Universidade de São Paulo Instituto de Física

Estudo de interações entre membranas lipídicas por experimentos de SAXS: o efeito da composição

Rafael Leite Rubim

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira (IF/USP)

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito (FFCLRP/USP)

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa (IF/USP)

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

Rubim, Rafael Leite

Estudo de interações entre bicamadas lipídicas por experimentos de SAXS: o efeito da composição. São Paulo, 2014.

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

Orientador: Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira

Área de Concentração: Biofísica

Unitermos: 1. Biofísica; 2. Membrana lipídica; 3. Interação membranar; 4. Espalhamento de raios X a baixos ângulos; 5. Composição química.

USP/IF/SBI-063/2014

A persistência é o menor caminho do êxito. (Charles Chaplin)

Okê Arô...

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que olham constantemente por mim, guiando meus passos;

Agradeço à minha mãe, por ter proporcionado tudo o que foi necessário para chegar onde estou;

Agradeço à minha mulher pelo carinho e pelo auxílio, tornando possível a conclusão deste trabalho;

Agradeço à Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira pela oportunidade e por todos os ensinamentos durante os anos de trabalho;

Agradeço ao Prof. Dr. Frédéric Nallet pelas discussões que resultaram neste trabalho;

Agradeço à Dra. Laurence Navailles pela atenção e apoio;

Agradeço ao Prof. Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira pelo auxílio e pelas orientações durante o desenvolvimento do trabalho;

Agradeço à Barbara Bianca Gerbelli e ao Kévin Bougis pelas discussões e pelo trabalho conjunto que foi desenvolvido;

Agradeço à Renata Naporano Bicev pela atenção e auxílio durante essa jornada;

Agradeço à Vivian Vieira pelas conversas e ajuda durante esse tempo;

Agradeço ao Emerson Rodrigo da Silva por todos os momentos memoráveis;

Agradeço ao Eraldo de Sales e ao Pedro Leonidas Filho pela companhia;

Agradeço a todos os colegas do Grupo de Fluidos Complexos do IFUSP;

Agradeço à minha família, tanto de sangue quanto de coração e de fé, e aos meus amigos que sempre acreditaram em mim e me apoiaram durante essa fase;

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro deste trabalho através do processo de número 2011/16149-8.

RESUMO

Neste trabalho, realizamos um estudo das propriedades estruturais e elásticas da fase lamelar e também das interações relevantes que levam à estabilização dessa estrutura periódica. A composição da membrana, assim como sua hidratação, foi variada de maneira sistemática com o objetivo de introduzir alterações na flexibilidade da bicamada e no regime de confinamento. A fase lamelar é constituída de lecitina à qual é incorporado, em diferentes proporções, um co-surfactante comercial, formado por uma mistura de ácidos graxos etoxilados,

Para o estudo das interações entre as bicamadas a fase lamelar foi submetida a uma pressão osmótica conhecida. Por meio de experimentos de SAXS, foram determinados os parâmetros estruturais que caracterizam a fase lamelar, para um dado valor de pressão. Os resultados experimentais obtidos são ajustados considerando-se um potencial efetivo de interação entre as bicamadas, permitindo a determinação de parâmetros quantitativos, caracterizando as diferentes contribuições atrativa e repulsivas.

Em um segundo momento, foi realizado um estudo para caracterização da fase lamelar, desta vez, introduzindo um co-surfactante não comercial com o objetivo de investigar as alterações que ocorrem na interface devido à presença dos grupos etoxilados. Observa-se que a incorporação do co-surfactante amplia o domínio de diluição da fase lamelar atingindo período em torno de 200 Å, sem domínios de coexistência de duas fases lamelares, como se observa com o co-surfactante comercial polidisperso. O uso de um produto mais bem caracterizado, permite observações mais claras sobre mudanças no comportamento do parâmetro de Caillé, que caracteriza a flexibilidade da membrana, assim como alterações que ocorrem na interface, seja por efeito de confinamento ou por efeito de temperatura.

ABSTRACT

In this work, we carried out a study of structural and elastic properties of the lamellar phase and the relevant interactions that lead to stabilization of this periodic structure. The composition of the membrane, as well as hydration, was varied systematically in order to introduce changes in the flexibility of the bilayer and confinement regime. The lamellar phase is composed by lecithin, in which is incorporated in different proportions a commercial co-surfactant consisting of a mixture of ethoxylated fatty acids,

To study the interactions between the bilayers the lamellar phase was placed under a known osmotic pressure. Structural parameters characterizing the lamellar phase were determined by SAXS experiments, for a given value of pressure. The experimental results are fitted considering an effective potential of interaction between the bilayers, allowing the determination of quantitative parameters characterizing the different attractive and repulsive contributions.

In a second step, studies for characterization of the lamellar phase were carried out, but at this time, introducing a non-commercial co-surfactant with the aim of investigating the changes that occur at the interface due to the presence of ethoxylated groups. It is observed that the incorporation of co-surfactant extends the dilution limit of the lamellar phase, reaching lamellar periodicities around 200 Å, without coexistence of two lamellar phases, as observed with the commercial polydisperse co-surfactant. Using a more well characterized product, it is clearer the changes on the behavior of Caillé parameter, which characterizes the flexibility of the membrane, as well as changes occurring at the interface, either by confinement or temperature effects.

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Motivação	13
1.2. Objetivos	15
1.3. Apresentação	16
2. Fundamentação teórica	19
2.1. Moléculas Anfifílicas e auto-organização	19
2.2. Parâmetros estruturais e elásticos das bicamadas	21
2.3. Interações entre bicamadas	24
2.4. Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos	26
2.4.1. Princípios básicos	26
2.4.2. Fator de forma de bicamadas	27
2.4.3. Fator de estrutura de fases lamelares	30
2.5. Espalhamento dinâmico de luz	32
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Sistema lamelar	35
3.1. Sistema lamelar	

3.2.2. Calibração do osmômetro	44
3.2.3. Pressão exercida pelos polímeros	45
3.3. Membranas sob pressão osmótica	51
3.3.1. Preparação das bicamadas	51
3.3.2. Correção na pressão efetiva	52
3.4. Experimentos de SAXS	55
3.4.1. Arranjo experimental	55
3.4.2. Redução dos dados	56
3.4.3. Ajustes	57
4. Resultados Experimentais e Discussões	63
4.1. Estudo das Interações entre membranas	63
4.2. Caracterização da fase lamelar com co-surfactante monodisperso	77
4.2.1. Estudo estrutural	77
4.2.2. Efeitos de temperatura	82
5. Conclusões	85
Referências Biblioaráficas	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

Células são compostas por várias unidades, conhecidas como organelas, e estas são quase que em sua totalidade formadas por, além de outras estruturas, bicamadas fosfolipídicas, como representado na Figura 1.1. O papel que cada uma dessas unidades exerce na célula está diretamente relacionado às propriedades estruturais e elásticas da membrana que as compõem como, por exemplo, a flexibilidade. As deformações na membrana, como invaginações e protrusões, assim como poros e outras estruturas complexas, são controladas por forças elásticas e transições de fase. (Anderson, 1998; Hull; Sauer; Hovis, 2004; Malcharek et al, 2005; Pan; Tristam-Nagle; Nagle, 2009; Siddhanta; Shields, 1998)

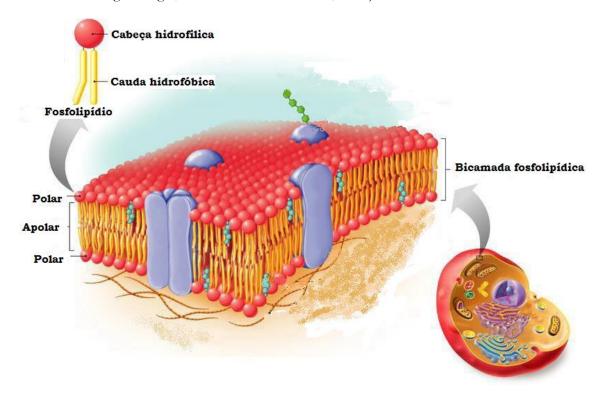


Figura 1.1. Representação esquemática de uma bicamada fosfolipídica. MacGraw-Hill Companies

Sistemas lamelares e vesículas formados por lipídios são amplamente utilizados como sistemas modelo para investigações de processos biológicos, pesquisa fundamental de interações entre membranas e membranas ou biomoléculas e aplicações em biotecnologia (Pabst, 2006; Klajnert et al, 2006). A fase lamelar é caracterizada pelo arranjo periódico de bicamadas de lipídios separadas por uma camada aquosa e existem vários trabalhos na

literatura, com uma grande variedade de lipídios (Sackmann, 2006; Takahashi; Sinoda; Hatta, 1996; Wang; Yang; Huang, 2007; Wurger, 2000) e técnicas para estudos estruturais, termodinâmicos e propriedades elásticas (Korlach et al, 1999; Strancar; Sentjure; Schara, 2000; McIntosh; Magid; Simon, 1989a).

