois grupos, o grupo dos espectros obtidos a baixa temperatura (menor que 33°C) e o grupo dos espectros a alta temperatura (acima de 44°C). Como ainda existe uma incerteza quanto à origem do comportamento térmico deste sistema e quanto à estrutura formada no sistema DODAB^S, preferiu-se denominar estes grupos apenas como espectros de baixa temperatura e alta temperatura. Inicia-se com os resultados para a baixa temperatura.

Sistema à baixa temperatura. Entende-se como baixa temperatura o intervalo entre 5 e 33°C, a correspondente fase gel no sistema DODAB^{NS}. A interação entre a AB e os agregados de DODAB^S foi monitorada para diferentes frações molares de AB: 0,38, 0,5, 0,6, 1,2, 1,8 mol%, nas diferentes temperaturas. Na Fig.4.31, apresentam-se alguns espectros de RPE obtidos, a 15 e 30°C, para os marcadores incorporados em DODAB^{NS}, DODAB^S e DODAB^S + AB a 1,2 mol % (24µM), onde os espectros em DODAB^{NS} são apresentados como base de comparação.

Fig.4.31 - Espectros do marcador 5- e 16-MESL incorporados em 2mM de DODAB^S, a 15°C e 30°C, DODAB^S + AB 24µM, a 15°C e 30°C, e DODAB^{NS}, a 15°C e 30°C. Todos os espectros com varredura de 100 G.

Verificando os espectros apresentados na Fig.4.31, observa-se que um dos efeitos da associação da AB ao DODAB^S está em perturbar algumas características do perfil espectral, como por exemplo, para o caso da região de campo baixo (indicado na figura por uma seta), uma nítida diminuição de amplitude do sinal considerado de movimento rápido. Esta diminuição de amplitude do sinal de campo baixo pode ser mais bem visualizada na Fig.4.32, que apresenta o sinal na região de campo baixo ampliado.

Fig.4.32 - Comparação das intensidades do sinal de campo baixo para os marcadores 5- e 16-MESL, a 15 e 30°C, incorporados em 2 mM de DODAB^S (—) e DODAB^S + AB 1,2 mol% (24 µM) (—).

A Fig.4.32 demonstra que a AB realmente provoca perturbações no sistema, modificando o ambiente onde as sondas estão inseridas. Como se acredita que o espectro resultante do sistema DODAB^S seja um sinal composto, consequência de pelo menos dois ambientes de empacotamento distinto, seria interessante tentar avaliar a influência da AB em cada um dos ambientes separadamente. Para tanto, necessita-se encontrar parâmetros espectrais que representem o empacotamento específico de uma determinada região, sem sofrer influência de sinais da outra região, ou seja, parâmetros espectrais que sejam desacoplados.

Em trabalho anterior (Benatti e col., 2001) foi proposto que a razão entre as duas amplitudes observadas no pico de campo baixo (“A” e “B” na Fig.4.33) é um parâmetro capaz de monitorar o balanço entre os sinais de baixa e alta mobilidade. Isto porque o pico “A” é majoritariamente devido ao sinal anisotrópico e o pico “B” é majoritariamente devido ao sinal isotrópico. Desta forma, a razão “B/A” pode fornecer uma informação sobre a proporção de marcador com alta mobilidade, o que permite utilizá-la como parâmetro de avaliação do comportamento da região de alta mobilidade.

O comportamento da região de baixa mobilidade pode ser monitorada através do parâmetro empírico de desdobramento máximo hiperfino $A_{\text{máx}}$, quando possível de ser medido. No caso dos marcadores utilizados neste projeto, somente foi possível medir o $A_{\text{máx}}$ para espectros do 5-MESL à 15°C e para o 16-MESL à 30°C. Fora destas temperaturas é praticamente impossível a medida do mesmo. Os parâmetros utilizados podem ser mais bem visualizados na Fig.4.33.

Fig.4.33 – Ilustração dos parâmetros utilizados para a análise dos espectros de RPE obtidos para os marcadores 5- e 16-MESL inserido no sistema DODAB^S (2 mM). Espectros com varredura de 100 G.

Então, abaixo, a análise dos espectros será dividida novamente em dois grupos: um grupo representando os efeitos da AB sobre o sinal de alta mobilidade e outro grupo representando a influência da AB sobre o sinal de baixa mobilidade.

Sinal de alta mobilidade. A forma proposta para quantificar a influência da AB sobre esta região foi utilizar-se o parâmetro empírico B/A. O parâmetro B/A é apresentado em função da temperatura (Fig.4.34(A) e Fig.4.34(B)) para distintas relações de AB e em função da fração de AB para as temperaturas de 15 e 30°C (Fig.4.34(C) e Fig.4.34(D)).

Fig.4.34 - Dependência do parâmetro (B/A) com a temperatura (A e B) e com a concentração (C e D), medido nos espectros de RPE obtidos para o marcadores 5- e 16-MESL, e incorporados em 2mM de DODAB^S em quatro frações molares de AB diferentes [$\diamond$ - 0 mol%, $\circ$ - 0,38 mol% (7,5 μ M), $\circ$ - 0,6 mol% (12 μ M), $\triangle$ - 1,2 mol% (24 μ M), $\star$ - 1,8 mol% (36 μ M)].

O resultado apresentado na Fig.4.34 demonstra que à medida que se aumenta a concentração de AB diminui o valor do parâmetro B/A, para ambos os marcadores. A diminuição da amplitude em função do aumento da concentração de AB indica que o ambiente inicialmente com alto grau de mobilidade está tornando-se mais rígido, tanto na região do 5-MESL como na região do 16-MESL, indicando que a AB altera o empacotamento deste ambiente como um todo. Outra informação capaz de ser obtida a partir destes resultados refere-se ao limite de perturbação do sistema para a relação de 1,2 mol%, pois observa-se que para a relação de 1,8 mol% o parâmetro B/A sofre um aumento que pode estar associado a uma diminuição da quantidade de AB presente no ambiente menos empacotado. Este aumento de B/A corrobora os resultados de Absorção Óptica, os quais indicavam que a AB, a partir da relação 1,2 mol%, deixa de se manter prioritariamente no estado monomérico (ver Fig.4.22).

Sinal de baixa mobilidade. Para tentar visualizar a possível influência da AB sobre a região de grau de empacotamento maior, utilizou-se do parâmetro empírico $A_{\text{máx}}$, quando possível a medida, já que ele é somente dependente do comportamento da fase mais rígida. A temperatura em que o $A_{\text{máx}}$ é bem visualizado seria 15°C para o marcador 5-MESL e 30°C para o marcador 16-MESL. Na Fig.4.35 são apresentados os valores obtidos para “ $A_{\text{máx}}$ ” em função da fração de AB para ambos os marcadores.

Fig.4.35 - Dependência do parâmetro empírico $A_{\text{máx}}$ com a fração molar de AB, medido nos espectros de RPE obtidos de marcadores 5- e 16-MESL incorporados em 2mM de DODAB^S à temperatura de 15 e 30°C. (◻, ★) representam duas amostras distintas e (◊) representa o valor de $A_{\text{máx}}$ obtido para o mesmo marcador inserido no sistema DODAB^{NS}.

Pode-se observar na Fig.4.35 a existência de uma pequena tendência de aumento do $A_{\text{máx}}$ na presença de AB, que pode ser interpretada como um aumento do empacotamento da região de baixa mobilidade. Observa-se, por exemplo, que para o marcador 16-MESL os valores de $A_{\text{máx}}$ aproximam-se aos valores obtidos em sistemas DODAB^{NS}, e observa-se também, novamente, que a relação 1,8 mol% tem uma influência menor do que a relação 1,2 mol%. Estes resultados demonstram que mesmo em menor proporção, a região de baixa mobilidade também sofre influência da presença de AB, tornando-se um ambiente mais rígido de uma forma global. Esse efeito observado pode ser consequência da direta interação entre a AB e esta região, ou uma consequência indireta da reorganização do ambiente de alta mobilidade. Este resultado diverge do comportamento encontrado para o sistema DODAB^{NS}, onde a presença da AB no sistema não provocou grandes perturbações ao empacotamento do meio a baixas temperaturas (ver Fig.4.25 e Fig.4.27).

Sistema à alta temperatura. Definiu-se como alta temperatura o intervalo acima de 44°C, o qual corresponderia à fase fluida do sistema DODAB^{NS}. O aumento da taxa de difusão dos marcadores torna o espectro de RPE menos anisotrópico e permite o uso da teoria de Redfield. O sistema DODAB^S foi monitorado com os mesmos marcadores anteriores, 5- e 16-MESL, mas, novamente, como ocorrido para o sistema DODAB^{NS}, os resultados obtidos com o marcador 5-MESL, dentro da avaliação possível, mostraram-se muito semelhantes para as amostras na presença e na ausência de AB, e por isso serão omitidos. Então, neste item serão apresentados apenas os resultados para o 16-MESL.

Com o intuito de fazer a comparação entre amostras de DODAB^S, com e sem AB, mostra-se na Fig.4.36 a sobreposição dos espectros experimentais obtidos para o marcador 16-MESL, à 45°C e 50°C, e os valores dos tempos de correlação rotacional, τ_B e τ_C , em diferentes frações molares de AB, são mostrados na Fig.4.37 e Fig.4.38.

Analisando os resultados obtidos na Fig.4.37 e Fig.4.38, é possível observar uma pequena queda nos dois tempos de correlação com o aumento da concentração de AB, indicando assim um aumento da mobilidade da sonda em presença de AB. Este resultado indica que está havendo uma fluidificação do ambiente lipídico no DODAB^S, quando na presença de AB, comportamento este contrário ao observado para o sistema à baixa temperatura.

Fig.4.36 - Espectros de RPE obtidos para o marcador 16-MESL inserido no sistema DODAB^S (2 mM), na ausência (—) e na presença de AB 1,2 mol % (—), para duas temperaturas na fase fluida. Espectros com varredura de 100 G.

Fig.4.37 - Parâmetros “ τ_B ” e “ τ_C ” obtidos a partir dos espectros de RPE do marcador 16-MESL inserido no ambiente lipídico do sistema DODAB^S (2 mM), na ausência (□) e na presença de AB em diferentes frações molares [◇ - 0,38 mol% (7,5 μ M), ○ - 0,6 mol% (12 μ M), △ - 1,2 mol% (24 μ M), ☆ - 1,8 mol% (36 μ M)] em função da temperatura (A e B).

Fig.4.38 - Parâmetros “ τ_B ” e “ τ_C ”, obtidos a partir dos espectros de RPE do marcador 16-MESL inserido no ambiente lipídico do sistema DODAB^S (2 mM), em função da fração molar de AB (**A** e **B**) para a temperatura de 45 °C (■) e 50°C (□).

Quando se analisa a Fig.4.39(A) não é evidente o comportamento da polaridade em função da relação de AB, pois apenas observa-se que modificações da polaridade ocorreram. Mas quando se analisa o comportamento da polaridade apresentado na Fig.4.39(B), torna-se evidente que o parâmetro a_0 está sofrendo uma diminuição do seu valor à medida que a relação de AB aumenta. Novamente observa-se que o comportamento se mantém até a relação de 1,2 mol%, e para a relação de 1,8 mol% já se observa um pequeno aumento de a_0 . Com esse resultado, pode-se concluir que a interação entre AB e os agregados DODAB^S, em média, induz uma diminuição da polaridade ou uma diminuição na hidratação do meio onde a sonda está inserida.

Fig.4.39 – Parâmetro desdobramento hiperfino isotrópico “ a_0 ” obtido a partir dos espectros do marcador 16-MESL inserido ao ambiente lipídico do sistema DODAB^S (2 mM), na ausência (■) e na presença de AB em diferentes frações molares [◇ - 0,38 mol% (7,5 μ M), ○ - 0,6 mol% (12 μ M), △ - 1,2 mol% (24 μ M), ☆ - 1,8 mol% (36 μ M)] em função da temperatura (A). Assim como o comportamento do parâmetro “ a_0 ” em função da fração molar de AB (B) na temperatura de 45 °C (■) e 50°C (□)

Em conclusão, a AB, de uma maneira geral, enrijece os agregados de DODAB^S a baixas temperaturas. Aparentemente, ela está interagindo, preferencialmente, com a região mais frouxa destes agregados. Considerando o modelo dos fragmentos de bicamada lipídica, esta região mais frouxa corresponderia às bordas do fragmento, conforme sugerido (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001)

É curioso observar que a AB enrijece a fase fluida de bicamadas de DODAB^{NS}, enquanto fluidifica agregados de DODAB^S, nas mesmas temperaturas. Apesar de ser difícil uma análise estrutural dos agregados presentes em DODAB^S, somente considerando o efeito da AB, fica claro que suas estruturas são diferentes da estrutura de bicamadas lipídicas.

4.2.3 Monitoramento por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A partir da caracterização realizada no item 4.1.3, torna-se possível verificar os efeitos induzidos ao ambiente lipídico devido à interação com as moléculas de AB. Neste item foram realizadas medidas para apenas uma relação molar de AB:DODAB: optou-se por utilizar a relação de maior solubilização no estado monomérico em sistemas DODAB^S (1,2 mol%).

O efeito da interação da AB em dispersões de DODAB^{NS}

Monitorar os efeitos da interação entre a AB e o DODAB^{NS}, através do comportamento das transições de fase do sistema DODAB^{NS}, pode fornecer informações complementares às informações obtidas por RPE e Absorção Óptica. Nessa etapa o procedimento foi realizado para quatro amostras distintas, que foram preparadas mantendo-se o mesmo padrão utilizado nas outras etapas do trabalho, onde o DODAB^{NS} foi preparado na concentração de 2 mM e AB na concentração de 24 µM. Todas as amostras utilizadas no procedimento de DSC foram monitoradas por absorção óptica, com intuito de verificar a ocorrência de solubilização da AB no ambiente lipídico, constatando-se a presença de espectros semelhantes aos obtidos na Fig.4.19. Portanto, apresentam-se na Fig.4.40 os resultados obtidos para as quatro amostras realizadas.