A estabilidade da fase lamelar é governada pelo balanço entre as interações repulsivas, que podem ser de natureza eletrostática, e atrativa de van der Waals. As flutuações térmicas que ocorrem na membrana dão origem á interações repulsivas, de natureza entrópica, resultantes do impedimento estérico mútuo quando as membranas estão próximas. Essa interação desempenha um papel fundamental na estabilização da fase lamelar, uma vez que seu alcance e intensidade são comparáveis à interação de van der Waals (Helfrich, 1978; Israelachvili; Wennestrom, 1996).

A flexibilidade da membrana de lipídios está relacionada à desordem orientacional e posicional das moléculas de surfactantes, e depende da dimensão da cadeia carbônica e da parte polar das moléculas. Os parâmetros que caracterizam a estrutura lamelar podem ser obtidos por meio da técnica de espalhamento de raios-x a baixos ângulos (SAXS) e a análise do espalhamento difuso, que fornece informações sobre as flutuações térmicas (Nallet; Laversanne; Roux, 1992; Oliveira et al, 2012; Gerbelli et al, 2013).

Recentemente, no Grupo de Fluidos Complexos, foi realizado um estudo sistemático de uma fase lamelar composta de lecitina, à qual é incorporado um co-surfactante de uso comercial conhecido como Simulsol, que consiste de uma mistura de ácidos graxos etoxilados (Gerbelli et al, 2013). A incorporação dos ácidos graxos confere à membrana maior flexibilidade, e a quantidade desse composto constitui um parâmetro que permite alterar de maneira sistemática as propriedades elásticas da membrana. A parte hidrofóbica das moléculas do co-surfacante é ligada a uma cadeia hidrofílica de polímero PEG (polietilenoglicol), com número de monômeros variável entre 6 e 20, mas com média de 10. As moléculas, de lipídios tem caráter zwiteriônico e as do co-surfactante possuem caráter não iônico, de maneira que a carga superficial líquida da membrana permanece neutra.

Foi realizado um estudo estrutural, utilizando a técnica de SAXS, variando a composição da membrana desde 100% de lecitina até 100% de Simulsol, ao longo da linha de diluição, para cada composição. Esse estudo revelou uma região de coexistência de fases lamelares para algumas composições e domínios de hidratação e uma ampliação do domínio de diluição, com

períodos lamelares de até 100 Å. Observou-se também que o parâmetro de Caillé apresenta dois comportamentos distintos, e que o segundo regime é caracterizado por um aumento das interações de caráter entrópico.

A presença das moléculas de co-surfactante na bicamada contribui para o aumento da flexibilidade, mas há ainda um segundo efeito associado a mudanças que ocorrem na interface. Para baixas concentrações do co-surfactante as cadeias poliméricas da parte hidrofílica encontram-se enoveladas. No entanto, a partir de uma determinada concentração, as cadeias assumem a conformação estendida, resultando no aumento da espessura efetiva da bicamada. Essa mudança resulta em uma interface com "pelos", como um tapete, e eventualmente com "pelos" de bicamadas vizinhas se superpondo, o que globalmente reduz a flexibilidade da membrana.

1.2. Objetivos

Este trabalho pode ser dividido em duas partes. Inicialmente foi realizado um estudo das interações entre as membranas. Experimentalmente, esse estudo é realizado preparando-se a fase lamelar em uma solução de polímeros. Essa solução exerce uma pressão osmótica na fase lamelar, cuja intensidade é controlada pela quantidade de polímeros na solução A amostra final apresenta duas fases coexistindo à mesma pressão osmótica; uma rica em polímero, e outra em lipídios.

Os experimentos de SAXS na fase lamelar levam a determinação do período lamelar para uma dada pressão osmótica (P), que é dada por $P=-\partial V/\partial \delta_a$, onde V é o potencial de interação entre as membranas e δ_a é distância de separação entre as bicamadas. Existem na literatura modelos teóricos que consideram um potencial efetivo, para o qual existe uma expressão analítica, que pode ser utilizada para ajustar os dados experimentais obtidos. É possível obter informações quantitativas sobre a contribuição de cada uma das interações (Petrache et al, 2006).

Assim, a variação sistemática da composição e da hidratação da membrana constituem dois parâmetros experimentais que permitem a investigação das interações que governam a estabilidade da fase lamelar. A incorporação do co-surfactante altera a flexibilidade da bicamada, enquanto a variação da hidratação permite a investigação das interações em diferentes regimes de confinamento, desde um regime onde as bicamadas estão muito

próximas e as flutuações são inibidas, passando ao regime diluído, onde interações de curto alcance não são relevantes, e a contribuição da interação estérica torna-se predominante.

Em um segundo momento foi realizado um estudo das propriedades estruturais e elásticas da fase lamelar introduzindo um co-surfactante especialmente preparado para esse estudo, com um número conhecido de monômeros na cadeia hidrofílica, igual a 15, e monodisperso. Assim, é possível avaliar com mais clareza o papel desempenhado pelas alterações que ocorrem na interface da membrana e o efeito dessa mudança nas interações entre as mesmas.

A abordagem experimental consiste em variar sistematicamente a composição da membrana e determinar parâmetros estruturais tais como; o período lamelar, a espessura da bicamada e o parâmetro de Caillé, que relaciona duas constantes que caracterizam as propriedades elásticas da membrana, a partir de experimentos de SAXS (Caillé, 1972; Roux; Safinya; Nallet, 1994).

A solubilidade do PEG depende também da temperatura (Wisniewska et al, 2013), e para investigar esse efeito foram realizados experimentos de SAXS variando a temperatura da fase lamelar, para algumas composições de membrana.

1.3. Apresentação

O texto foi divido em 5 capítulos, sendo que no primeiro deles foi apresentada a motivação e os objetivos do estudo. Foi feita uma contextualização do trabalho, assim como levantadas as relações com estudos já realizados e em andamento em diversos grupos de pesquisa.

O Capítulo 2 apresenta um levantamento de aspectos teóricos relacionados às interações relevantes para estabilização da fase lamelar com uma revisão de resultados existentes na literatura. Também são apresentados os princípios físicos envolvidos nas técnicas experimentais utilizadas neste trabalho; espalhamento de raios-X e espalhamento dinâmico de luz.

No **Capítulo 3** são descritos os materiais e procedimentos utilizados para a preparação das fases lamelares. Os instrumentos utilizados e métodos de tratamento e análise dos dados experimentais também são discutidos.

Os resultados do estudo são apresentados no **Capítulo 4**, dividido em duas partes. A primeira delas consiste em estudos de interações entre membranas. Nesse estudo, foi utilizado o co-surfactante comercial, e a fase lamelar é submetida a pressão osmótica controlada.

A segunda parte descreve os estudos referentes à caracterização de parâmetros estruturais e elásticos da fase lamelar utilizando o co-surfactante monodispersos, assim como o efeito de variação de temperatura, que introduz alterações na interface da membrana.

Por fim, o **Capítulo 5** destaca as principais contribuições obtidas com este estudo, e as perspectivas que se abrem para futuras investigações.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Moléculas Anfifílicas e auto-organização

Conforme descrito anteriormente, o sistema de estudo utilizado neste trabalho é formado por bicamadas fosfolipídicas, com o intuito de mimetizar membranas biológicas. Como o próprio nome já sugere, esses sistemas são formados por camadas duplas de lipídios, que são moléculas anfifilicas.