Os resultados apresentados na Fig.4.40 demonstram que, qualitativamente, é possível observar que, nas quatro amostras analisadas, a presença de AB no sistema provoca no perfil de “ ΔC_p ” um pequeno deslocamento nas temperaturas de transição e um pequeno alargamento no pico de transição T_m . Entretanto, a forma de confirmar estes efeitos sobre o DODAB^{NS} é medir os parâmetros médios da transição, T_m e ΔH , e analisá-los quantitativamente, os mesmos são apresentados na Tab.4.3.

Com os resultados apresentados na Tab.4.3, é possível afirmar que a presença da AB provoca uma diminuição da temperatura de T_p em pelo menos 1 °C, um aumento da temperatura de T_m em 0,5°C, tornando ambas as transições menos cooperativas, e não perturba significativamente a variação de entalpia da transição T_m . Estes efeitos observados no perfil de ΔC_p , corroboram os resultados obtidos por Absorção Óptica e confirmam a presença de AB no ambiente lipídico.

Fig.4.40 - Termogramas de aquecimento, obtidos para dispersões de DODAB^{NS} (2 mM), em diferentes dias de preparo (A, B, C, D), na ausência (—) e na presença de AB (—) na fração molar de 1,2 mol %. Velocidade de varredura de 45 °C/h.

Tab.4.3 - Parâmetros médios obtidos para o comportamento dos picos de “ ΔC_p ”, observados nos termogramas do sistema DODAB^{NS} (2mM), na ausência e na presença de AB na fração molar de 1,2 mol%.

	Temp. (°C)	Δt (°C)	ΔH (kcal/mol)
T_p – DODAB^{NS}	35,6 ± 0.1	0,7 ± 0.2	5 ± 2
T_p – AB_DODAB^{NS}	34,1 ± 0.6	0,9 ± 0.4	3 ± 2
T_m – DODAB^{NS}	44,91 ± 0.04	0,29 ± 0.03	10,8 ± 0.6
T_m – AB_DODAB^{NS}	45,4 ± 0.3	0,82 ± 0.07	10,1 ± 0.4

Avaliando-se primeiramente os efeitos sobre a transição T_m , tem-se que a AB provoca o aumento da temperatura de transição T_m . Mesmo pequeno, este aumento é significativo. A posição de ocorrência da temperatura de transição T_m é uma propriedade termodinâmica, dependente das interações entre as cadeias hidrocarbônicas e também muito dependente do comportamento das interações existentes na região polar. Portanto, um aumento no valor de T_m indica um aumento na estabilidade da fase gel do sistema, devido à ocorrência de alguma alteração no padrão de interação dos lipídios. A alteração de T_m , a valores maiores, pode ser consequência, principalmente, de três efeitos: de um aumento na interação entre as cadeias hidrocarbônicas, de uma diminuição na hidratação da superfície da bicamada ou uma perturbação na interação existente entre as cabeças polares (Cevc e Marsh, 1987).

A hipótese de aumento da interação entre as cadeias hidrocarbônicas para ser justificada deve ser acompanhada por um aumento na variação de entalpia da transição T_m . Como a entalpia não se modifica significativamente, de forma que seja detectável, torna-se possível propor que o deslocamento de T_m observado, para o sistema DODAB^{NS} na presença de AB, não deve ser consequência da variação de interação entre cadeias hidrocarbônicas. Mesmo porque, esse resultado corrobora aos obtidos por RPE: não foi observado alterações significativas sobre o empacotamento da região hidrocarbônica. Através desta constatação, é possível imaginar que as moléculas de AB não devem estar penetrando a grandes profundidades da região hidrocarbônica, mantendo-se prioritariamente na região superficial, pois muitas moléculas que sabidamente penetram na região hidrocarbônica, acabam por perturbar a variação de entalpia da transição principal (Mcmullen e col., 1993).

A hipótese de redução da repulsão eletrostática entre as cabeças polares na fase gel pode ser razoável, tendo em vista o caráter “zwiteriônico” da AB. Entretanto, essa redução seria pequena, pois um efeito de empacotamento não foi observado com marcadores de spin. Também interessante, e significativo, é o efeito da AB sobre a cooperatividade, Δt , da transição T_m . Este efeito deve estar

relacionado com a interação da AB na superfície da bicamada, na fase gel, e sua provável pequena penetração na região hidrofóbica na fase fluida, indicada pelos resultados de RPE.

A análise quanto à perturbação sobre o comportamento da transição T_p , tanto na temperatura de ocorrência como na variação de entalpia, para ser realmente compreendida, deve ser pautada em um modelo consistente desta transição. Entretanto, considerando a hipótese de que esta transição possa estar relacionada a uma pré-transição típica de sistemas lamelares, $L_\beta \rightarrow P_\beta'$, os resultados obtidos indicariam que realmente a AB está perturbando propriedades da superfície da vesícula.

Os resultados obtidos neste procedimento confirmam claramente que a AB liga-se à bicamada lipídica, mantendo-se prioritariamente na região superficial.

O efeito da interação da AB em dispersões de DODAB^S

Como discutido no item 4.1.3, o sistema DODAB^S apresenta um comportamento térmico anômalo, o qual não pode ser associado a uma típica transição de fase das cadeias hidrocarbônicas. Este comportamento térmico, apresentado por DODAB^S, é associado principalmente ao grupo de lipídios que nas baixas temperaturas constituem uma fase ordenada, que apresenta picos de ΔC_p durante um processo de aquecimento.

A técnica de DSC foi empregada neste momento com o objetivo de monitorar o efeito da interação da AB sobre o comportamento térmico do sistema DODAB^S. O procedimento utilizado foi o mesmo empregado para o sistema DODAB^{NS}, sendo a concentração de lipídio a mesma (2 mM) e a concentração de AB (24 μ M) também. Novamente, todas as amostras foram verificadas por Absorção Óptica, com intuito de verificar a solubilização da AB no sistema lipídico. Na Fig.4.41 são apresentados os resultados obtidos para as quatro amostras observadas.

Analisando o efeito da AB sobre o comportamento térmico do sistema DODAB^S, verifica-se que não existe um padrão de resposta trivial, mas, ao avaliarem-se todas as amostras, observa-se que o perfil realmente não se altera significativamente. Diante disso, o próximo passo foi tentar avaliar os efeitos da AB a partir do comportamento médio dos parâmetros associados ao perfil anômalo, os quais são apresentados na Tab.4.4.

Fig.4.41 - Termogramas de aquecimento, obtidos para dispersões de DODAB^S (2 mM), em diferentes dias de preparo (A, B, C, D), na ausência de AB (—) e na presença de AB (—) na fração molar de 1,2 mo %. Velocidade de varredura 45 °C/h.

Tab.4.4 - Parâmetros médios obtidos para o comportamento dos picos de “ ΔC_p ”, observados nos termogramas do sistema DODAB^S(2mM), na ausência e na presença de AB na fração molar de 1,2 mol%.

	Temp. (°C)	Δt (°C)	ΔH (kcal/mol)
T₁ – DODAB^S	37 ± 1	6 ± 1	5 ± 1
T₂ – DODAB^S	$41,6 \pm 0.3$		
T₁ – AB_DODAB^S	36 ± 1	7 ± 1	5 ± 1
T₂ – AB_DODAB^S	$41,2 \pm 0.5$		

Os resultados apresentados na Tab.4.4 demonstram que apesar da grande incerteza associada aos parâmetros, existe grande similaridade entre os dois perfis, na ausência e na presença de AB, o que não torna evidente o efeito perturbativo da AB sobre o DODAB^S.

Portanto, pode-se concluir que a técnica de DSC permite afirmar que a presença da AB no sistema não promove grandes alterações no comportamento do ΔC_p do sistema DODAB^S, então permitindo inferir que para a fase lipídica de maior ordem a AB não interage, ou não penetra a grandes profundidades da região hidrofóbica. Estes resultados corroboram os obtidos com RPE, pois os mesmos indicavam que a AB interage preferencialmente com a região de menor empacotamento.

5. Conclusões

5.1 Efeitos da interação AB - dispersões de DODAB^{NS}

Através de medidas de absorção óptica foi mostrado que a AB monomérica incorpora-se a vesículas de DODAB^{NS}, contrário a algumas sugestões na literatura (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001). A posição do pico de absorção de maior comprimento de onda ($\lambda \approx 414$ nm) mostra que, prioritariamente, a AB no estado monomérico encontra-se solubilizada na bicamada lipídica.

Outra informação extraída dos dados de absorção óptica foi quanto às frações de AB, no estado monomérico, solubilizadas nas fases gel e fluida de DODAB^{NS}, na relação DODAB:AB de 1,2 mol%: 40% na fase gel e 23% na fase fluida. Portanto, a AB monomérica solubiliza-se, preferencialmente, na fase gel de vesículas de DODAB. Este resultado é semelhante ao encontrado para outros lipídios (Bolard, 1986)

A calorimetria confirmou a presença de AB em vesículas de DODAB. A não variação de ΔH , juntamente com o pequeno aumento de T_m , e diminuição da cooperatividade Δt , justificam a argumentação de que a AB deve possuir baixa penetrabilidade no ambiente hidrofóbico, localizando-se, prioritariamente, na superfície da bicamada, perturbando as interações existentes entre as cabeças polares. A invariância dos sinais de RPE de marcadores incorporados em lipídios na fase gel, e o pequeno enrijecimento causado pela AB na fase fluida, também sugerem pouca penetração da molécula, mas indicam que, na fase fluida do DODAB, a AB deve estar um pouco mais inserida na bicamada lipídica.

Num futuro, estes resultados deverão ser discutidos junto com outro efeito interessante que foi observado: a modificação do perfil de espalhamento de luz de DODAB^{NS} em presença de AB.

5.2 Características estruturais do DODAB^S

O emprego da técnica de Turbidez permitiu concluir que as dispersões de DODAB^S são principalmente compostas por pequenos agregados, que possuem uma grande estabilidade em solução aquosa. A estabilidade da dispersão é interpretada como resultado da repulsão eletrostática entre os agregados, mantendo-os afastados uns dos outros.

A técnica de RPE demonstrou-se capaz de distinguir a existência de dois ambientes com empacotamentos distintos no sistema DODAB^S. Como consequência, as sondas no ambiente DODAB^S, a baixas temperaturas, apresentam-se, em média, com maior mobilidade do que as sondas inseridas no ambiente DODAB^{NS}. A menor fluidez observada a altas temperaturas para

agregados de DODAB^S, comparada a de bicamadas de DODAB^{NS} é intrigante, e necessita maior investigação quanto à estrutura dos agregados presentes em DODAB^S.

Os resultados obtidos com a técnica de DSC permitem afirmar que os agregados de DODAB^S não possuem uma extensa região de lipídios na fase gel, a baixas temperaturas, de forma que o padrão termotrópico do sistema apresenta transições muito pouco cooperativas, e em posições diferentes das encontradas para a transição gel-fluido do DODAB^{NS}. Estes fatos sugerem a presença de fragmentos de bicamadas ou bicelas na solução, onde coexistiriam fase gel e fase fluida. Entretanto, a menor fluidez observada por RPE, para agregados de DODAB^S, a altas temperaturas, quando comparados a bicamadas fluidas de DODAB^{NS}, não parece de acordo com a presença de bicelas, onde coexistiriam bicamadas com estruturas ainda menos rígidas, tipo micela. Portanto, a estrutura dos agregados de DODAB^S ainda é uma questão em aberto.

5.3 Efeitos da interação AB - DODAB^S

Através da Absorção Óptica foi possível confirmar os resultados notificados anteriormente (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001), que mostraram que a AB, na presença de agregados DODAB^S, encontra-se, principalmente, no estado monomérico, para baixas concentrações. Como para o sistema DODAB^{NS}, comprovou-se que a AB monomérica encontra-se solubilizada de tal forma que seu cromóforo hidrofóbico está em ambiente lipídico (como esperado) devido à posição do pico de absorção de maior comprimento de onda ($\lambda \approx 414 \text{ nm}$). Mostrou-se que a AB solubiliza-se monomericamente em DODAB^S até a relação molar AB/DODAB de 1,2 mol%. Este resultado, de fração máxima de solubilização monomérica, é importante, pois pode auxiliar os futuros estudos de viabilização do sistema AB_DODAB^S, como formulação alternativa ao combate de infecções fúngicas, na escolha da melhor dose a ser preparada.

Devido à pouca definição da calorimetria de dispersões de DODAB^S, somente é possível dizer que a AB não está interferindo significativamente com os lipídios que apresentam as transições alargadas observadas.

A baixas temperaturas, os resultados de RPE indicam, fortemente, que a AB está solubilizada, preferencialmente, na região mais fluida do agregado de DODAB^S. Considerando o modelo dos fragmentos de bicamada lipídica, esta região mais frouxa corresponderia às bordas do fragmento. Este é um resultado curioso, apesar de ter sido sugerido na literatura (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001), considerando a preferência da AB monomérica pela fase gel de bicamadas de DODAB, como discutido acima. Ainda mais, considerando que a espectroscopia de absorção óptica informa que a AB está totalmente monomérica em DODAB^S.

Também interessante foi observar que a AB fluidifica agregados de DODAB^S, nas mesmas temperaturas em que enrijece a fase fluida de bicamadas de DODAB^{NS}. Estes dados deverão ser compreendidos junto com os resultados que mostraram que a fase fluida de DODAB^S é mais rígida do que a de bicamadas de DODAB^{NS}.

Portanto, o presente trabalho trouxe algumas novas informações estruturais sobre o sistema DODAB –AB, e muitas questões interessantes.

Apêndice A - Organização da AB em Meio Aquoso

Sabe-se que a AB é uma molécula com baixa solubilidade em meio aquoso, fato que reflete o caráter anfifílico da mesma. A solubilidade em meio aquoso é uma característica limitante à aplicação terapêutica da AB em infecções sistêmicas, pois essa propriedade influi diretamente no estado de associação da molécula no meio, que por sua vez influencia o grau de toxicidade da formulação. A AB, acima de certas concentrações, apresenta a capacidade de se organizar em grandes agregados moleculares, que surgem espontaneamente em solução aquosa, como consequência da interação com o meio. A informação sobre grau de associação da AB em meio aquoso é uma informação valiosa, pois auxilia no desenvolvimento de formulações mais eficientes e menos tóxicas. Com o intuito de introduzir o assunto, elaborou-se uma pequena discussão acerca dos conceitos básicos envolvidos na agregação espontânea da AB. Este texto é composto de uma rápida discussão a respeito da interação hidrofóbica da AB, e logo em seguida são apresentadas, resumidamente, algumas propostas já existentes na literatura.