As moléculas anfifilicas possuem a peculiaridade de apresentar uma região miscível em certo solvente e outra imiscível neste mesmo solvente. Dessa forma, a mesma molécula apresenta duas regiões que interagem de maneiras diferentes com dado solvente.

Uma das regiões é conhecida como hidrofílica que, por ser polar, possui afinidade com solventes também polares, como a água. A outra região, por ser apolar, possui afinidade com solventes não polares, e é chamada de região hidrofóbica. Uma molécula deste tipo está representada na Figura 2.1.



Figura 2.1. Representação esquemática de uma molécula anfifílica

Podemos classificar as moléculas anfifilicas em quatro tipos, dependendo da estrutura de sua parte hidrofílica, que também é conhecida como cabeça polar.

Se a cabeça for carregada, a molécula é chamada de iônica, podendo ser classificada como uma molécula aniônica, se o sinal de carga for negativo, ou catiônica, se o sinal de carga for positivo.

Outro agrupamento é de moléculas não iônicas, onde a parte hidrofílica é neutra, porém, apresenta uma distribuição não uniforme de cargas, ou seja, é uma região polarizada. E o quarto tipo de moléculas é conhecido como anfotéricas ou "zwitteriônicas", onde a cabeça

polar possui tanto uma carga positiva quanto uma negativa, fazendo com que sua carga global também seja nula (Myers, 1999).

Quando essas moléculas são adicionadas a um solvente como a água, por exemplo, devido às diferentes maneiras de interagir com o meio e, a partir de certa concentração de moléculas, essas podem se agregar. Esse processo de agregação acontece na grande maioria das vezes de forma natural, formando diferentes tipos de estruturas, minimizando a área de contato das caudas hidrofóbicas com a água, expondo a região polar ao solvente. Esse fenômeno é conhecido como efeito hidrofóbico (Israelachivilli, 2011).

Os parâmetros que regem essa estruturação são a concentração relativa de lipídio na solução e a geometria da molécula, que podem favorecer ou não a curvatura da estrutura formada (Jones, 2002). Sendo assim, algumas das estruturas mais comuns que encontramos para esse tipo de molécula e a relação com sua geometria estão representadas na Figura 2.2.

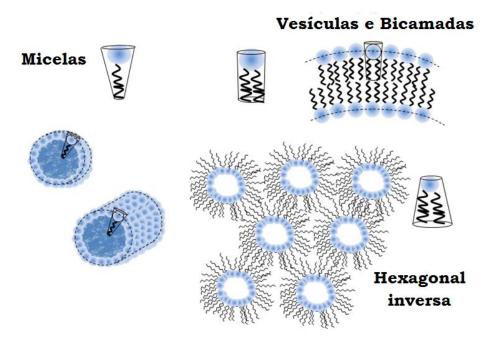


Figura 2.2. Representação de estruturas formadas por moléculas anfifílicas em solução aquosa.

Podemos observar que uma molécula que possui a cabeça polar com uma seção transversal de área maior que a da região apolar, também conhecida como cauda apolar, favorece a formação de micelas tanto cilíndricas quanto esféricas. Ou seja, a região interna das mesmas é preenchida somente com as caudas.

Uma molécula que possui formato semelhante a um cilindro, onde as seções transversais da cabeça e da cauda possuem áreas comparáveis, tendem a formar bicamadas ou vesículas.

Por fim, moléculas que apresentam área da seção transversal da cabeça menor que a da seção transversal das caudas, possui uma tendência a formar uma fase hexagonal inversa, na qual o solvente fica encapsulado nas estruturas esféricas, como a parte interna das vesículas.

2.2. Parâmetros estruturais e elásticos das bicamadas

Como o sistema de interesse para este estudo é o de bicamadas, é preciso utilizar moléculas que possuem formato similar a de um cilindro, como é o caso dos fosfolipídios. Ao serem inseridas em água, as moléculas de lipídio formarão as bicamadas, sendo que essas, por sua vez, irão se organizar de maneira que fiquem empilhadas, como representado na Figura 2.3. Esse é o modelo mais simples que podemos construir para tal sistema, formando uma estrutura lamelar conhecida como mesofase esmética A (Roux; Safinya; Nallet, 1994).

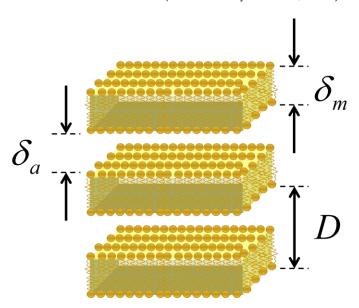


Figura 2.3. Representação de mesofase esmética A, formada pela auto-organização dos lipídios.

Com base neste modelo é possível definir uma grandeza que consiste na distância de repetição da estrutura das lamelas, ou seja, a periodicidade lamelar (D). Conforme descrito na Equação 2.1, essa grandeza é igual à soma da espessura da bicamada de lipídio (δ_m) e da espessura da camada de água (δ_a) , que também pode ser entendida como a distância de separação entre as membranas.

$$D = \delta_m + \delta_a \tag{2.1}$$

Obtêm-se, também, uma equação que relaciona a periodicidade lamelar e a espessura da bicamada com a fração volumétrica de lipídio (φ_{i}). Sabe-se que a fração volumétrica de lipídio é dada pela razão entre o volume de lipídio e o volume total a fase lamelar, então, a partir das propriedades geométricas da célula unitária é possível obter essa relação, que é expressa pela Equação 2.2.

$$D = \frac{\delta_m}{\varphi_l} \tag{2.2}$$

Portanto, se é conhecida a periodicidade lamelar, que pode ser obtida através de experimentos de SAXS, e a fração volumétrica de lipídio, que é um valor obtido ao se preparar a amostra, se pode utilizar a Equação 2.2 para obter a espessura geométrica da membrana. Com essas informações é possível empregar a Equação 2.1 para obter a distância de separação entre as membranas.

No entanto, resultados experimentais mostram que o comportamento dos dados experimentais não pode ser descrito por esse modelo, exceto em um pequeno intervalo onde as membranas estão confinadas e de baixa hidratação (Gerbelli et al, 2013).

Com base nas observações do comportamento de D em função de $1/\varphi_l$, é possível propor uma expressão empírica para parametrizar as curvas, que é dada pela Equação 2.3. Esta expressão não parte de um modelo para o sistema, mas sim uma possível equação para descrever os dados experimentais, onde D_{∞} é o valor do período lamelar no limite de diluição, extrapolado para $1/\varphi_l \to \infty$.

$$D = D_{\infty} \tanh \left(\frac{\delta_m}{\varphi_l D_{\infty}} \right) \tag{2.3}$$

Os estudos pioneiros sobre morfologia de fases lamelares lipídicas foram realizados por Husson, Mustacchi e Luzzati (1960), onde era possível observar três tipos de arranjos. Apesar desse sistema ser classificado como um cristal líquido liotrópico, onde as transições de fase ocorrem devido a variações de concentração, podem ocorrer mudanças, também, devido a variações de temperatura.

A fase que ocorre a temperaturas mais elevadas e/ou alta hidratação é conhecida como fase fluida (L_a), onde as cadeias carbônicas dos lipídios não possuem nenhum tipo de orientação preferencial e apresentam uma ordem líquida. Quando a temperatura e/ou a hidratação são diminuídas, pode ocorrer uma transição de fase, onde as cadeias carbônicas se tornam rígidas e se orientam, conferindo maior rigidez às membranas, sendo essa conhecida como fase gel (L_β). É possível a existência de uma fase intermediária, conhecida como fase enrugada (P_β), na qual as cadeias carbônicas continuam apresentando certo grau de ordenamento, porém, há flutuações na superfície das bicamadas (Roux; Safinya; Nallet, 1994).

O modelo de membranas rígidas mostra-se adequado para descrever a organização das bicamadas, mas não é tão eficiente para a obtenção de parâmetros estruturais, pois é sabido que as membranas não são estáticas e rígidas como propõe o mesmo.

Dessa forma, é necessário adicionar flutuações ao modelo, que são provenientes de efeitos térmicos, torções e mudanças na curvatura das membranas. Como mostra a Figura 2.4, essas flutuações podem ser descritas pela variação na distância de separação e ondulações das bicamadas (Israelachvilli; Wennerstroem, 1992).