Efeito hidrofóbico e a Interação hidrofóbica

(Israelachvili, 1991)

O efeito hidrofóbico é um comportamento relacionado a propriedades específicas da molécula de água, e como essas são perturbadas na presença de moléculas alheias ao meio. Dentre as diversas propriedades da molécula de água, duas são de interesse para o momento: a geometria molecular tetraédrica e a grande capacidade de formação de ligações de hidrogênio, em média de 3,0 a 3,5 ligações por molécula, no meio líquido. A geometria molecular tetraédrica da água é uma característica de extrema importância, pois é ela que fornece a possibilidade de formação de redes de ligação tridimensionais no meio. A facilidade de formação de ligação de hidrogênio é a característica responsável por aumentar a coesão entre as moléculas do meio. A ligação de hidrogênio é uma ligação química secundária, que ocorre entre alguns átomos específicos (ex: O, N e F) e um átomo de hidrogênio ligado a outro átomo muito eletronegativo. Ela é uma ligação dependente da orientação molecular, e de caráter predominantemente eletrostático, ou seja, não há compartilhamento de elétrons entre os envolvidos. A geometria tetraédrica da água, aliada à facilidade de formação das ligações de hidrogênio e sua dependência direcional com a ligação de hidrogênio, tornam o meio aquoso um meio líquido estruturado, ou conhecido como líquido associado, característica que é incomum a sistemas líquidos não iônicos.

Uma molécula apolar, que normalmente possui pouca capacidade de realizar ligações de hidrogênio, quando inserida em meio aquoso, perturba a estrutura original do meio, quebrando as ligações de hidrogênio pré-existentes no volume ocupado por ela. A quebra dessas ligações não implica uma diminuição direta do número de ligações realizadas pelo meio, pois tanto estudos teóricos como experimentais indicam que a presença da molécula apolar induz uma reorganização das moléculas de água ao seu redor, na tentativa de as mesmas manterem a continuidade das ligações de hidrogênio. A esse efeito de reorganização induzida denomina-se efeito hidrofóbico, e as moléculas que são capazes de induzir esse efeito são chamadas de moléculas hidrofóbicas. A reorganização local das moléculas de água em torno de uma molécula hidrofóbica acaba por alterar a entropia do sistema, pois acredita-se que a configuração local difira em muito da encontrada no meio “bulk”, onde o grau de ordenamento é considerado menor. O aumento da ordem local provoca uma conseqüente diminuição da entropia do sistema, caracterizando assim o efeito hidrofóbico como entropicamente desfavorável. Observações com diferentes hidrocarbonetos indicam que o grau de organização da água ao redor de uma molécula apolar é proporcional à quantidade de superfície exposta à água, ou seja, a forma e tamanho da região apolar irão determinar o grau de ordenamento local das moléculas de água. Sabe-se que a condição de equilíbrio termodinâmico de um sistema segue no sentido de maximizar a entropia. Sendo assim, uma simplificação razoável ao processo de interação hidrofóbico-água seria considerar que a busca do sistema pelo equilíbrio tende no sentido de diminuir a superfície hidrofóbica exposta a água. Intimamente relacionado com o efeito hidrofóbico está a chamada interação hidrofóbica, que é caracterizada como uma forte interação atrativa entre moléculas hidrofóbicas em um meio aquoso. Ela é uma interação incomum que ainda não apresenta uma descrição teórica simples, mas sabe-se que sua intensidade é muito superior à encontrada entre as mesmas moléculas livres no espaço, e que não pode ser descrita como uma teoria contínua de força de van der Waals.

A agregação espontânea da AB

O processo de agregação espontânea de moléculas anfifílicas em meio aquoso é um processo que reflete um delicado balanço entre as diversas interações atrativas e repulsivas presentes no sistema. Dentre as diversas interações que as moléculas anfifílicas realizam com o meio aquoso, as interações hidrofóbicas são consideradas as principais precursoras do processo de agregação espontânea. Como considerado anteriormente, a interação hidrofóbica é uma força atrativa que aponta no sentido da redução da superfície apolar exposta à água. Quando essa interação for

superior às demais interações presentes, existirá uma tendência para a formação de agregados moleculares.

O efeito de agregação espontânea da AB em meio aquoso tem sido extensivamente relatado na literatura (Gaboriau e col., 1997; Romanini e col., 1999; Grijalba e col., 2006). Atualmente não há mais dúvida que AB, em dispersões aquosa e a concentrações acima de 10^{-7} M, apresenta diversos estados de agregação. As grandes discussões do momento estão relacionadas com as possíveis estruturas assumidas pelo agregado e quais seriam suas interações estabilizadoras. As interações estabilizadoras são de particular interesse, pois podem contribuir para o entendimento do comportamento dos agregados de AB em ambiente lipídico. Um dos primeiros trabalhos a propor uma possível estrutura dos agregados de AB em meio aquoso foi publicado por Ernst e col.(1981). Neste trabalho, foram utilizadas simultaneamente as técnicas de absorção óptica e dicroísmo circular, para o monitoramento dos padrões espectrais, em função da concentração de AB. Através de seus resultados foi possível observar a existência de dependência do perfil espectral com a concentração de AB, indicando a ocorrência de um processo de agregação. Constatou-se também que o comportamento espectral referente às duas técnicas, absorção e dicroísmo, diferiam para as diversas concentrações utilizadas. Este último comportamento causou-lhes estranheza, e fez com que considerassem o processo de agregação como resultado de dois estágios. No primeiro estágio teria-se a formação de pequenas unidades contendo apenas algumas moléculas, como por exemplo um dímero, e sua estabilização estaria basicamente relacionada às interações hidrofóbicas. Um segundo estágio seria a associação dessas pequenas unidades fundamentais formando os grandes aglomerados moleculares, que por sua vez teriam uma estabilização hidrofóbica menor e seriam basicamente estabilizados por interações polares e iônicas.

O primeiro estágio então seria o grande responsável pelas modificações do espectro de absorção e o segundo estágio seria o grande responsável pelas grandes perturbações do espectro de dicroísmo. Um ano depois, Mazerski e col.(1982) observaram a agregação espontânea de alguns antibióticos poliênicos em meio aquoso, e também sinalizaram positivamente a correspondência dos dados experimentais com a proposta da existência de sub-unidades, dímeros ou trímeros, compondo a formação dos grandes agregados. Anos depois, (Mazerski e col., 1990) refinaram o tratamento empregado em (Ernst e col., 1981) e propuseram que o processo de agregação espontânea deve ocorrer em multi-estágios, ou seja, em solução conviveriam diversas espécies com os mais variados pesos moleculares. Neste mesmo artigo foi mostrado também que os espectros de absorção de agregados de AB (“zwiteriônica”) e seu derivado Ac-AME [N-acetilanfotericina B metil ester, (neutro)] são semelhantes em pH neutro. Isto permitiria inferir que as interações eletrostáticas entre

moléculas vizinhas podem ser desprezadas para o processo de agregação espontânea, tendo contribuição apenas na distância e no ângulo entre os cromóforos.

Mazerki e col.(1990) propõem que o processo de agregação seria governado pelas interações hidrofóbicas e pela formação de ligações de hidrogênio. A importância das ligações de hidrogênio foi inserida devido a um experimento com uréia, conhecida por desestabilizar as ligações de hidrogênio do meio: em 4 M de uréia não se observou a presença de agregados. Paralelamente a esses estudos Barwicz e col. (1993) propuseram que o agregado de AB em água assume uma configuração inicial tubular, composta provavelmente de cinco moléculas formando um poro hidrofóbico. Esta unidade tubular por sua vez se aglomeraria com outras unidades e formaria agregados maiores. Uma outra proposta, divergente das apresentadas anteriormente, foi relatada por (Hemenger e col., 1983), e nela foi sinalizado como provável estrutura para o agregado a configuração de hélice com unidade de repetição contendo duas moléculas de AB alinhadas no mesmo plano.

Desta forma, a conclusão que pode ser feita, a partir da avaliação destes trabalhos, é que até o momento não existem evidências experimentais que realmente comprovem a presença de uma ou outra estrutura do agregado. Entretanto, existe um forte indicativo de que realmente ocorram sub-unidades.

Complementarmente aos trabalhos experimentais, foram realizados diversos estudos teóricos através de simulações computacionais (Caillet e col., 1995; Mazerski e Borowski, 1996; Millie e col., 1999), na tentativa de auxiliar a análise de uma dada configuração. Todos os trabalhos citados sinalizam positivamente para presença de pequenas unidades estáveis em solução, mas divergem um pouco quanto às configurações mais estáveis e quais as interações primordiais à estabilização do agregado. Sendo assim, conclui-se que a estrutura formada pela agregação espontânea de AB em meio aquoso ainda é uma questão em discussão e deve ser tratada com cautela, para que não haja excessos em determinadas análises e constatações.

Apêndice B - Efeitos do Solvente

(Atkins e Friedman, 1997; Reichardt, 2003; Cantor e Schimmel, 1980)

Estudos do perfil de absorção em diferentes meios de uma dada molécula, tem-se mostrado uma ferramenta poderosa na avaliação de suas propriedades funcionais e estruturais. Os espectros de absorção de muitas moléculas demonstram ser sensíveis a diferentes propriedades, físicas e químicas, do ambiente onde estão inseridas. A sensibilidade ao ambiente pode manifestar-se através de mudanças na intensidade, na forma da banda ou até mesmo na posição onde a molécula está localizada. Em muitas situações, as causas destas mudanças estão associadas aos diferentes tipos de interações intermoleculares, solvente-soluto e soluto-soluto, que ocorrem com o meio e que acabam perturbando os níveis de energia, tanto do estado fundamental como do estado excitado. Este texto irá focar as perturbações associadas a interações intermoleculares do tipo solvente-soluto, e discussões sobre as interações soluto-soluto serão abordadas apenas no apêndice C. Para melhorar a sensibilidade aos efeitos da interação solvente-soluto, deve-se garantir que os efeitos da interação soluto-soluto sejam minimizados, ou seja, deve-se priorizar trabalhar em sistemas bem diluídos.

A perturbação de um meio qualquer aos estados eletrônicos de uma dada molécula pode ser avaliada a partir da comparação com os estados da molécula na ausência de meio, ou seja, na fase gasosa. A fase gasosa apresenta um ambiente onde as interações intermoleculares são praticamente inexistentes, e o perfil de absorção é majoritariamente consequência dos potenciais intramoleculares. Uma molécula em ambiente líquido, como o de um solvente, difunde-se em um ambiente denso. A presença das moléculas de solvente no perímetro de uma molécula de soluto inevitavelmente promove o surgimento de diversas interações intermoleculares, que podem promover diversas alterações no padrão de absorção da molécula.

O padrão de absorção de uma molécula na fase gasosa, em muitos casos, é impraticável de ser obtido experimentalmente. Sendo assim, métodos auxiliares de avaliação do efeito do solvente devem ser empregados. Um método auxiliar seria encontrar um solvente com características físico-químicas que promova uma baixa interação com o soluto e comparar os resultados obtidos para este ambiente com os resultados obtidos para os demais solventes de naturezas distintas. A comparação entre solventes distintos fornece uma informação das mudanças no perfil de absorção, como resposta à variação das diversas propriedades físico-químicas dos solventes. O solvente padrão ideal seria um solvente com baixa interação solvente-soluto, de forma a mimetizar uma fase gasosa, mas nem sempre é possível satisfazer estas propriedades. Encontrar um solvente com estas características requer um alto conhecimento estrutural da molécula e suas possíveis interações com o meio em questão. Para a AB, que é uma molécula anfifílica, a tarefa torna-se um pouco mais

complicada, pois ela possui regiões com características antagônicas, o que dificulta a busca por solventes com baixa interação. Como no momento o interesse está em apenas realizar uma análise qualitativa dos efeitos do solvente sobre o espectro de absorção da AB, buscou-se simplesmente um solvente com boa solubilização à AB, e a partir dele realizou-se as comparações com os demais solventes. Estudos mostram que alguns solventes orgânicos são bons solubilizadores para a AB (Ernst e col., 1981), sendo assim, para esta análise adotou-se o metanol como o solvente padrão. Na Fig.B. 1 apresenta-se o espectro de absorção da AB em metanol, na região do UV-Visível.

Fig.B. 1 - Espectro de absorção da AB dispersa em metanol a 0,4 μM e a temperatura ambiente.

No perfil apresentado em Fig.B. 1 observa-se a existência de bandas significativas de absorção na região espectral entre 320 e 420 nm, correspondendo a um intervalo de energia entre 68,0 Kcal mol^{-1} e 89,3 Kcal mol^{-1} . Valores de energia dessa magnitude, normalmente, em sistemas moleculares, estão associados a transições entre estados eletrônicos do tipo $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$. Transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$, ocorrem prioritariamente em grupos carbonilas e apresentam baixa probabilidade de ocorrência. Usualmente, associa-se ao espectro de absorção da AB transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. A indicação da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ como provável transição observada na molécula de AB é realizada a partir da análise de seus grupos funcionais, pois observa-se a presença de um grupo polieno conjugado com sete duplas ligações. A presença do grupo polieno fornece um forte indicativo de que devem existir elétrons em orbitais do tipo π no estado fundamental da molécula.

Afirmção de que o grupo polieno conjugado pode ser o grupo cromóforo na região do UV-Visível é comprovada através da comparação com espectros de polienos lineares padrão (Sklar e col., 1977), onde observa-se grande similaridade entre os perfis de absorção. Sendo assim, afirma-se que o grupo cromóforo da AB, na região UV-Visível, é o grupo polieno.

Outra característica observada no perfil da Fig.B. 1 é a presença de três picos bem definidos nas posições de 362, 383 e 405 nm. Este desdobramento na banda de absorção pode ser consequência de diferentes fatores, como por exemplo a presença de isômeros na solução, ou transições a diferentes estados vibrônicos da molécula. A hipótese de isômeros em solução capazes de perturbar o espectro de absorção ainda não foi comprovada, e atualmente a hipótese de transição entre bandas vibrônicas é a mais aceita. A hipótese de bandas vibrônicas é consistente para justificar o desdobramento espectral, pois sabe-se que bandas vibrônicas são caracterizadas por possuírem espaçamento constante entre picos subseqüentes, e avaliando-se o espectro da AB observa-se um espaçamento de $4,05 \text{ Kcal mol}^{-1}$ entre o primeiro e segundo pico e de $4,33 \text{ Kcal mol}^{-1}$ entre o segundo e terceiro pico. Desconsiderando o erro experimental, pode-se considerar como espaçamento constante. O aparecimento de bandas vibrônicas no espectro demonstra o grau de liberdade da cadeia poliênica de acessar outros estados de vibração.

Efeitos do solvente podem ser classificados em dois grandes grupos; os efeitos devido a interações gerais e os devidos a interações específicas. Como interações gerais classificam-se normalmente os efeitos em resposta a grandezas físicas como índice de refração e constante dielétrica, que refletem o grau de liberdade de movimento dos elétrons que compõem a molécula do solvente, e de seus momentos de dipolo elétrico. Enquanto que os efeitos específicos referem-se a efeitos em resposta a interações químicas específicas, entre o cromóforo e o solvente, como ligações de hidrogênio e complexação. Neste texto serão abordados apenas os efeitos de caráter geral.

As interações intermoleculares, responsáveis pelos efeitos do solvente, normalmente são descritas através de um potencial efetivo, composto por dois termos principais, um termo representando os potenciais de longo alcance e outro, os de curto alcance. O termo de curto alcance é normalmente representando por potencial repulsivo, e tenta mimetizar a impenetrabilidade das moléculas. O termo de mais longo alcance é responsável por descrever uma composição de três efeitos, classificados como eletrostático, de indução e de dispersão. Os efeitos eletrostáticos são os associados às interações entre cargas ou momentos de multipolos permanentes presentes nas moléculas envolvidas. Os efeitos de indução, conhecidos também como interação de Debye, possuem origem quântica e quantificam as interações de momentos de multipolos permanentes com multipolos induzidos. Os efeitos de dispersão, que também possuem origem quântica, avaliam

interações entre as capacidades de polarização das moléculas. A contribuição de cada termo ao potencial efetivo irá depender das propriedades de cada molécula envolvida na interação.

Estudos anteriores demonstraram (Sklar, e col., 1977), que polienos lineares, o efeito do solvente sobre o perfil de absorção é prioritariamente devidos às interações de dispersão com o meio. As interações eletrostáticas e de Debye são desprezíveis, devido ao fato de tanto o estado fundamental como o estado excitado não possuírem momentos de dipolo permanente e devido à faixa de tempo envolvida na transição, que não permite um rearranjo das moléculas do solvente.

Os efeitos de dispersão estão associados à polarizabilidade das moléculas, onde considera-se polarizabilidade de uma molécula, a capacidade da nuvem eletrônica de responder a campos elétricos. A polarizabilidade de uma molécula é uma grandeza física, que pode ser conectada ao índice de refração através da relação de Clausius-Mossotti (ver Apêndice D). Nesta relação observa-se que uma alta polarizabilidade implica alto índice de refração. Efeitos da polarizabilidade do solvente sobre os estados eletrônicos π e π^* normalmente manifestam-se provocando uma diminuição na diferença de energia entre eles, ou seja, promove um deslocamento na posição da banda de absorção para o vermelho, à medida que a polarizabilidade aumenta. Com o intuito de demonstrar este efeito da polarizabilidade do meio sobre o perfil de absorção da AB, encolheram-se três solventes; metanol, água e dimetil sulfoxido, cujos índices de refração são 1,3284, 1,3330 e 1,4793 respectivamente. Os espectros experimentais obtidos para os respectivos solventes são apresentados na Fig.B. 2.

Fig.B. 2 - Espectros de absorção da AB a 0,4 μM dispersa em **Metanol**(—), em **Água** (---), em **DMSO** (---)

Analisando os resultados obtidos, Fig.B. 2, alguns fatos podem ser destacados: (1) existência de conservação no perfil da banda de absorção, para os três solventes, o que indica baixa perturbação dos níveis de energia com a alteração dos solventes; (2) a existência de uma pequena variação de intensidade das bandas, efeito este já relatado anteriormente, mas que ainda não está bem entendido; (3) o deslocamento da banda de absorção, o qual apresenta-se como o efeito mais pronunciado, onde observa-se que o primeiro pico da banda de absorção pode ser encontrado em 405 nm para o metanol, 409 nm para a água e 417 nm para o DMSO.

O deslocamento das bandas, quando analisado com referência à constante dielétrica dos solventes, não apresenta uma dependência consistente com este parâmetro físico, já que a água, que é o solvente de maior constante dielétrica ($\epsilon = 79$), encontra-se com o primeiro pico em 409 nm; já o DMSO que possui constante dielétrica menor ($\epsilon = 47$), apresenta seu pico em 417 nm, mas em contrapartida o metanol, que possui constante dielétrica menor ainda ($\epsilon = 33$), apresenta o primeiro pico em 405 nm. Em resposta à constante dielétrica, seria esperado que o espectro da AB em metanol sofresse um deslocamento para o vermelho com relação ao DMSO, que possui maior constante dielétrica. Um resumo dos valores das propriedades físicas relatadas acima e a posição do primeiro pico de absorção da AB, nos diferentes solventes, é apresentada na **Tab.B.1**.

Tab.B.1 Relação entre as propriedades físicas dos solventes, constante dielétrica (ϵ) e índice de refração (n), e a posição do primeiro pico de absorção (λ_1) da AB inserida nos mesmos.

	ϵ	n	Posição λ_1 (nm)
Metanol	33	1,3284	405
Água	79	1,3330	409
DMSO	47	1,4793	417

Quando a dependência da posição do pico de absorção é analisada com referência ao índice de refração dos solventes, constata-se um deslocamento para o vermelho à medida que se aumenta o índice de refração, indicando assim uma dependência consistente com a grandeza física, ou seja, quanto maior o índice de refração, maior o deslocamento para o vermelho. Sendo assim, os resultados obtidos demonstram que a interação dominante entre solvente-soluto ocorre entre as polarizabilidades, como já era esperado, e o efeito da polaridade do meio é pouco pronunciado.

Apêndice C - Interações entre cromóforos

(Cantor e Schimmel, 1980; Marion, 2004)

Cromóforos em dispersões extremamente diluídas apresentam espaçamento médio entre vizinhos grande o suficiente para que as interações entre eles sejam desprezadas. Moléculas em situações como esta são consideradas não interagentes, e normalmente são chamadas de monômeros. À medida que a concentração de cromóforo aumenta, o espaçamento médio entre eles tende a diminuir, e interações anteriormente desprezadas podem então tornar-se relevantes. Usualmente, para uma situação onde os cromóforos ainda mantêm sua identidade sem que ocorra sobreposição de funções de onda, as principais interações entre cromóforos são tratadas como de caráter exclusivamente elétrico, ou seja, apenas devido às propriedades de distribuição de carga das moléculas. Sabe-se que a distribuição de carga molecular é responsável pelos momentos de multipolos elétricos, e a eles estão associados potenciais elétricos de multipolos. Numa situação onde uma molécula está suficientemente próxima à outra, tem-se que o potencial de uma pode ser sentido pela outra, e quando isto ocorre o novo potencial no referencial da molécula acaba perturbando a distribuição de carga original, que é a responsável por diversas propriedades intramoleculares. Quando se estuda a perturbação do acoplamento elétrico entre cromóforos aos estados eletrônicos da molécula, observa-se que podem ocorrer alterações nas energias dos estados, podem surgir desdobramentos de estados ou até mesmo variações nas probabilidades de transição entre estados. As alterações nas propriedades moleculares são de extremo interesse na ciência, pois podem ser parâmetros que auxiliam na análise estrutural de biopolímeros ou na constatação da formação de agregados em diversos sistemas.

Uma forma de monitorar os efeitos da interação entre cromóforos seria realizar experimentos de absorção óptica, com o intuito de levantar os respectivos espectros de absorção. Como estes experimentos apenas observam transições entre estados eletrônicos, torna-se necessário conhecer os estados acessíveis ao sistema na presença e na ausência dos potenciais perturbadores, para que assim seja possível quantificar as alterações devido ao acoplamento. A forma tradicional de se encontrar os estados eletrônicos de um sistema seria escrever a Hamiltoniana para o mesmo e em seguida resolver a equação de Schrödinger dependente do tempo. Usualmente a Hamiltoniana de um sistema acoplado e na presença de uma radiação eletromagnética pode ser escrita como:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{V}_1(t) + \hat{V}_2(t) \quad \text{C.(1)}$$

Sendo “ H_0 ” a soma das Hamiltoninas independentes do tempo para todos os cromóforos isolados, “ V_I ” o potencial de interação entre cromóforos e “ V_2 ” o potencial de acoplamento com a onda E.M. Uma das grandes dificuldades na formalização da equação C.(1) está em se encontrar um potencial “ V_I ” capaz de descrever as alterações experimentais observadas. A dificuldade na descrição das interações ocorre devido à pluralidade de formas e combinações possíveis, o que torna a tarefa de escolha de um potencial que satisfaça todos os requisitos para a descrição dos espectros experimentais um trabalho cauteloso. Neste texto o interesse está em demonstrar potenciais “ V_I ” capazes de descrever dois efeitos de interação cromóforo-cromóforo específicos: o efeito de desdobramento da banda, ou Éxciton, e o efeito de Hipocromismo. O interesse neste dois efeitos se dá pelo fato de poderem ser observados em sistemas moleculares de anfotericina B.

O desenvolvimento a seguir irá considerar apenas o caso para duas moléculas próximas o suficiente para que interajam eletricamente, mas mantendo sua identidade individual. Isto é, os elétrons ainda estarão localizados em apenas um monômero, com cada monômero sendo perturbado apenas pelo campo elétrico do outro.

Efeito éxciton

O efeito Éxciton é caracterizado pelo surgimento de um desdobramento na banda de absorção, devido ao acoplamento elétrico entre cromóforos. Este efeito é conhecido como efeito Éxciton, pois o modelo teórico que descreve muito bem os dados experimentais baseia-se na teoria de Éxciton, aplicada anteriormente, com sucesso, em sistemas cristalinos.

A teoria de Éxcitons baseia-se nos conceitos da Mecânica Quântica e explica o efeito de desdobramento da banda de absorção como sendo consequência do acoplamento ressonante entre os momentos de dipolos de transição das moléculas envolvidas. O efeito Éxciton considera apenas o acoplamento ressonante entre os dipolos induzidos de transição associados a transições com energias equivalentes à energia da radiação incidente. O ferramental matemático empregado no desenvolvimento destes conceitos foge ao objetivo deste texto, que pretende apenas apresentar uma argumentação sobre desdobramento da banda. Sendo assim, apresenta-se uma análise qualitativa da resposta do sistema acoplado, através de uma aproximação clássica de osciladores harmônicos acoplados. Nesta aproximação os monômeros serão representados por dois osciladores harmônicos e a força de interação entre eles será representada por uma força harmônica de acoplamento.

Fig.C.1. Representação esquemática do sistema de dois osciladores harmônicos acoplados.

O sistema a ser observado será descrito em apenas uma dimensão, considerando as duas massas acopladas por uma mola de constante elástica κ_{12} e conectadas a molas com extremidades fixas de constante elástica κ . O movimento será restrito na linha de conexão das massas, com apenas dois graus de liberdade, representados pelas coordenadas x_1 e x_2 . Cada coordenada será medida em relação à posição de equilíbrio. Desta forma inicia-se com a equação de movimento do sistema, que pode ser escrita como:

$$\begin{aligned} m_1 \ddot{x}_1 + (\kappa + \kappa_{12}) x_1 - \kappa_{12} x_2 &= 0 \\ m_2 \ddot{x}_2 + (\kappa + \kappa_{12}) x_2 - \kappa_{12} x_1 &= 0 \end{aligned} \quad \text{C.(2)}$$

Como espera-se que o sistema tenha um comportamento oscilatório a uma dada perturbação, pode-se propor como solução para a equação de movimento C.(2) funções do tipo:

$$\begin{aligned} x_1(t) &= B_1 e^{i\omega t} \\ x_2(t) &= B_2 e^{i\omega t} \end{aligned} \quad \text{C.(3)}$$

Substituindo as soluções propostas em C.(3) nas equações de movimento C.(2), tem-se que:

$$\begin{aligned} -m_1 \omega^2 B_1 e^{i\omega t} + (\kappa + \kappa_{12}) B_1 e^{i\omega t} - \kappa_{12} B_2 e^{i\omega t} &= 0 \\ -m_2 \omega^2 B_2 e^{i\omega t} + (\kappa + \kappa_{12}) B_2 e^{i\omega t} - \kappa_{12} B_1 e^{i\omega t} &= 0 \end{aligned} \quad \text{C.(4)}$$

O que permite escrever então:

$$\begin{aligned} (-m_1 \omega^2 + \kappa + \kappa_{12}) B_1 - \kappa_{12} B_2 &= 0 \\ (-m_2 \omega^2 + \kappa + \kappa_{12}) B_2 - \kappa_{12} B_1 &= 0 \end{aligned} \quad \text{C.(5)}$$

Para que se tenha uma solução não trivial, simultaneamente para ambas as equações, deve-se garantir que seja satisfeita a seguinte relação:

$$(-M\omega^2 + \kappa + \kappa_{12})^2 - \kappa_{12}^2 = 0 \quad \text{C.(6)}$$

Considerou-se $M=m_1=m_2$. E através da C.(6) é possível escrever a frequência natural de oscilação do sistema como:

$$\omega = \sqrt{\frac{\kappa + \kappa_{12} \pm \kappa_{12}}{M}} \quad \text{C.(7)}$$

Isso fornece o seguinte:

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{\kappa + 2\kappa_{12}}{M}} \quad ; \quad \omega_2 = \sqrt{\frac{\kappa}{M}} \quad \text{C.(8)}$$

O resultado encontrado apresenta existência de duas frequências características para o sistema de dois osciladores acoplados, que podem ser tratadas como frequências de oscilações simétricas e anti-simétricas. Quando fixa-se uma das massas e permite-se a oscilação apenas da outra, os resultados anteriores devem recair na frequência de oscilação natural do sistema isolado. Desta forma é possível definir a frequência natural do sistema sem acoplamento como:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{\kappa + \kappa_{12}}{M}} \quad \text{C.(9)}$$

Sendo assim, comparando-se as frequências encontradas em C.(8) e C.(9), pode-se dizer que:

$$\omega_1 > \omega_0 > \omega_2 \quad \text{C.(10)}$$

$$\begin{aligned} \omega_1^2 &= \omega_0^2 + \frac{\kappa_{12}}{M} \\ \omega_2^2 &= \omega_0^2 - \frac{\kappa_{12}}{M} \end{aligned} \quad \text{C.(11)}$$

Onde então observa-se que o acoplamento entre dois osciladores provoca o desdobramento da frequência natural de oscilação em duas novas frequências, uma maior e uma menor que a frequência natural. Para o caso de o sistema ser composto por três osciladores acoplados, observa-se um desdobramento na frequência natural de três novas frequências, e quando generaliza-se o resultado para N, osciladores espera-se que o sistema possua N frequências naturais.