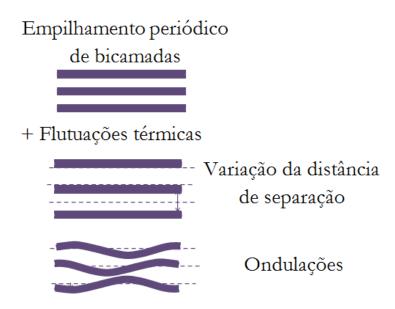


Figura 2.4. Representação das flutuações da membrana.

As flutuações na distância de separação entre as membranas são caracterizadas pelo módulo de compressibilidade (B) da fase lamelar. Esses movimentos ocorrem na direção perpendicular ao plano das membranas e este parâmetro está relacionado à dificuldade em aproximar as

membranas. Quanto maior o valor dessa grandeza, maior deve ser a força, que é proporcional à pressão (P), exercida para que as membranas se desloquem, como mostra a Equação 2.4.

$$B = -D\frac{\partial P}{\partial D} \tag{2.4}$$

O outro parâmetro que descreve as flutuações térmicas é o módulo de curvatura (K) da membrana. Esta grandeza está relacionada às movimentações no plano da bicamada, que causam ondulações e/ou torções, assim como movimentos peristálticos, fazendo com que a espessura possa variar ao longo de seu plano.

A Equação 2.5 relaciona tal grandeza à constante de rigidez (κ) da membrana, sendo que esta será mais rígida quanto maiores forem os valores destes parâmetros.

$$K = \frac{\kappa}{D} \tag{2.5}$$

Sendo assim, os módulos de compressibilidade e rigidez da membrana fornecem uma ideia da elasticidade desta, ou seja, se a mesma é mais rígida ou flexível. Essas mudanças na elasticidade da membrana estão, normalmente, relacionadas à sua composição e às variações de temperatura.

2.3. Interações entre bicamadas

O balanço das interações membranares governa a estabilidade da estrutura lamelar e, variando a distância de separação entre as bicamadas, espera-se modificar o regime de interações, uma vez que elas não tem o mesmo alcance. Um modelo proposto na literatura (Helfrich, 1978; Israelachvili; Wennestrom, 1996; Petrache et al, 2006; Petrache; Tristam-Nagle; Nagle, 1998) considera o potencial de interação entre as membranas como aditivo. Esse modelo é descrito pela Equação 2.6, onde a interação eletrostática foi desprezada por se tratar de lipídios não carregados.

$$P(\delta_a) = -\frac{H}{6\pi} \left(\frac{1}{\delta_a^3} - \frac{2}{(\delta_a + \delta_m)^3} + \frac{1}{(\delta_a + 2\delta_m)^3} \right) + P_h e^{-\frac{\delta_a}{\lambda}} + \frac{\mu (k_B T)^2}{\kappa \delta_a^3}$$
(2.6)

A Equação 2.6 descreve a força por unidade de área para as membranas em função da distância de separação entre elas. O primeiro termo está relacionado à força de van der Waals, onde H é conhecida como constante de Hamaker, um parâmetro que depende da composição da membrana. De acordo com esse modelo, quando as membranas estão afastadas, esse termo

é o componente dominante na força resultante, que possui um caráter atrativo. Esse tipo de interação é causada pelas interações entre os dipolos elétricos das cabeças dos lipídios.

Com a diminuição da distância de separação entre as membranas há uma predominância das forças de hidratação e das forças estéricas que possuem um caráter repulsivo e são descritas pelos segundo e terceiro termos da Equação 2.6, respectivamente, onde λ é o alcance das forças de hidratação, P_b sua amplitude, κ a constante de rigidez da membrana e μ uma constante cujo valor é igual a $3\pi^2/128$ (Helfrich, 1978).

As forças estéricas estão relacionadas aos movimentos no plano da membrana, que são as ondulações, e às movimentações perpendiculares à mesma, que são as flutuações. A força de hidratação é uma componente determinada experimentalmente, porém, sua natureza ainda não é completamente compreendida na literatura (McIntosh; Simon, 1986; Rand et al, 1988).

Para a lecitina, valores típicos de H estão entre (2,3-3,8)x 10^{-21} J (Harbich; Helfrich, 1984), $\kappa \approx 20 \text{ k}_B\text{T}$, $\lambda \approx 2-5$ Å (McIntosh; Magid; Simon, 1989b) e $P_h \approx 10^6$ Pa (Petrache et al, 1998).

De acordo com essa abordagem teórica, o potencial que descreve as interações na fase lamelar apresenta um único mínimo, e descreve um sistema ligado, isto é, que as bicamadas interagem. No entanto, existem na literatura outras abordagens com previsões de que o potencial não deve ser aditivo, e que o sistema lamelar pode passar de um sistema ligado a um sistema não ligado, com as membranas não interagentes, por meio de uma transição de segunda ordem (Lipowsky; Leibler, 1986; Milner; Roux, 1992; Podgork; Parsegian, 1992).

Modelos desenvolvidos por Podgornik e Parsegian, (1992) descrevem esse comportamento esperado para as interações entre membranas, variando o balanço entre as diferentes interações. Na Figura 2.5 é apresentado o comportamento para a pressão em função da distância de separação entre as membranas, quando o parâmetro χ_A , que é proporcional à razão P_hK/λ , varia, mantendo-se constante a razão entre o potencial atrativo e repulsivo estérico (χ_HH/P_h =constante).

É possível observar na Figura 2.5 que para alguns valores de χ_A , quando $P \rightarrow 0$, a distância de separação entre as membranas tende a um valor limite, que corresponde ao limite de diluição, para o qual o aumento de hidratação leva a coexistência da fase lamelar com excesso de água. Diminuindo-se o valor de χ_A além de certo valor, observa-se que as bicamadas podem se separar indefinidamente, como é o caso de χ_A = 30 na Figura 2.5. O aumento de χ_A pode

estar associado à diminuição do módulo de curvatura (K), ou seja, da flexibilidade da membrana, enquanto a intensidade e alcance da força de hidratação permanecem constantes.

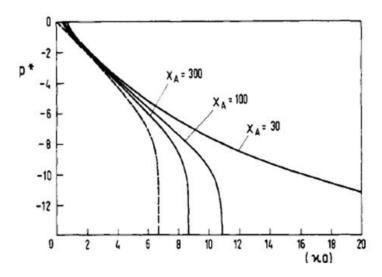


Figura 2.5. Comportamento esperado para as interações entre membranas. (Podgornik; Parsegian, 1992)

Esse modelo descreve um estado ligado, com um mínimo de potencial que corresponde à periodicidade limite, ou seja, o limite de hidratação, sendo possível uma transição contínua desse estado ligado para um estado não ligado, quando o balanço entre as diferentes interações presentes é alterado.

2.4. Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos

2.4.1. Princípios básicos

Um experimeto de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS) consiste basicamente em uma fonte de raios-X que produz um feixe monocromático e colimado que incide na amostra. Os fótons, após interagirem com a mesma, poderão ser desviados atingindo o detector, conforme representado na Figura 2.6.

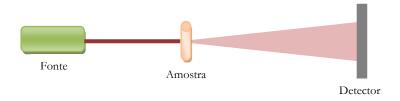


Figura 2.6. Representação esquemática de um experimento de SAXS

Nesta configuração, os fótons espalhados que são capturados pelo detector formam uma "imagem", conhecida como difratograma. Esse difratograma é então integrado para que se possa obter a intesidade de radiação espalhada, ou seja, o número de fótons que atinge o detecor, em função de uma grandeza conhecida como vetor de espalhamento (\vec{q}) , sendo que este é dado pela diferença entre o vetor de onda do fóton incidente (\vec{k}_t) e do fóton espalhado (\vec{k}_e) , conforme representado na Figura 2.7 (Lindner, 2002).

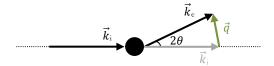


Figura 2.7. Representação do espalhamento de uma partícula.

Com base na representação da Figura 2.7, podemos observar que o ângulo de espalhamento é definido como 2θ . Sabendo que o espalhamento de SAXS é um espalhamento elástico, ou seja, que os módulos de $\overrightarrow{k_l}$ e $\overrightarrow{k_e}$ são iguais e proporcionais ao inverso do comprimento de onda da radiação (λ), obtemos que o módulo de \overrightarrow{q} é dado pela Equação 2.7.

$$q = \frac{4\pi \operatorname{sen}\theta}{\lambda} \tag{2.7}$$

Como as bicamadas formam um sistema lamelar, devemos analisar o espalhamento para estruturas deste tipo. Neste caso, a intensidade de radiação espalhada em função do módulo de vetor de espalhamento [I(q)] é dada pela convolução do fator de forma [F(q)] e do fator de estrutura [S(q)] do sistema em estudo, e a relação entre eles é descrita pela Equação 2.8 (Glatter; Kratky, 1982).

$$I(q) = \frac{S(q)|P(q)|^2}{q^2}$$
 (2.8)

O fator de forma descreve cada subunidade e o fator de estrutura está relacionado à organização das mesmas no sistema.

2.4.2. Fator de forma de bicamadas

O fator de forma é uma função que descreve as subunidades espalhadoras, que no escopo deste estudo são as bicamadas. Essa função é obtida através da transformada de Fourier do contraste de densidade eletrônica ao longo de uma bicamada. Como a densidade eletrônica é

constante ao longo dos planos da membrana, haverá um contraste eletrônico apenas ao longo da direção perpendicular à mesma (Feigin; Svergun, 1987).

Estando as membranas adjacentes separadas por camadas aquosas e usando como referência a densidade eletrônica dessas moléculas, haverá um contraste de densidade eletrônica positivo para a região polar das moléculas anfifilicas e negativo para a região das cadeias carbônicas. A partir dessas considerações é possível construir um perfil de contraste de densidade eletrônica e então, através da transformada de Fourier, obter a expressão que descreva o fator de forma das bicamadas.

Um perfil de contraste de densidade eletrônico para bicamadas proposto por Nallet, Laversanne e Roux (1992) considera variações abruptas na densidade eletrônica ao longo da bicamada, gerando um perfil com degraus, como ilustra a Figura 2.8. A partir deste perfil de contraste de densidade eletrônica é possível obter a Equação 2.9 que descreve o fator de forma das bicamadas, onde $\Delta \rho_T$ e $\Delta \rho_H$ representam o contraste de densidade eletrônica das regiões apolar e polar, respectivamente, em relação à água e δ_T e δ_H os comprimentos das regiões apolar e polar, respectivamente.

$$P(q) = \frac{4\Delta\rho_H^2}{q^2} \left\{ sen[q(\delta_H + \delta_T)] - sen(q\delta_T) + \frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H} sen(q\delta_T) \right\}^2$$
(2.9)

O modelo descrito pela Equação 2.9, apesar de não descrever pequenas variações nas densidades, descreve bem os dados experimentais, fornecendo informações importantes para a caracterização das bicamadas, como sua espessura e a razão entre os contrastes de densidade eletrônica das partes interna e externa.

Um modelo um pouco mais elaborado é proposto por Oliveira et al (2012), onde o perfil de contraste de densidade eletrônica é formado por somas de gaussianas, como ilustra a Figura 2.9. Neste caso, foram utilizadas gaussianas para descrever as variações do contraste de densidade eletrônica ao longo da membrana. Com este modelo é possível descrever com suavidade as variações no contraste eletrônico das regiões polar e apolar, e assim, fornecer uma visão mais realista da forma das membranas. A partir deste perfil de contraste de densidade eletrônica, que é construído pela soma de quatro funções gaussianas, é possível obter o conjunto de Equações de 2.10 a 2.13 que descrevem o fator de forma das bicamadas, onde a_n e a_n representam a amplitude e a posição do centro da gaussiana de ordem a_n , respectivamente, a_n o desvio padrão da última gaussiana e a_n a posição em que a última gaussiana tende a zero.

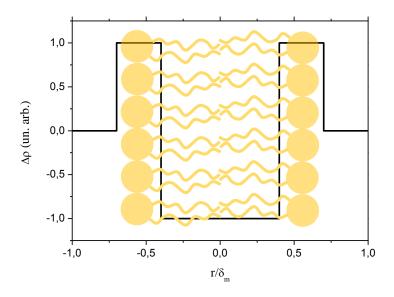


Figura 2.8. Perfil de contraste de densidade eletrônica para uma membrana usando um modelo do tipo degrau.

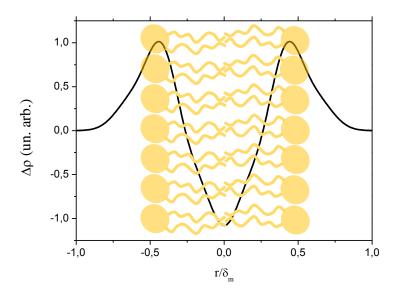


Figura 2.9. Perfil de contraste de densidade eletrônica para uma membrana usando um modelo com gaussianas.

$$P(q) = |\sum_{n=1}^{4} a_n P(q, n)|^2$$
(2.10)

$$P(q,n) = \sqrt{2\pi}\sigma e^{-\frac{\sigma^2 q^2}{2}} cos(qz_n)$$
 (2.11)

$$\sigma = \frac{Z}{2n_{max}\sqrt{2ln2}}\tag{2.12}$$

$$z_n = (n-1)2\sigma \tag{2.13}$$

O modelo descrito pelo conjunto de Equações de 2.10 a 2.13 descreve com maior precisão as bicamadas, levando em conta variações mais sutis no contraste de densidade eletrônica. Como essa adequação do modelo fornece uma descrição mais realista das membranas, o ajuste de curvas experimentais de SAXS utilizando o mesmo tende a ser melhor.

Sendo assim, o modelo formado pela soma das quatro gaussianas nos fornece uma descrição mais detalhada das mesmas, gerando um ajuste melhor para as curvas de SAXS. No entanto, por ser um modelo mais simplificado, o perfil formado por degraus possui uma quantidade menor de parâmetros a serem ajustados e menor tempo de processamento, o que pode representar uma vantagem na decisão do modelo a ser utilizado, já que o ajuste utilizando este modelo também não se mostra ruim. Em suma, ambos os modelos descrevem satisfatoriamente o espalhamento gerado pelas bicamadas, e a escolha do mesmo dependo dos objetivos do estudo.

2.4.3. Fator de estrutura de fases lamelares

Como as bicamadas são sistemas lamelares, devemos analisar fatores de estrutura para este tipo de sistema. Quando os fótons atingem uma estrutura planar, como mostra a Figura 2.10a, é possível observar que o ângulo de incidência é igual à metade do ângulo de espalhamento. Verifica-se ainda que a diferença da distância percorrida por fótons espalhados por camadas subsequentes é dada por 2d, como mostra a Figura 2.10b, fornecendo a expressão dada pela Equação 2.14.

Os fótons espalhados sofrerão interferência, sendo que o espalhamento de planos subsequentes gerará uma interferência construtiva quando a diferença de caminho percorrido for igual a um número inteiro do comprimento de onda da radiação. Utilizando as Equações

2.7 e 2.14 para obter uma interferência construtiva, obtem-se a Equação 2.15, onde n é um número inteiro diferente de zero.

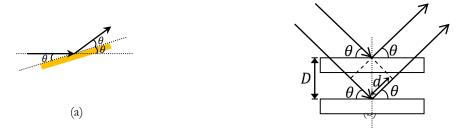


Figura 2.10. Representação do espalhamento de (a) um plano e (b) um sistema lamelar.

$$2d = 2Dsen\theta (2.14)$$

$$q_n = \frac{2\pi n}{D} \tag{2.15}$$

Com base nessas informações, observa-se que para o espalhamento de um sistema lamelar, como é o caso das bicamadas descritas pelo modelo geométrico, obter-se-á picos cujos valores de *q* para os *n* picos são dados pela Equação 2.15, e essa relação é conhecida como Lei de Bragg. O fator de estrutura de uma fase lamelar rígida é mostrado pela curva tracejada na Figura 2.11.