Os resultados apresentados anteriormente são interessantes, pois fornecem uma forma ilustrativa de avaliar o efeito do acoplamento harmônico entre duas moléculas, propondo como resultado o desdobramento da frequência natural do sistema. Entretanto, sabe-se que os resultados obtidos para um sistema clássico não são facilmente extrapolados a um sistema quântico, mas fornecem uma análise qualitativa do efeito.

Na tentativa de criar a conexão com a Mecânica Quântica, imagine primeiramente apenas um átomo, constituído apenas de um elétron. Imagine agora que seja possível aproximar a força de ligação existente entre o núcleo e o elétron por uma força do tipo massa-mola (ou harmônica). Então pode-se dizer que cada estado de energia do sistema atômico pode ser representado pelo estado de energia de um oscilador harmônico, o que então permitiria aproximar os auto-valores da energia do sistema atômico aos auto-valores da energia do oscilador harmônico. Os auto-valores da energia para o oscilador harmônico são definidos como:

$$E_n = \hbar \omega \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad \text{C.(12)}$$

“n” é o número quântico associado a um determinado estado e “ω” é a frequência natural de oscilação do sistema. Imaginando agora que seja possível também aproximar o potencial de interação entre dois átomos por um potencial harmônico, espera-se que o acoplamento entre eles faça surgir um desdobramento no estado de energia do sistema. O desenvolvimento teórico quântico para sistemas de partículas interagentes foi discutido na literatura há algumas décadas. De uma forma simplificada, as frequências de transição do primeiro estado excitado de um sistema de duas partículas interagindo eletricamente podem ser apresentadas como:

$$\begin{aligned} \nu_1 &= \nu_{0a} + V_I \\ \nu_2 &= \nu_{0a} - V_I \end{aligned} \quad \text{C.(13)}$$

“ν_{0a}” é a frequência de transição para os monômeros isolados, “V_I” é o potencial de interação entre os cromóforos e “ν₁” e “ν₂” são as novas frequências de transição do sistema acoplado. Como pode ser observado, a C.(13) obtida através de modelos quânticos possui uma estrutura muito

semelhante à C.(11), na qual utiliza-se do modelo clássico do oscilador harmônico. Estes resultados demonstram a correspondência entre os dois modelos, de modo que em C.(13) observa-se a presença explícita do potencial de interação “ V_I ”, e em C.(11) observa-se a dependência com a constante elástica de acoplamento κ_{12} .

Outro resultado importante observado para o efeito Éxciton é a conservação da intensidade total da banda de absorção. Esta característica de conservação da intensidade torna importante as intensidades relativas entre cada nova banda, pois a soma das intensidades das novas bandas deve ser igual à intensidade da banda original. Como as intensidades de cada banda são dependentes da orientação entre os dipolos induzidos de cada molécula, a análise da intensidade permite retirar informações sobre a estrutura de organização das moléculas no meio. A intensidade dos momentos de dipolos de transição, para este sistema de duas partículas, é dada por:

$$\begin{aligned} D_{01} &= D_{0a} + D_{0a} \cos \theta \\ D_{02} &= D_{0a} - D_{0a} \cos \theta \end{aligned} \quad \text{C.(14)}$$

“ D_{0a} ” se refere às intensidades dos momentos de dipolo de transição para os monômeros isolados, “ D_{01} e D_{02} ” são as intensidades para os novos estados e o ângulo relativo entre os momentos de dipolo de cada monômero.

Efeito de Hipocromismo

Outro efeito que pode perturbar as propriedades espectrais de um cromóforo, quando o acoplamento elétrico entre moléculas ocorre, é o Hipocromismo, que está associado à perda de intensidade da banda de absorção. Ao contrário do que se possa imaginar, o efeito da variação de intensidade da banda de um dado cromóforo não pode ser interpretado com base na teoria de Éxciton, pois a mesma não prevê variação da intensidade. Historicamente, diversos artigos na literatura tentaram formalizar uma interpretação teórica sobre este efeito, mas sempre houve um grande número de discussões e desacordos. Um dos modelos mais aceitos atualmente foi proposto por (Rhodes e Chase, 1967), que utilizaram uma função de resposta linear para a susceptibilidade elétrica do sistema. Este modelo apresenta um grau elevado de formalismo matemático e não será apresentado neste texto. A discussão realizada aqui será apenas qualitativa com o intuito de apresentar as idéias envolvidas no modelo.

A intensidade de radiação absorvida por um sistema nada mais é que a quantidade de energia perdida por um feixe de luz quando o mesmo interage com o sistema. Classicamente, a intensidade de uma onda E.M. é definida como a variação média da densidade de potência eletromagnética

transportada; sendo assim, a absorção implica transferência de potência da onda E.M. para o meio. Na descrição quântica, a taxa de transição total de um sistema pode ser definida como:

$$W = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \sum_{n,m} \langle \Psi_n | \mu_{n,m} | \Psi_m \rangle E_{local} \right|^2 \quad C.(15)$$

“ $\mu_{n,m}$ ” representa o momento de dipolo elétrico de transição entre os estados “m” e “n” e “ E_{local} ” é o campo elétrico local sentido pela molécula. Como é de se esperar, a taxa de transição do sistema determinará a intensidade de radiação absorvida, e, como se observa, a taxa de transição depende do momento de dipolo de transição da molécula. O momento de dipolo de transição é um momento que surge na presença de um campo de radiação e durante a transição entre estados. Classicamente, um momento de dipolo induzido em uma molécula é caracterizado como sendo proporcional a uma grandeza chamada polarizabilidade molecular e ao campo que é aplicado a mesma (ver Apêndice D). Transportando a descrição clássica de momento de dipolo induzido ao formalismo em questão, pode-se reescrever a C.(15) como:

$$W = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \sum_{n,m} E_{local} \langle \Psi_n | \alpha_{n,m} | \Psi_m \rangle E_{local} \right|^2 \quad C.(16)$$

Então, “ $\alpha_{n,m}$ ” seria a grandeza definida como polarizabilidade molecular, mas que agora está associada a transições entre estados “n” e “m”. Este formalismo então propõe que a intensidade de absorção é uma grandeza proporcional à polarizabilidade molecular. Rhodes e Chase, em seu trabalho mostraram como definir a polarizabilidade molecular para uma situação de acoplamento elétrico entre cromóforos. A solução encontrada por eles apresentou uma estrutura muito semelhante à encontrada por (De Voe, 1964), que de maneira clássica propôs a existência de uma polarizabilidade efetiva dependente do potencial de interação entre as moléculas. De Voe propôs que o momento de dipolo clássico de uma molécula pode ser encontrado através da composição entre o campo local “ E_{local} ” aplicado a ela e o campo devido à polarização dos cromóforos vizinhos. A proposta de De Voe ser expressa como:

$$\vec{\mu}_i(\nu) = \alpha_i(\nu) \left[\hat{e}_i E_{local} - \sum_{j=1}^N G_{i,j} \vec{\mu}_j(\nu) \right] \quad C.(17)$$

Onde “ $\vec{\mu}_i$ ” é o momento de dipolo induzido na molécula “i”, “ $\hat{e}_i$ ” representa a direção do momento de dipolo induzido na molécula “i” pelo campo local E_{local} , “ α_i ” representa a

polarizabilidade da molécula isolada “i”, “ G_{ij} ” o coeficiente de interação entre a molécula “i” e a molécula “j” e “ $\vec{\mu}_j$ ” o momento de dipolo induzido na molécula “j”. O fator “ G_{ij} ” pode ser descrito por uma aproximação de energia de interação entre os momentos de dipolos pontuais, o que pode ser definido como:

$$G_{ij} = r_{ij}^{-3} [\hat{e}_i \cdot \hat{e}_j - 3(\hat{e}_i \cdot \hat{e}_{ij})(\hat{e}_j \cdot \hat{e}_{ij})] \quad C.(18)$$

“ $\hat{e}_{ij}$ ” é o versor ao longo da linha entre os dois monômeros e “ r_{ij} ” é a distância entre eles. Para uma situação onde $i=j$ tem-se que $G_{ij}=0$. Considerando agora que o sistema que deseja-se observar seja composto apenas por duas moléculas interagindo, tem-se que a C.(17) pode ser reescrita como:

$$\vec{\mu}_1(\nu) = \alpha_1(\nu) [\hat{e}_1 \cdot E_{local} - G_{12} \vec{\mu}_2(\nu)] \quad C.(19)$$

Até o momento todas as grandezas utilizadas são de caráter clássico. Partindo agora para um tratamento quântico, mas mantendo a estrutura da relação C.(19) válida, tem-se que o momento de dipolo de transição entre os estados $0 \rightarrow a$ da molécula 1 pode ser descrito como:

$$\vec{\mu}_{1(0a)}(\nu) = \alpha_{1(0 \rightarrow a)}(\nu) [\hat{e}_1 \cdot E_{local} - G_{12} \vec{\mu}_2(\nu)] \quad C.(20)$$

“ $\alpha_{1(0a)}$ ” é a polarizabilidade associada à transição $0 \rightarrow a$ da molécula 1 e “ $\vec{\mu}_2$ ” o momento de dipolo total gerado na molécula 2. Considerando a definição quântica da polarizabilidade molecular de um cromóforo isolado como:

$$\alpha(\nu) = \sum_b \alpha_{0b} = (2/h) \sum_b \left[\frac{(\nu_b \langle \Psi_0 | \vec{\mu} | \Psi_b \rangle \langle \Psi_b | \vec{\mu} | \Psi_0 \rangle)}{(\nu_{0b}^2 - \nu^2)} \right] \quad C.(21)$$

“ $\vec{\mu}$ ” corresponde ao momento de dipolo de transição, “ ν_{0b} ” a frequência da onda necessária para que ocorra uma transição entre o estado $0 \rightarrow b$ e “ ν ” a frequência da onda incidente. A partir desta definição C.(21), o momento de dipolo da molécula 2 pode ser escritos como:

$$\vec{\mu}_2 = \left(\sum_b \alpha_{2(0b)} \right) \hat{e}_2 E_{local} \quad C.(22)$$

Isso permite escrever a C.(21) como:

$$\vec{\mu}_{1(0a)}(v) = \alpha_{1(0a)} \left[\hat{e}_1 E_{Local} - G_{12} \left(\sum_b \alpha_{2(0b)} \right) \hat{e}_2 E_{local} \right] \quad C.(23)$$

Ou

$$\mu_{1(0a)} = \alpha_{1(0a)} \hat{e}_1 E_{Local} - \underbrace{\alpha_{1(0a)} G_{12} \alpha_{2(0a)} \hat{e}_2 E_{Local}}_{\text{Éxciton}} - \underbrace{\alpha_{1(0a)} G_{12} \left(\sum_{b \neq a} \alpha_{2(0b)} \right) \hat{e}_2 E_{local}}_{\text{Hipocromismo}} \quad C.(24)$$

A expressão anterior C.(24) apresenta uma estrutura muito semelhante aos resultados obtidos na Eq.(35) de (Rhodes e Chase, 1967) ou aos obtidos na Eq.(1) de (Tinoco, 1960). A seqüência do desenvolvimento teórico seria substituir a C.(24) em C.(15), resolvê-la para termos conhecidos e demonstrar que o efeito de interação entre moléculas realmente pode provocar diminuição da intensidade de absorção. Este desenvolvimento completo já foi realizado, por métodos diferentes, tanto em (Rhodes e Chase, 1967) como em (Tinoco, 1960), porém demanda um esforço elevado para o seu entendimento com clareza. Desta forma, para os que querem ter um melhor entendimento dos conceitos envolvidos no modelo, sugere-se a consulta a estes trabalhos. A conclusão final de ambos os trabalhos, (Rhodes e Chase, 1967) e (Tinoco, 1960), é que o efeito de Hipocromismo no espectro de absorção só pode ser presenciado quando o último termo do lado direito da C.(24) for levado em consideração, ou seja, modelos que desconsiderem a contribuição deste último termo são incapazes de descrever o Hipocromismo.

O último termo da C.(24) é interpretado como o acoplamento entre o momento de dipolo induzido na região de absorção de uma molécula e os momentos de dipolos induzidos nas moléculas vizinhas fora da região de absorção; em (Rhodes e Chase, 1967), este termo é designado como contribuição de fundo da polarizabilidade. Quando essa contribuição de fundo é desconsiderada, o sistema recai em um problema que pode ser descrito pelos conceitos da teoria de Éxcitons, onde obrigatoriamente a intensidade da banda de absorção é conservada, ou seja, recai em um problema que não prevê alterações na intensidade da banda de absorção.