Porém, como visto anteriormente, um modelo de membranas estáticas não descreve adequadamente os sistemas reais, por isso é preciso acrescentar efeitos de flutuações ao mesmo, que resultam em um espalhamento difuso, com um decaimento da intesidade de espalhamento governada por uma grandeza chamada parâmetro de Caillé (η), que está relacionado aos módulos de compressibilidade da fase lamelar e de rigidez das membranas, como mostra a Equação 2.16 (Caillé, 1972).

$$\eta = \frac{\pi k_B T}{2D^2 \sqrt{KB}} \tag{2.16}$$

Percebe-se que com o aumento do parâmetro de Caillé, as amplitudes dos picos para altos valores de q diminuem, ou seja, o decaimento das amplitudes dos picos está diretamente relacionado a η , sendo possível determiná-lo a partir do fator de estrutura das curvas de SAXS. A expressão que descreve esse fator de estrutura é dada pela Equação 2.17, onde N representa o número de camadas correlatas e γ é a constante de Euler. (Zhang; Suter; Nagle, 1994)

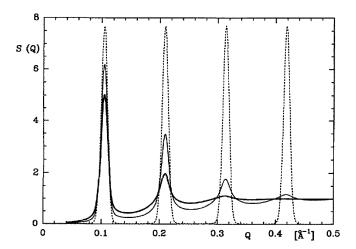


Figura 2.11. Evolução do fator de estrutura com diferentes valores do parâmetro de Caillé. (Nallet; Laversanne; Roux, 1992)

$$S(q) = 1 + 2\sum_{n=1}^{N-1} \left(1 - \frac{n}{N}\right) \cos(nqD) e^{-\left(\frac{D}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta \gamma} (n\pi)^{-\left(\frac{D}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta}$$
(2.17)

Essa equação é utilizada para ajustar as curvas de SAXS. Quando há aumento no valor de η , maiores são as flutuações, indicando que K e/ou B são menores, contudo, não é possível desacoplar os comportamentos de ambas as grandezas com apenas esse tipo de ajuste.

2.5. Espalhamento dinâmico de luz

Para a realização de experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), ou Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) como também é conhecida, são utilizados essencialmente um laser, um fotodetector que capta a intensidade de luz espalhada em função do tempo, e um correlator.

A luz do laser atravessa um polarizador para definir a polarização do feixe incidente, que é espalhado ao atravessar a amostra. A luz espalhada passa por um analisador que seleciona uma dada polarização, para que essa radiação seja, então, captada pelo detector.

A posição do detector define o ângulo de espalhamento, que se mantém constante durante as medidas. Um esquema do aparato experimental está representado na Figura 2.12 (Berne; Pecora, 2000).

A intensidade de luz captada é convertida em sinais elétricos, que serão registrados no correlator em intervalos de tempo discretos (Δt). O correlator faz então a correlação entre a

intensidade registrada em um instante de tempo t com a intensidade registrada em um instante de tempo posterior $t + \tau$, onde τ é um múltiplo de Δt , gerando, assim, uma função de autocorrelação da intensidade normalizada $[g_2(\tau)]$.

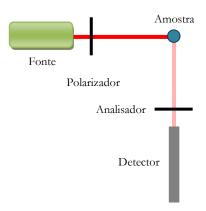


Figura 2.12. Representação esquemática da vista superior de um experimento de DLS.

Essa função pode ser expressa em relação à função de autocorrelação do campo elétrico normalizada $[g_1(\tau)]$, que pode ser obtida pela Equação 2.18, onde β é uma constante que depende do aparato experimental e B é referente à linha de base (Brown, 1996).

$$g_2(\tau) = B\left(1 + \beta \left|g_1(\tau)\right|^2\right) \tag{2.18}$$

Para sistemas diluídos, ou seja, quando não há interações entre as partículas, o deslocamento das partículas é dado unicamente pelo movimento browniano. Essa movimentação está relacionada ao coeficiente de difusão translacional (D_T) médio dos centros espalhadores, que é proporcional à rapidez com que os mesmos se deslocam no meio. Sendo assim, a função de autocorrelação $g_1(\tau)$ é dada pela Equação 2.19 (Brown, 1996).

$$g_1(\tau) = e^{-D_T q^2 \tau} (2.19)$$

No caso de experimentos de espalhamento de luz, o vetor de espalhamento é dado pela Equação 2.20, onde n é o índice de refração do meio espalhador e θ é a metade do ângulo formado entre o feixe incidente e o detector, ou seja, a metade do ângulo de espalhamento (Berne; Pecora, 2000).

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} sen\theta \tag{2.20}$$

Ao obter o coeficiente de difusão dos centros espalhadores quando não há interações entre os mesmos, é possível determinar seu diâmetro hidrodinâmico (d_h) , através da Equação 2.21,

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade do solvente (Berne; Pecora, 2000 e Brown, 1996).

$$D_T = \frac{k_B T}{3\pi \eta d_h} \tag{2.21}$$

Essa expressão é derivada da relação de Stokes-Eisntein, assumindo o deslocamento de partículas esféricas no meio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sistema lamelar

Foram utilizados dois grupos de moléculas para preparar as fases lamelares. Um grupo é a lecitina de soja, comercializada pela empresa Avanti Polar. A lecitina é composta por uma mistura de lipídios, cuja espécie majoritária, cerca de 63%, é a dilinoleoilfosfatidilcolina (DLPC), e sua estrutura está representada na Figura 3.1a. A segunda espécie presente em maior quantidade, com apenas 15%, é a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), e sua estrutura está representada na Figura 3.1b.

Figura 3.1. Fórmula estrutural da (a) dilinoleoilfosfatidilcolina e (b) dipalmitoilfosfatidilcolina.

Levando em conta a distribuição dos constituintes da lecitina, sua densidade pode ser obtida pela média ponderada das densidades dos mesmos, sendo igual a 1,01 g/mL. A lecitina pode ser encontrada em grande quantidade nas membranas celulares e, como é composta por lipídios zwitteriônicos, é biocompatível, o que torna o estudo desses sistemas interessante, pois podem ser aplicados a modelos biológicos.

O outro grupo é um co-surfactante comercializado pela empresa Seppic, conhecido como Simulsol, que é uma mistura de ácidos graxos etoxilados. Essa mistura é composta por ácidos oleicos e ácidos palmíticos, cada qual com uma cadeia polimérica de PEG (polietilenoglicol)

funcionalizada em sua região polar, conforme representado nas Figuras 3.2a e 3.2b, respectivamente. Sua densidade também pode ser obtida pela média das densidades de seus constituintes, sendo igual a 1,02 g/mL.

$$\begin{array}{c} O \\ | \\ | \\ C - (CH_2)_7 - CH = CH - (CH_2)_7 - C - O - (CH_2 - CH_2 - O)_n - CH_3 \\ \\ O \\ (a) \\ \\ H_3C - (CH_2)_{14} - C - O - (CH_2 - CH_2 - O)_n - CH_3 \\ \\ (b) \end{array}$$

Figura 3.2. Fórmula estrutural do ácido (a) oleico e (b) palmítico funcionalizados com PEG.

Observa-se que os co-surfactantes possuem uma única cadeia carbônica, diferente dos lipídios, contudo, as cadeias de ambos possuem as mesmas quantidades de carbonos, como é o caso da dilinoleoilfosfatidilcolina e do ácido oleico e também da dipalmitoilfosfatidilcolina e do ácido palmítico.

Assim, o comprimento das partes hidrofóbicas de tais moléculas é semelhante ao dos constituintes da lecitina, indicando que não há mudanças significativas quanto à espessura da parte interna das bicamadas, quando se misturam a lecitina e o simulsol. Espera-se, porém, que a inserção de moléculas de cadeia hidrofóbica simples contribua para o aumento da flexibilidade da membrana.

Com relação á parte hidrofílica, espera-se que a mistura da lecitina e do simulsol produza mudanças na interface das membranas uma vez que a região hidrofílica da lecitina e do simulsol apresentam propriedades de hidratação e organização espacial distintas.

Neste trabalho, foram utilizados dois tipos de co-surfactantes com relação a cadeia de PEG; um polidisperso e outro monodisperso. No produto comercial a cadeia polimérica de PEG é polidispersa com número de monômeros médio de monômeros igual a 10, podendo variar de 6 a 20 monômeros.