Apêndice D - Clausius-Mossotti

(Machado, 2000)

A distribuição eletrônica é a responsável por diversas propriedades elétricas encontradas nas moléculas. Os efeitos eletrostáticos de uma distribuição eletrônica qualquer podem ser caracterizados através da expansão em multipolos do potencial escalar, como apresentado em D.(1):

$$V(\vec{r}) = \frac{1}{\epsilon_0} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^{m=+l} \frac{1}{2l+1} q_{l,m} \frac{Y_{l,m}(\theta, \varphi)}{r^{l+1}} \quad \text{D.(1)}$$

Define-se que os parâmetros “ $q_{l,m}$ ” são os momentos da expansão, “ $Y_{l,m}$ ” são os argumentos dos harmônicos esféricos, e “ r ” é a distância de observação dos potenciais. Na expansão, cada momento representa uma determinada propriedade elétrica efetiva da molécula, o primeiro momento da expansão, $q_{0,0}$, está associado à presença de carga efetiva; os momentos $q_{1,0}$, $q_{1,1}$ e $q_{1,-1}$ estão associados aos efeitos de dipolo; e assim segue para as ordens maiores, onde os próximos momentos estarão associados aos efeitos de quadrupolo efetivo. Moléculas neutras apresentam o primeiro momento da expansão nulo, pois sua carga efetiva é zero. Mas carga zero não implica momentos de ordens superiores nulos, pois os momentos característicos, ou intrínsecos, de ordens superiores da molécula representam a distribuição não uniforme na densidade eletrônica, sendo consequência direta da geometria e dos átomos que a constituem. As propriedades intrínsecas da distribuição eletrônica podem ser modificadas quando as mesmas estão submetidas à presença de um campo elétrico. A interação da nuvem eletrônica com o campo pode provocar um rearranjo da distribuição eletrônica e uma consequente alteração nos momentos da expansão. As perturbações nos momentos normalmente são chamadas de induzidas e podem ser avaliadas de acordo com modelos específicos. O momento de dipolo induzido é avaliado seguindo um modelo onde a intensidade do dipolo é proporcional à intensidade do campo elétrico sentido pela molécula. Na D(2) apresenta-se o modelo de dipolo induzido para um determinado campo local:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}_{Local} \quad \text{D.(2)}$$

“ $\vec{p}$ ” é o momento de dipolo, “ α ” representa a polarizabilidade molecular e “ $\vec{E}_{Local}$ ” é o campo elétrico local ao qual a molécula está submetida. A polarizabilidade de uma molécula é a grandeza que quantifica o grau de susceptibilidade da nuvem eletrônica de se deformar na presença de um campo. Desta forma, quando uma molécula está submetida à presença de um campo, o

momento de dipolo molecular deve ser avaliado através da análise do momento de dipolo intrínseco e do momento de dipolo induzido.

Deve-se salientar que até o momento apenas foram tratados os casos para uma molécula independente. Imagine agora um meio denso onde diversas moléculas estão presentes. Nesta situação os efeitos eletrostáticos não serão mais consequência apenas da distribuição eletrônica de uma molécula, mas sim uma resposta resultante à distribuição de todas as moléculas presentes no meio. Pode-se avaliar as características elétricas de um meio utilizando-se a mesma metodologia aplicada a uma molécula, ou seja, através da expansão em multipolo. Sendo assim, tem-se carga efetiva do meio, momento de dipolo e momento de quadrupolo do meio. A carga efetiva é computada simplesmente através da soma entre todas as cargas presentes no meio. O momento de dipolo do meio é tratado como a soma vetorial entre todos os momentos dipolos moleculares presentes no mesmo, assim como apresentado na D.(3):

$$\vec{p}_{meio} = \sum_i^N \vec{p}_i \quad D.(3)$$

“ $\vec{p}_i$ ” são os momentos de dipolo de cada molécula que constitui o meio. Normalmente, à temperatura ambiente, o somatório apresentado na D.(3) é igual a zero, pois as flutuações térmicas imprimem uma orientação aleatória a cada molécula do meio. A realidade do momento de dipolo do meio pode ser alterada quando um campo elétrico externo é aplicado. O campo externo tem a propriedade de provocar alinhamento dos dipolos intrínsecos de cada molécula com o campo, e de induzir momentos de dipolo na mesma direção do campo. Sendo assim, a presença do campo externo provoca o surgimento de efeitos elétricos macroscópicos no meio. A grandeza macroscópica que avalia a capacidade do campo elétrico de orientar os dipolos intrínsecos e/ou a capacidade de induzir dipolos por unidade de volume é a grandeza chamada de polarização. A polarização é descrita, para um meio dielétrico linear e na presença de campos elétricos pequenos, através da expressão D.(4):

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi_e \vec{E}_0 \quad D.(4)$$

“ $\vec{E}_0$ ” é o campo elétrico externo, “ χ_e ” é a susceptibilidade elétrica característica do meio e “ ϵ_0 ” representa a permissividade elétrica do vácuo. A polarização expressa na D.(4) informa o efeito macroscópico global da interação campo-meio, em função de grandezas macroscópicas do meio. Este tipo de grandeza é utilizada, por ser de fácil acesso para qualquer meio. Em um tratamento

onde grandezas microscópicas sejam consideradas para avaliar os efeitos macroscópicos, é necessária a implementação de alguns modelos, principalmente o de constituição da matéria. Microscopicamente pode-se dizer que polarização é o momento de dipolo resultante no meio por unidade de volume, pode-se escrever uma expressão auxiliar à equação D.(4), onde agora leva-se em conta as características microscópicas do meio. Esta expressão pode ser apresentada como:

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum_i^N \vec{p}_i \quad \text{D.(5)}$$

“ N ” é o número de dipolos elétricos presentes no material, “ V ” indica o volume total ocupado pelo meio e “ $\vec{p}_i$ ” o momento de dipolo de cada molécula individualmente. Considerando que as moléculas que compõem o meio sejam todas iguais, e não possuam momento de dipolo intrínseco, pode-se dizer que somente o efeito de momento de dipolo induzido contribui para a polarização, e desta forma substituindo a equação D.(2) em D.(5) obtém-se uma expressão para a polarização como:

$$\vec{P} = \frac{N}{V} \alpha \vec{E}_{Local} \quad \text{D.(6)}$$

Nesta relação considera-se que todos os momentos de dipolo induzidos estão na direção do campo aplicado. Este resultado avalia a polarização considerando propriedades microscópicas da molécula, onde então é possível criar uma conexão entre propriedades microscópicas da molécula com propriedades macroscópicas do meio. Esta conexão é obtida igualando-se as equações D.(4) e D.(6):

$$\epsilon_0 \chi_e E_0 = \frac{N}{V} \alpha E_{Local} \quad \text{D.(7)}$$

Isso permite escrever a susceptibilidade elétrica como:

$$\chi_e = \frac{N}{V} \frac{\alpha}{\epsilon_0} \frac{E_{Local}}{E_0} \quad \text{D.(8)}$$

É importante ressaltar que o resultado obtido até o momento é válido para os casos de campos elétricos estáticos, pois para o caso de uma onda E.M. deve-se levar em conta a resposta do meio à frequência da onda incidente.

Como observa-se na D.(8), existe uma dependência explícita do campo local e do campo externo. Em uma primeira aproximação estes campos podem ser considerados iguais. Entretanto, não necessariamente o campo local, E_{local} , sentido por uma molécula do material deve ser igual ao campo externo, E_0 , aplicado, pois quando considera-se os dois campos iguais estão sendo desprezadas as interações entre dipolos vizinhos. Em geral o campo local é maior que o campo externo, justamente devido à interação entre vizinhos. Uma aproximação para o campo local, D.(9), pode ser proposta considerando-se um meio homogêneo.

$$\vec{E}_{\text{Local}} = \vec{E}_0 + \frac{1}{3} \frac{\vec{P}}{\epsilon_0} \quad \text{D.(9)}$$

Utilizando a proposta de campo local, é possível obter uma nova expressão para a susceptibilidade elétrica, apenas substituindo D.(9) em D.(8):

$$\chi_e = \frac{N}{V} \frac{\alpha}{\epsilon_0} \frac{1}{E_0} \left[E_0 + \frac{1}{3} \frac{\epsilon_0 \chi_e E_0}{\epsilon_0} \right] \quad \text{D.(10)}$$

Observe que:

$$\frac{\chi_e}{(3 + \chi_e)} = \frac{N}{V} \frac{\alpha}{\epsilon_0} \frac{1}{3} \quad \text{D.(11)}$$

Tal resultado consegue relacionar a susceptibilidade elétrica de um meio com a polarizabilidade molecular. Como foi dito anteriormente, estes resultados são obtidos considerando campos elétricos estáticos, mas muitas vezes é de interesse o estudo da interação de uma onda E.M. com o material em questão, e sendo assim torna-se necessário encontrar uma forma simples de extrapolar estes resultados para uma condição de campo elétrico oscilante. A forma encontrada seria relacionar a susceptibilidade elétrica ao índice de refração, através da constante dielétrica, como em D.(12):

$$n_0^2 \approx K_e = (1 + \chi_e) \quad \text{D.(12)}$$

“ n_0 ” é o índice de refração do meio, e “ K_e ”, a constante dielétrica. Sendo assim, através de D.(12) é possível reescrever D.(11) como:

$$\frac{(n_0^2 - 1)}{(n_0^2 + 2)} = \frac{N}{V} \frac{\alpha}{\epsilon_0} \frac{1}{3} \quad \text{D.(13)}$$

Assim encontra-se a equação na forma conhecida como Clausius-Mossotti, que relaciona o índice de refração do meio com a polarizabilidade da molécula que o constitui.

Considerando agora uma situação onde o meio em questão se trata de uma solução, pode-se dizer que a equação de Clausius-Mossotti D.(13) assume uma forma como a apresentada na D.(14):

$$\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} = \rho_1 \frac{\alpha_1}{\epsilon_0} \frac{1}{3} + \rho_2 \frac{\alpha_2}{\epsilon_0} \frac{1}{3} \quad \text{D.(14)}$$

“ ρ_1 ” representa a densidade de moléculas do solvente, e “ ρ_2 ”, o número de moléculas do soluto. Porém, esta nova expressão D.(14) possui a propriedade de recair a expressão D.(13), no limite de ρ_2 tendendo a zero, ou seja:

$$\lim_{\rho_2 \rightarrow 0} \left[\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \right] = \left[\frac{(n_0^2 - 1)}{(n_0^2 + 2)} \right] \quad \text{D.(15)}$$

Sendo assim, considerando um regime onde a quantidade de moléculas de soluto seja muito pequena, torna-se possível expandir a expressão D.(14), em primeira ordem, como:

$$3 \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \Big|_{\rho_2=0} = 3 \frac{(n_0^2 - 1)}{(n_0^2 + 2)} + \rho_2 \left[\frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \right] 2n \frac{dn}{d\rho_2} \Big|_{\rho_2 \rightarrow 0} \quad \text{D.(16)}$$

Então, a expressão D.(16) representa a aproximação da equação de Clausius-Mossotti para uma solução com a quantidade de soluto pequena.

Apêndice E – Dependência da Turbidez com o comprimento de onda da luz

(Camerini-Otero e Loren, 1978; Henriques, em publicação, Guinier e Fournet, 1955; Hiemenz, 1986)

Como discutido anteriormente, a turbidez é uma grandeza que avalia a quantidade total de luz espalhada por um dado meio. A avaliação da dependência da Turbidez com o comprimento de onda da luz incidente tem sido usada para obter tamanho e massa de macromoléculas, acompanhar a dinâmica de interação entre macromoléculas, e corrigir espectros de absorção quando os mesmos apresentam contribuição de espalhamento, que corresponde ao interesse principal deste projeto. Sendo assim, inicia-se a discussão deste item a partir da definição geral de intensidade de espalhamento por um conjunto de partículas espalhadoras E.(1).

$$i_e(q) = I_0 \frac{\pi^2}{\epsilon_0^2} \frac{1}{\lambda^4} \alpha^2 N S(q) P(q) \frac{(1 + \cos^2 \phi)}{2R^2} \quad E.(1)$$

Na expressão acima, define-se:

i_e = Intensidade de espalhamento em uma dada direção.

q = Vetor de espalhamento.

I_0 = Intensidade de luz do feixe incidente.

ϵ_0 = Permissividade elétrica do meio.

λ = Comprimento de onda da luz incidente no vácuo.

α = Polarizabilidade da partícula espalhadora.

N = Número de partículas espalhadoras.

$S(q)$ = Fator de Estrutura da solução.

$P(q)$ = Fator de Forma da partícula espalhadora.

$(1 + \cos^2 \phi)$ = Fator referente à contribuição de um feixe de luz despolarizado.

R = Distância amostra-detector.

A expressão apresentada na E.(1) representa a expressão geral da intensidade de espalhamento para uma dada direção. Entretanto, para que esta expressão possa ser compreendida e possa ser utilizada, torna-se necessário adotar alguns modelos e definições para as grandezas envolvidas.