O co-surfactantre ou simulsol monodisperso, foi preparado especialmente para investigação do efeito da dimensão das cadeias poliméricas nas propriedades elásticas das membranas, e a cadeia possui 15 monômeros.

Na Figura 3.3a é representada a molécula de DPPC e na Figura 3.3b é representada a molécula de Simulsol com 15 monômeros na região hidrofílica, em uma mesma escala, possibilitando a comparação das dimensões de ambas as moléculas.

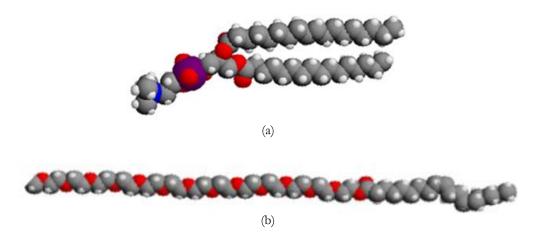


Figura 3.3. Representação esquemática em mesma escala de uma molécula de (a) DPPC e (b) simulsol monodisperso.

A lecitina e o simulsol são, então, misturados em diferentes proporções, variando assim sistematicamente a composição das membranas. Para o co-surfactante monodisperso, as proporções variam de 90% de lecitina e 10% de simulsol até 30% de lecitina e 70% de simulsol em massa, sendo que o simulsol puro também foi utilizado. Já para o co-surfactante polidisperso, as proporções variam de 95% de lecitina e 5% de simulsol até 10% de lecitina de 90% de simulsol em massa, sendo que a lecitina pura também foi utilizada.

Cada uma dessas misturas é inserida em solvente orgânico, o ciclohexano, numa proporção de 1,5 ml de solvente para cada 100 mg de surfactantes, e submetida a um banho de ultrassom por até 30 minutos para auxiliar a homogeneização. As misturas são colocadas em uma câmara a vácuo para acelerar o processo de evaporação do solvente.

Às misturas de lipídios e simulsol monodisperso, após homogeneização, foi adicionada água para a formação das bicamadas. As proporções de surfactantes e água variam, para que se possa explorar o comportamento das membranas seguindo a linha de diluição, tendo em vista que a massa total da amostra seja de cerca de 100 mg.

As amostras foram centrifugadas a 22°C durante um mês, invertendo as orientações dos tubos que as continha, com intervalos de descanso de alguns dias, para uma homogeneização

adequada e para acelerar o processo de estabilização. As amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C.

As misturas de lipídios e simulsol polidisperso foram inseridas em soluções de polímero em proporções de 1:3 em massa, respectivamente, tendo em vista que a massa total de amostra seja de cerca de 100 mg. As soluções de polímero são preparadas em diferentes concentrações, e esse processo será explicado na próxima seção.

Os processos de estabilização e homogeneização das amostras, bem como o armazenamento, são os mesmos já descritos para as amostras compostas de surfactantes e água.

3.2. Soluções de polímero

3.2.1. Caracterização dos polímeros

O polímero utilizado neste trabalho é o PVP (polivinilpirrolidona), que tem a estrutura representada pela Figura 3.4. Sua densidade é de 1,27 g/mL e este é um polímero solúvel em solventes polares. Por ser bem higroscópico, pode absorver até 40% de sua massa em água (Haaf; Sanner; Straub, 1985).

$$\begin{array}{c} H \\ H_2C = C \\ N \\ O \end{array}$$
(a)
$$\begin{array}{c} H \\ H_2C - CH \\ O \\ N \\ \end{array}$$
(b)

Figura 3.4. Estrutura da (a) vinilpirrolidona e da (b) polivinilpirrolidona (PVP).

Neste estudo, o polímero foi utilizado em três tamanhos de cadeias, sendo eles um com peso molecular médio de 10 kg/mol, outro com 40 kg/mol e por fim um com 360 kg/mol.

Um dos motivos para se utilizar três tamanhos do mesmo polímero é o fato de que soluções com uma concentração alta se mostram muito mais viscosas quando se utiliza o polímero de maior peso molecular, o que dificultaria a manipulação dessas amostras.

Outro motivo é que, conforme descrito na seção 3.1, quando se insere os lipídios na solução de polímero, devemos nos assegurar que os polímeros não se insiram entre as bicamadas que serão formadas. Portanto, para grandes distâncias de separação deve-se utilizar polímeros com maior peso molecular.

Inicialmente foi realizado um processo de purificação dos polímeros, que será descrito com mais detalhes na seção 3.2.3. O processo de síntese dos polímeros pode gerar resíduos, e uma membrana de diálise foi utilizada para retirar essas impurezas das soluções. O processo consiste basicamente em inserir a solução de polímero em uma membrana semipermeável e deixá-la em um reservatório de água, fazendo com que partículas menores que os poros da membrana se desloquem da mesma, por um processo de diálise.

Uma caracterização para os três tamanhos de polímero que seriam utilizados foi realizada por experimentos de DLS, assim, é possível obter informações sobre o diâmetro hidrodinâmico dos mesmos. O equipamento utilizado é um analisador de tamanho de partículas comercializado pela empresa Brookhaven, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.5, onde à direita é possível observar as curvas experimentais das funções de autocorrelação e seus ajustes e à esquerda as respectivas distribuições de diâmetros obtidas desses ajustes.

Os ajustes foram realizados utilizando um pacote computacional conhecido como *Contin*, que é efetuado automaticamente pelo *software* fornecido pelo fabricante. Esse método considera uma função de distribuição para a taxa de decaimento da exponencial da função de autocorrelação, fornecendo assim um conjunto de valores para o coeficiente de difusão. Esse conjunto de valores gera uma distribuição de tamanhos para as partículas analisadas.

É possível observar que há a presença de partículas com diâmetro hidrodinâmico em torno de 1000 nm para as três amostras. Essas populações podem ser referentes a aglomerados de polímeros, porém, como a preocupação é para que os polímeros não se hospedem entre as membranas, a atenção deve ser voltada para as populações de menores dimensões.

As funções de distribuição de tamanhos fornecem valores médios de 50Å, 100Å e 200Å para os diâmetros hidrodinâmicos do PVP10, PVP40 e PVP360, respectivamente.

Outra maneira de obter informações sobre as dimensões dos polímeros é por experimentos de SAXS. As medidas foram realizadas para cada um dos três polímeros em soluções com

concentração de aproximadamente 2% em massa, fazendo com que não houvesse interações entre as partículas. Uma primeira análise dos resultados foi efetuada através de gráfico de Kratky (Pedersen, 2002), que é mostrado na Figura 3.6.

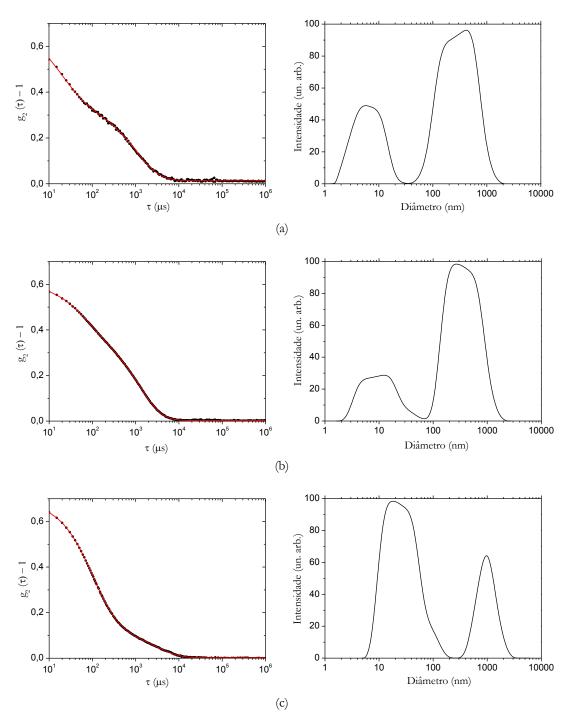


Figura 3.5. Curvas de autocorrelação e respectivos ajustes e distribuições de diâmetro para o (a) PVP10, (b) PVP40 e (c) PVP360.

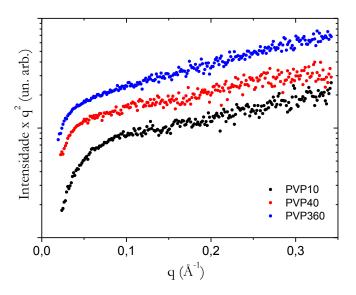


Figura 3.6. Gráfico de Kratky para os três pesos moleculares do PVP.