Uma primeira consideração seria assumir que os sistemas a serem analisados possam ser aproximados a sistemas diluídos de tal forma que a relação de Clausius-Mossotti (Apêndice D) possa ser considerada válida e a polarizabilidade “ α ” do meio expressa como:

$$\alpha = \frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \frac{1}{N_A} \left(2n \frac{dn}{dC} \right)_{C \rightarrow 0} \quad \text{E.(2)}$$

Na E.(2) “ n_0 ” representa o índice de refração apenas do solvente, “ n ” representa o índice de refração da solução, “ C ” a concentração de partículas espalhadoras e “ N_A ” o número de Avogadro. Logo, substituindo a E.(2) em E.(1) tem-se que:

$$i_e(q) = I_0 \frac{\pi^2}{\varepsilon_0^2} \frac{1}{\lambda^4} \frac{1}{N_A^2} \left[\frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \left(2n \frac{dn}{dC} \right) \right]^2 NS(q) P(q) \frac{(1 + \cos^2 \varphi)}{2R^2} \quad \text{E.(3)}$$

Com a polarizabilidade definida, tem-se no próximo passo para a análise da expressão a definição das grandezas fator de estrutura ($S(q)$) e fator de forma ($P(q)$), mas para tanto, deve-se primeiramente considerar que o sistema será analisado em um regime onde $q \cdot r \ll 1$, expresso como:

$$4\pi \text{sen}(\theta/2) \frac{r}{\lambda} \ll 1 \quad \text{E.(4)}$$

Assumindo “ λ ” como comprimento de onda da radiação e “ r ” uma distância de interferência do sistema. Sendo assim, considerando válido o regime apresentado em E.(4), pode-se definir o fator de estrutura ($S(q)$), conforme demonstrado em Henriques e col., como :

$$N S(q) = kT \frac{\rho V}{\left(\frac{\partial \Pi}{\partial \rho} \right)_{T,\mu}} + N(2\pi)^3 \rho \delta(q=0) \quad \text{E.(5)}$$

“ Π ” representa a pressão osmótica do sistema e “ ρ ” a densidade de partículas espalhadoras. Assumindo agora a condição de $q \neq 0$ e utilizando-se da expansão do virial, torna-se possível escrever a E.(5) como:

$$N S(q) = \frac{N_A VC}{\left(\frac{1}{M_w} + A_2 C + A_3 C^2 + \dots \right)} \quad \text{E.(6)}$$

Em que “ C ” representa a concentração e “ M_w ” a massa molecular da partículas espalhadoras. Portanto, a partir da expressão proposta em E.(6) pode-se reescrever a expressão E.(3) como:

$$i_e(q) = I_0 \underbrace{\frac{\pi^2}{\varepsilon_0^2} \frac{V}{N_A}}_B \frac{1}{\lambda^4} \left[\frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \left(2n \frac{dn}{dC} \right) \right]^2 \frac{C}{\left(\frac{1}{M_w} + A_2 C + A_3 C^2 + \dots \right)} P(q) \frac{(1 + \cos^2 \varphi)}{2R^2} \quad \text{E.(7)}$$

ou

$$\frac{i_e(q)}{I_0} = \frac{C}{\left(\frac{1}{M_w} + A_2 C + A_3 C^2 + \dots \right)} \frac{B}{\lambda^4} \left[\frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \left(2n \frac{dn}{dC} \right) \right]^2 P(q) \frac{(1 + \cos^2 \varphi)}{2R^2} \quad \text{E.(8)}$$

Após a definição do fator de estrutura, há a necessidade da definição do fator de forma ($P(\mathbf{q})$). Porém, como o interesse no Fator de Forma é maior neste projeto, ele será mais detalhado a seguir.

Fator de Forma “ $P(q)$ ” de uma partícula espalhadora

Quando uma partícula espalhadora possui dimensões da ordem do comprimento de onda da radiação incidente, as diferentes regiões da partícula devem ser tratadas como centros espalhadores independentes. Este tratamento é necessário, pois como a distância entre as regiões da partícula são da mesma magnitude que o comprimento de onda da radiação, alguns efeitos de interferência entre as ondas espalhadas passam ser mais relevantes. A função $P(\mathbf{q})$ é definida como:

$$P(q) = |F(q)|^2 \quad \text{E.(9)}$$

Assumindo “ $F(q)$ ” como a soma das fases das radiações de espalhamento referentes a cada centro espalhador que compõem a partícula, para uma distribuição discreta de centros espalhadores teria-se que a $F(\mathbf{q})$ é obtida por:

$$F(q) = \sum_{n=1}^Z e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_n} \quad \text{E.(10)}$$

Considerando “ Z ” como o número de centros espalhadores presentes na partícula e “ $\mathbf{r}_n$ ” representa o vetor posição dos centros espalhadores na mesma. Considerando agora uma distribuição contínua de centros espalhadores observa-se que:

$$F(q) = \int_{\mathbf{v}} e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \rho_e(\vec{r}) d\vec{r} \quad \text{E.(11)}$$

Em que “ ρ_e ” representa a densidade de centros espalhadores e “ v ” o volume ocupado pela partícula espalhadora. A partir da definição apresentada na E.(11) é possível dizer que a função $P(q)$ é descrita por:

$$P(q) = \int_v \int_v e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_1 - \vec{r}_2)} \rho_e(\vec{r}_1) \rho_e(\vec{r}_2) d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \quad E.(12)$$

Considerando $r = r_1 - r_2$ e $r_2 = r'$ é possível escrever que:

$$P(q) = \int_v e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \int_v \rho_e(\vec{r} + \vec{r}') \rho_e(\vec{r}') d\vec{r}' d\vec{r} \quad E.(13)$$

Tomando-se agora a definição da função $D(r)$ como:

$$D(\vec{r}) = \int_v \rho_e(\vec{r} + \vec{r}') \rho_e(\vec{r}') d\vec{r}' \quad E.(14)$$

Assim, torna-se possível escrever a $P(q)$ como:

$$P(q) = \int_v e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} D(\vec{r}) d\vec{r} \quad E.(15)$$

A expressão E.(15) representa a definição geral da função $P(q)$ e conseqüentemente a definição geral do fator de forma. Em uma situação real, como em uma solução, estão presentes no sistema diversas partículas espalhadoras, que podem assumir diferentes orientações com relação ao vetor de espalhamento “ q ”; logo, o fator de forma observado em um experimento de espalhamento de uma solução será um fator de forma médio. Portanto, torna-se necessário obter a média sobre as possíveis orientações das partículas e o vetor de espalhamento.

$$\langle P(q) \rangle_e = \int_v D(\vec{r}) \langle e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \rangle d\vec{r} \quad E.(16)$$

Esta média espacial da amplitude de fase apresentada na E.(16) foi obtida pela primeira vez por Debye, em 1915 e é expressa como:

$$\langle e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \rangle = \frac{\text{sen} qr}{qr} \quad E.(17)$$

Substituindo então a E.(17) em E.(16), tem-se que:

$$\langle P(q) \rangle_e = \int_v D(\vec{r}) \frac{\text{sen} qr}{qr} d\vec{r} \quad E.(18)$$

A E.(18) descreve o Fator de Forma médio para um conjunto de partículas orientadas homogeneamente com relação ao vetor de espalhamento. Considerando novamente um regime onde $q \cdot r \ll 1$, é possível expandir a relação de Debye da seguinte forma:

$$\frac{\text{sen}qr}{qr} \approx 1 - \frac{(qr)^2}{3!} + \frac{(qr)^4}{5!} - \frac{(qr)^6}{7!} \dots \quad \text{E.(19)}$$

Substituindo agora a E(19) na E(18), observa-se que:

$$\langle P(q) \rangle_e = \int_v D(\vec{r}) d\vec{r} - \frac{q^2}{3!} \int_v r^2 D(\vec{r}) d\vec{r} + \frac{q^4}{5!} \int_v r^4 D(\vec{r}) d\vec{r} - \frac{q^6}{7!} \int_v r^6 D(\vec{r}) d\vec{r} \dots \quad \text{E.(20)}$$

Sabendo-se que a definição de momento de uma função distribuição ($f(x)$) qualquer é expressa como:

$$\mu_n' = \int_{-\infty}^{\infty} x^n f(x) dx \quad \text{E.(21)}$$

Torna-se possível então escrever a E.(20) em função dos momentos da distribuição $D(r)$, como na E.(22):

$$\langle P(q) \rangle_e = \mu_0' - \frac{q^2}{3!} \mu_2' + \frac{q^4}{5!} \mu_4' - \frac{q^6}{7!} \mu_6' \dots \quad \text{E.(22)}$$

A E.(22) corresponde ao Fator de Forma médio expresso em série de potências, conforme as condições do sistema esta série poderá ser truncada em ordens inferiores.

De posse das definições anteriores, tem-se então a expressão geral da intensidade de luz espalhada por um sistema de partículas em solução. Com esse resultado torna-se possível partir para a análise, propriamente dita, do comportamento da turbidez em função do comprimento de onda da luz incidente, que será apresentada a seguir.

Turbidez e a dependência com o comprimento de onda da luz incidente

Inicia-se este tratamento a partir da definição da turbidez. Conforme já discutido no item 2.2., pode-se dizer que a turbidez é dada por:

$$\tau = \frac{I_e}{I_0} = \sum_{\text{ângulos}} \frac{i_e(q)}{I_0} \quad \text{ou} \quad \tau = \int_{\Omega} \frac{i_e(q)}{I_0} d\Omega \quad \text{E.(23)}$$

Na E.(23), a soma sobre todos os ângulos de espalhamento pode ser substituída pela integral sobre uma superfície esférica de raio r e com elemento de área “ $d\Omega$ ”. Portanto, substituindo a equação E.(8) na equação E.(23), tem-se que:

$$\tau = \frac{C}{\left(\frac{1}{M_w} + A_2 C + A_3 C^2 + \dots\right)} \frac{B}{\lambda^4} \left[\frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \left(2n \frac{dn}{dC}\right) \right]^2 \underbrace{\int_{\Omega} P(q) \frac{(1 + \cos^2 \phi)}{2R^2} d\Omega}_{Q(\lambda)} \quad \text{E.(24)}$$

A E.(24) apresenta a expressão geral para a turbidez. Como o objetivo principal é avaliar a dependência da turbidez com o comprimento de onda da luz incidente, deve-se então calcular primeiramente a integral sobre o ângulo sólido “ Ω ”. Assim, a função $Q(\lambda)$ pode ser escrita como:

$$Q(\lambda) = \int_{\Omega} P(q) \frac{(1 + \cos^2 \phi)}{2R^2} d\Omega = \int_0^{\pi} P(q) \frac{(1 + \cos^2 \phi)}{2R^2} 2\pi R^2 \sin \phi d\phi \quad \text{E.(25)}$$

Considerando a descrição de $P(q)$ apresentada em E.(22), com expressão válida, tem-se que:

$$Q(\lambda) = \int_0^{\pi} (1 + \cos^2 \phi) \sin \phi d\phi - \left[\frac{(4\pi/\lambda)^2 \mu_2'}{(3!)} \right] \int_0^{\pi} (1 + \cos^2 \phi) \sin \phi \sin^2 \phi d\phi + \left[\frac{(4\pi/\lambda)^4 \mu_4'}{(5!)} \right] \int_0^{\pi} (1 + \cos^2 \phi) \sin \phi \sin^4 \phi d\phi \dots \quad \text{E.(26)}$$

que pode ser escrita, conforme (CameriniOtero e Day, 1978), como:

$$Q(\lambda) = 1 - \left(\sum_0^{\infty} (-1)^{n+1} S_{2n} \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right)^{2n} \frac{\mu_{2n}'}{(2n+1)!} \right) \quad \text{E.(27)}$$

assumindo,

$$S_{2n} = \left[\frac{2 + (n+1)(n+2)}{2 \left(2 + \sum_{l=1}^n (l+1)(l+2) \right)} \right] \quad \text{E.(28)}$$

Então com os resultados anteriores, é possível escrever uma expressão geral para Turbidez como:

$$\tau = \frac{C}{\left(\frac{1}{M_w} + A_2 C + A_3 C^2 + \dots\right)} \frac{B}{\lambda^4} \underbrace{\left[\frac{9}{(n_0^2 + 2)^2} \left(2n \frac{dn}{dC} \right) \right]}_{H(\lambda)}^2 \left[1 - \left(\sum_0^{\infty} (-1)^{n+1} S_{2n} \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right)^{2n} \frac{\mu_{2n}'}{(2n+1)!} \right) \right] \quad \text{E.(29)}$$

Porém, a E.(29) não apresenta uma dependência da turbidez com o comprimento de onda da luz muito simples, portanto, para se obter a dependência da turbidez com o comprimento de onda da luz deve-se executar um procedimento, em que toma-se o $\log \tau$ e aplica-se a derivada com relação a $\log \lambda$, e desta forma obtem-se uma expressão como a E.(30):

$$\frac{d \log \tau}{d \log \lambda} = -4 + \frac{d \log H(\lambda)}{d \log \lambda} + \frac{d \log Q(\lambda)}{d \log \lambda} \quad \text{E.(30)}$$

Camerini-Otero e Day (1978) demonstraram que a E.(30) é uma expressão que pode ser escrita como:

$$\frac{d \log \tau}{d \log \lambda} = -4 - \gamma + \beta \quad \text{E.(31)}$$

Com “ γ ” como um o parâmetro que depende das propriedades ópticas do meio e “ β ” é o parâmetro que depende do tamanho da partícula espalhadora, e leva a redução do expoente de “ λ ”. A partir da definição da E.(31), pode-se tentar, de uma forma simplista, aproximar a turbidez a uma função como a E.(32).

$$\tau \approx P_1 + \frac{P_2}{\lambda^{(4-\xi)}} \quad \text{E.(32)}$$

Na E.(32), “ P_1 ” e “ P_2 ” são parâmetros dependentes de todas as grandezas envolvidas na E. (29). A E.(32) pode ser utilizada para realizar ajustes de curvas experimentais de turbidez em função do comprimento de onda da luz incidente.

Referências

- Atkins, P.W. e Friedman, R.S. (1997) "Molecular Quantum Mechanics". Oxford University Press Inc., New York.
- Andersson, M., Hammarstrom, L. e Edwards, K. (1995) "Effect of Bilayer Phase-Transitions on Vesicle Structure and Its Influence on the Kinetics of Viologen Reduction". *J. Phys. Chem.*, 99 (39) 14531-14538.
- Atherton, N.M. (1993) "Principles of Electron Spin Resonance", Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Baginski, M., Czub, J. e Sternal, K. (2006) "Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: Molecular modeling studies". *Chem. Rec.*, 6 (6) 320-332.
- Barwicz, J., Gruszecki, W.I. e Gruda, I. (1993) "Spontaneous Organization of Amphotericin-B in Aqueous-Medium". *J. Colloid. Interf. Sci.*, 158 (1) 71-76.
- Benatti, C.R., Feitosa, E., Fernandez, R.M. e Lamy-Freund, M.T. (2001) "Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spin labels". *Chem. Phys. Lipids*, 111 (2) 93-104.
- Benatti, C.R., Tiera, M.J., Feitosa, E. e Olofsson, G. (1999) "Phase behavior of synthetic amphiphile vesicles investigated by calorimetry and fluorescence methods". *Thermochim. Acta*, 328 (1-2) 137-142.
- Bentatti, C.R., Lamy, A.T. e Epand, R.M. (2008) "Cationic amphiphiles and the solubilization of cholesterol crystallites in membrane bilayers". *Biochim. Biophys. Acta*, 1778 (4) 844-853.
- Bolard, J. (1986) "How Do the Polyene Macrolide Antibiotics Affect the Cellular Membrane-Properties". *Biochim. Biophys. Acta*, 864 (3-4) 257-304.
- Bolard, J., Cheron, M. e Mazerski, J. (1984) "Effect of Surface Curvature on the Interaction of Single Lamellar Phospholipid-Vesicles with Aromatic and Nonaromatic Heptaene Antibiotics (Vacidin-a and Amphotericin-B)". *Biochem. Pharmacol.*, 33 (22) 3675-3680.
- Bransden, B.H. e Joachain, C.J. (1983) "Physics of Atoms and Molecules", Addison Wesley Longman Limited, Edinburgh Gate.
- Brito, R.O. e Marques, E.F. (2005) "Neat DODAB vesicles: Effect of sonication time on the phase transition thermodynamic parameters and its relation with incomplete chain freezing". *Chem. Phys. Lipids*, 137 (1-2) 18-28.
- Caillet, J., Berges, J. e Langlet, J. (1995) "Theoretical study of the self-association of amphotericin B". *Biochim. Biophys. Acta*, 1240 (2) 179-195.

- Cameriniotero, R.D. e Day, L.A. (1978) "Wavelength Dependence of Turbidity of Solutions of Macromolecules". *Biopolymers*, 17 (9) 2241-2249.
- Cantor, C.R. e Schimmel, P.R. (1980) "Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function", em Bio, EE. W H FREEMAN, New York.
- Cevc, G. e Marsh, D. (1987) "Phospholipids Bilayers - Physical Principles and Models", em Cell Biology: A Series of Monographs, Vol.5, EE. Bittar, E. E., A Wiley-Interscience Publication, New York.
- Chang, H.C., Chang, J.J., Huang, A.H. e Chang, T.C. (2000) "Evaluation of a capacitance method for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures". *J. Clin. Microbiol.*, 38 (3) 971-976.
- Chen, W.C. e Bittman, R. (1977) "Kinetics of Association of Amphotericin-B with Vesicles". *Biochemistry*, 16 (19) 4145-4149.
- Cocquyt, J., Olsson, U., Olofsson, G. e Van der Meeren, P. (2004) "Temperature quenched DODAB dispersions: Fluid and solid state coexistence and complex formation with oppositely charged surfactant". *Langmuir*, 20 (10) 3906-3912.
- Coutinho, A. e Prieto, M. (1995) "Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: A time-resolved fluorescence study". *Biophys. J.*, 69 (6) 2541-2557.
- Coutinho, A. e Prieto, M. (2003) "Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles". *Biophys. J.*, 84 (5) 3061-3078.
- Devoe, H. (1964) "Optical Properties of Molecular Aggregates .I. Classical Model of Electronic Absorption + Refraction". *J Chem Phys*, 41 (2) 393-&.
- Duarte, E.L. (2000) "Estudo de Fases Termotrópica por Microscopia Óptica, Medidas de Densidade, Entálpicas e Espalhamento de Raios X", Dissertação de Mestrado - Instituto de Física - USP, São Paulo.
- Duarte, E.L., Oliveira, T.R., Alves, D.S., Micol, V. e Lamy, M.T. (2008) "On the interaction of the anthraquinone barbaloin with negatively charged DMPG bilayers". *Langmuir*, 24 (8) 4041-4049.
- Ernst, C., Grange, J., Rinnert, H. e Dupont, G. (1981) "Structure of Amphotericin-B Aggregates as Revealed by Uv and Cd Spectroscopies". *Biopolymers*, 20 (8) 1575-1588.
- Feitosa, E. e Brown, W. (1997) "Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide". *Langmuir*, 13 (18) 4810-4816.
- Fernandez, R.M. e Lamy-Freund, M.T. (2000) "Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: a comparative study with sodium ions and cholesterol". *Biophys. Chem.*, 87 (2-3) 87-102.

- Filippin, F.B. e Souza, L.C. (2006) "Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B". *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 42 (2) 167-194.
- Fournier, I., Barwicz, J. e Tancrede, P. (1998) "The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study". *Biochim. Biophys. Acta*, 1373 (1) 76-86.
- Freed, J.H. (1976) "Theory of Slow Tumbling ESR Spectra for Nitroxides", em *Spin Labeling - Theory and Applications*, EE. Berliner, L. J., Academic Press, Inc., New York. 53-132.
- Gaboriau, F., Cheron, M., Leroy, L. e Bolard, J. (1997) "Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B". *Biophys. Chem.*, 66 (1) 1-12.
- Gabrielska, J., Gagos, M., Gubernator, J. e Gruszecki, W.I. (2006) "Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: A H-1 NMR study". *Febs Lett*, 580 (11) 2677-2685.
- Gagos, M., Koper, R. e Gruszecki, W.I. (2001) "Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B". *Biochim. Biophys. Acta*, 1511 (1) 90-98.
- Griffith, O.H., Dehling, P. e Van, S.P. (1974) "Shape of Hydrophobic Barrier of Phospholipid Bilayers (Evidence for Water Penetration in Biological-Membranes)". *J. Membrane Biol.*, 15 (2) 159-192.
- Grijalba, M.T., Cheron, M., Borowski, E., Bolard, J. e Schreier, S. (2006) "Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series". *Bba-Gen Subjects*, 1760 (6) 973-979.
- Guinier, A. e F. G. (1955) "Small-Angle Scattering of X-Rays", em EE. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Heimburg, T. (2000) "A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition". *Biophys. J.*, 78 (3) 1154-1165.
- Hemenger, R.P., Kaplan, T. e Gray, L.J. (1983) "Structure of Amphotericin-B Aggregates Based on Calculations of Optical-Spectra". *Biopolymers*, 22 (3) 911-918.
- Hiemenz, P.C. (1986) "Principles of Colloid and Surface Chemistry", em *Undergraduate Chemistry*, Vol.9, EE. Lagowski, J. J., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hubbell, W.L. e McConnell, H. (1971) "Molecular Motion in Spin-Labeled Phospholipids and Membranes". *J. Am. Chem. Soc.*, 93 (2) 314-326.
- Israelachvili, J. (1991) "Electrostatic forces between surfaces in liquids. in: *Intermolecular and Surface Forces*", . Academic Press, London.
- Jost, P., Libertin, L. J., Hebert, V.C. e Griffith, O.H. (1971) "Lipid Spin Labels in Lecithin Multilayers - Study of Motion Along Fatty Acid Chains". *J. Mol. Biol.*, 59 (1) 77-98.

- Kasai, Y., Matsumori, N., Umegawa, Y., Matsuoka, S., Ueno, H., Ikeuchi, H., Oishi, T. e Murata, M. (2008) "Self-assembled amphotericin B is probably surrounded by ergosterol: Bimolecular interactions as evidenced by solid-state NMR and CD spectra". *Chem. Eur. J.*, 14 (4) 1178-1185.
- Klessinger, M. e Michl, J. (1995) "Excited States and Photo-Chemistry of Organic Molecules", em EE. VHC Publisher Inc., New York.
- Kuhn, D.M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P.K. e Ghannoum, M.A. (2003) "Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism". *J. Clin. Microbiol.*, 41 (1) 506-508.
- Lamy-Freund, M.T. (1998) "Membranas lipídicas e suas interações com moléculas de interesse biológico", Tese de Livre-Docência - Instituto de Física -USP, São Paulo.
- Lamy-Freund, M.T., Ferreira, V.F.N. e Schreier, S. (1989) "Polydispersity of Aggregates Formed by the Polyene Antibiotic Amphotericin-B and Deoxycholate - a Spin Label Study". *Biochim. Biophys. Acta*, 981 (2) 207-212.
- Lasic, D.D. (1988) "The Mechanism of Vesicle Formation". *Biochem. J.*, 256 (1) 1-11.
- Lincopan, N., Mamizuka, E.M. e Carmona-Ribeiro, A.M. (2005) "Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments". *J. Antimicrob. Chemoth.*, 55 (5) 727-734.
- Machado, K.D. (2000) "Teoria do Eletromagnetismo", em Vol.I, Editora UEPG, Ponta Grossa.
- Marsh, D. (1981) em *Membrane Spectroscopy*, EE. Ernst, G., Springer Verlag, Berlin.
- Mazurski, J., Bolard, J. e Borowski, E. (1982) "Self-Association of Some Polyene Macrolide Antibiotics in Aqueous-Media". *Biochim. Biophys. Acta*, 719 (1) 11-17.
- Mazurski, J., Bolard, J. e Borowski, E. (1995) "Effect of the Modifications of Ionizable Groups of Amphotericin-B on Its Ability to Form Complexes with Sterols in Hydroalcoholic Media". *Biochim. Biophys. Acta*, 1236 (1) 170-176.
- Mazurski, J. e Borowski, E. (1996) "Molecular dynamics of amphotericin B .2. Dimer in water". *Biophys. Chem.*, 57 (2-3) 205-217.
- Mazurski, J., Grzybowska, J. e Borowski, E. (1990) "Influence of Net Charge on the Aggregation and Solubility Behavior of Amphotericin-B and Its Derivatives in Aqueous-Media". *Eur. Biophys. J.*, 18 (3) 159-164.
- Mcmullen, T.P.W., Lewis, R.N.A.H. e Mcelhaney, R.N. (1993) "Differential Scanning Calorimetric Study of the Effect of Cholesterol on the Thermotropic Phase-Behavior of a Homologous Series of Linear Saturated Phosphatidylcholines". *Biochemistry*, 32 (2) 516-522.
- Milhaud, J., Hartmann, M.A. e Bolard, J. (1989) "Interaction of the Polyene Antibiotic Amphotericin-B with Model Membranes - Differences between Small and Large Unilamellar Vesicles". *Biochimie*, 71 (1) 49-56.

- Milhaud, J., Ponsinet, V., Takashi, M. e Michels, B. (2002) "Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight, into them role of ergosterol". *Biochim. Biophys. Acta*, 1558 (2) 95-108.
- Millie, P., Langlet, J., Berges, J., Caillet, J. e Demaret, J.P. (1999) "Self-association of amphotericin B in water. Theoretical energy and spectroscopy studies". *J Phys Chem B*, 103 (49) 10883-10891.
- Nagle, J.F. (1980) "Theory of the Main Lipid Bilayer Phase-Transition". *Annu Rev Phys Chem*, 31 157-195.
- Oliveira, M.J. (2005) "Termodinâmica", em EE. Editora Livraria da Física, São Paulo.
- Pansu, R.B., Arrio, B., Roncin, J. e Faure, J. (1990) "Vesicles Versus Membrane-Fragments in Dodac Suspensions". *J. Phys. Chem.*, 94 (2) 796-801.
- Reichardt, C. (2003) "Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry", Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Rhodes, W. e Chase, M. (1967) "Generalized Susceptibility Theory .I. Theories of Hypochromism". *Rev Mod Phys*, 39 (2) 348-&.
- Rohatgi-Mukherjee, K.K. (1978) "Fundamentals of Photochemistry", EE. John Wiley & Sons Calcutta.
- Romanini, D., Avalor, G., Nerli, B. e Pico, G. (1999) "Thermodynamic and spectroscopic features of the behavior of amphotericin B in aqueous medium". *Biophys. Chem.*, 77 (1) 69-77.
- Saveyn, P., Cocquyt, E., Sinnaeve, D., Martins, J.C., Topgaard, D. e Van der Meeren, P. (2008) "NMR study of the sorption behavior of benzyl alcohol derivatives into sonicated and extruded dioctadecyldimethylammonium chloride (DODAC) dispersions: The relevance of membrane fluidity". *Langmuir*, 24 (7) 3082-3089.
- Seddon, J.M. e Cevc, G. (1993) "Lipid Polymorphism: Structure and Stability of Lyotropic Mesophases of Phospholipids", em *Phospholipids Handbook*, Vol.Part II, EE. Cevc, G., Marcel Dekker, Inc., New York. 403-453.
- Selitrennikoff, C.P. (2001) "Antifungal proteins". *Appl. Environ. Microb.*, 67 (7) 2883-2894.
- Sklar, L.A., Hudson, B.S., Petersen, M. e Diamond, J. (1977) "Conjugated Polyene Fatty-Acids on Fluorescent-Probes - Spectroscopic Characterization". *Biochemistry*, 16 (5) 813-819.
- Smith, I.C.P. (1972) em *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, EE. Swartz, H. M., Bolton, J. R. e Borg, D. C., John Wiley & Sons, Inc., Wiley-Interscience.
- Strauss, G. (1981) "The Interaction of Amphotericin-B with Lipid Bilayer Vesicles - Determination of Binding Constants by Absorption and Fluorescence Spectroscopy". *Can. J. Spectrosc.*, 26 (3) 95-102.
- Subczynski, W.K. e Kusumi, A. (1986) "Effects of Very Small Amounts of Cholesterol on Gel-Phase Phosphatidylcholine Membranes". *Biochim. Biophys. Acta*, 854 (2) 318-320.
- Tinoco, I. (1960) "Hypochromism in Polynucleotides". *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (18) 4785-4790.

- Vieira, D.B. e Carmona-Ribeiro, A.M. (2001) "Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B". *J. Colloid. Interf. Sci.*, 244 (2) 427-431.
- Witzke, N.M. e Bittman, R. (1984) "Dissociation Kinetics and Equilibrium Binding-Properties of Polyene Antibiotic Complexes with Phosphatidylcholine Sterol Vesicles". *Biochemistry*, 23 (8) 1668-1674.
- Wojtowicz, K., Gruszecki, W.I., Walicka, M. e Barwicz, J. (1998) "Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membranes: calorimetry, ultrasound absorption and monolayer technique studies". *Biochim. Biophys. Acta*, 1373 (1) 220-226.