O gráfico de Kratky é obtido quando se multiplica a intensidade de espalhamento pelo quadrado do vetor de espalhamento, fornecendo informações sobre a forma da partícula e mais precisamente quanto à sua flexibilidade. Os resultados presentes na Figura 3.6 mostram que os polímeros são bastante flexíveis, pois apresentam um comportamento praticamente linear e crescente para altos valores de q. Essas curvas são típicas de polímeros flexíveis com distribuição gaussiana e se não há a presença de fator de estrutura, fornecem espalhamento com a intensidade descrita pela Equação 3.1. (Pedersen, 2002)

$$I(q) = \frac{2(e^{-\langle R_g^2 \rangle q^2} + \langle R_g^2 \rangle q^2 - 1)}{(\langle R_g^2 \rangle q^2)^2}$$
(3.1)

Observa-se que o único parâmetro ajustável nesse modelo é o raio de giro quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$. Utilizando esse modelo é possível extrair o valor do raio de giro médio dos polímeros para cada uma das curvas de SAXS. Os ajustes obtidos são apresentados na Figura 3.7.

Os ajustes se mostram satisfatórios, validando o modelo proposto. Sendo assim, os valores obtidos para o raio de giro através dos ajustes são 30 Å, 40 Å e 55 Å para o PVP10, PVP40 e PVP360, respectivamente.

É possível encontrar na literatura maneiras para obter o raio hidrodinâmico e raio de giro de polímeros através de sua massa molecular (Schmidt; Burchard, 1981). Os cálculos foram efetuados e os valores obtidos para os raios hidrodinâmicos são 2,29 \pm 0,04 nm, 4,58 \pm 0,08 nm e 13,7 \pm 0,2 nm para o PVP10, PVP40 e PVP360, respectivamente. Já os valores obtidos

para os raios de giro são 2,90 \pm 0,07 nm, 5,80 \pm 0,15 nm e 17,4 \pm 0,4 nm para o PVP10, PVP40 e PVP360, respectivamente.

A Tabela 3.1 mostra os resultados experimentais de ambas as técnicas e os valores teóricos obtidos para cada peso molecular do polímero.

	DLS	Teórico	SAXS	Teórico
	Raio hidrodinâmico (nm)		Raio de giro (nm)	
PVP10	2,5	2,3	3,0	2,9
PVP40	5,0	4,6	4,0	5,8
PVP360	10,0	13,7	5,5	17,4

Tabela 3.1. Valores experimentais e teóricos para as dimensões dos polímeros

Observa-se que os valores de raio hidrodinâmico obtidos experimentalmente para os três polímeros estão muito próximos dos valores esperados pelo modelo. Porém, apesar de o valor de raio de giro obtido experimentalmente para o PVP10 estar de acordo com o esperado, o valor obtido para o PVP40 está ligeiramente diferente do valor esperado e o valor obtido experimentalmente para o PVP360 é praticamente um terço do valor esperado.

A diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores teóricos para o raio de giro de cada um dos polímeros está relacionada à teoria utilizada para o cálculo teórico, pois considera que as moléculas estão suspensas em um solvente ideal, o que pode não ser o caso do sistema estudado. No entanto, essa discrepância não representa um problema para os experimentos em questão, pois como já mencionado anteriormente, há uma preocupação com os limites inferiores do tamanho dos polímeros, para que estes não se insiram entre as bicamadas.

Sendo assim, cada um dos polímeros pode ser usado até que a distância de separação entre as membranas não seja da mesma ordem dos valores dos seus diâmetros hidrodinâmicos ou diâmetros de giros, para assegurar que os mesmos não irão se inserir entre as membranas após o equilíbrio da pressão osmótica. Isso garante que o polímero irá exercer uma pressão exclusivamente externa, não alterando as interações entre as bicamadas. Como o PVP10 é o que possui menor diâmetro hidrodinâmico, aproximadamente 50 a 60 Å, ele não deve ser usado em sistemas lamelares altamente hidratados, para os quais a distância de separação entre as bicamadas é comparável a esses valores.

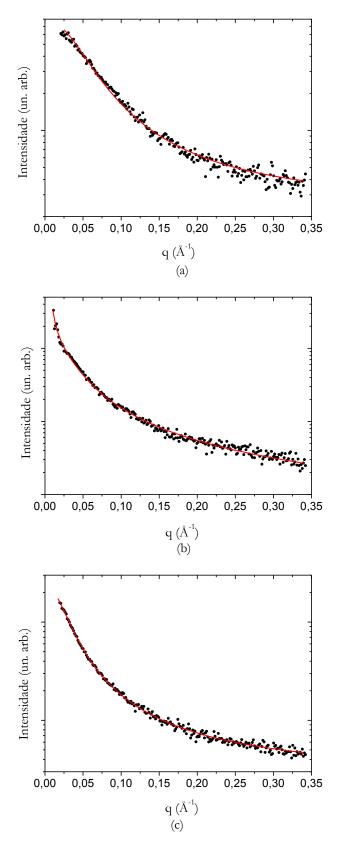


Figura 3.7. Curvas de SAXS e ajustes utilizando a equação de Debye para o (a) PVP10 (b) PVP40 e (c) PVP360.

3.2.2. Calibração do osmômetro

O osmômetro é um equipamento eletrônico utilizado para determinar a osmolalidade de uma amostra por meio da medida de seu ponto de fusão. Neste trabalho, foi utilizado o aparelho PZL – 1000, Figura 3.8a, da empresa PZL tecnologia, que possui uma resolução de 1 mOsm e precisão de 2 mOsm.

O processo de funcionamento do osmômetro consiste na análise da evolução da temperatura da amostra através de uma sonda que é colocada em contato com a mesma. A Figura 3.8b mostra o comportamento esperado para a temperatura da amostra em função do tempo.

A amostra é alocada em um porta-amostra próprio de vidro que é inserido em banho refrigerante, a uma temperatura de aproximadamente -10°C. A amostra é agitada lentamente para que não congele, até que atinja uma temperatura de -3°C.

Ao atingir esta temperatura, a amostra é agitada fortemente, provocando seu rápido congelamento, e a evolução da temperatura é acompanhada através da sonda. Quando há o equilíbrio térmico, observa-se um *plateau* na curva de temperatura em função do tempo, mostrado na Figura 3.8b, tornando possível a determinação do índice de osmolalidade da solução.

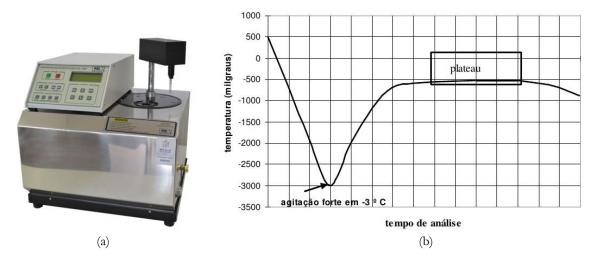


Figura 3.8. (a) Osmômetro PZL-1000 e (b) comportamento esperado para a temperatura da amostra em função do tempo durante a medida da osmolalidade.

A osmolalidade de uma solução indica a quantidade de partículas osmoticamente ativas por unidade de massa do solvente. Essa medida é independente da temperatura da solução e

diretamente relacionada à sua concentração, consequentemente, à sua pressão osmótica. É possível, então, obter um coeficiente de conversão de osmolalidade para pressão osmótica, utilizando uma solução com pressão osmótica conhecida.

Para calibração do osmômetro, foram utilizadas soluções de cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações, o que permite determinar a relação entre a osmolalidade e a pressão osmótica exercida pela solução. Para isso, aplica-se o modelo de gás ideal, representado pela Equação 3.2, que relaciona a pressão osmótica de uma solução à concentração em massa de soluto (c), onde N_A é a constante de Avogadro, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura em escala absoluta e M_w é a massa molar.

$$\pi = \frac{c N_A R T}{M_W} \tag{3.2}$$

A temperatura utilizada para os cálculos da pressão osmótica foi de 22 °C, pois é a temperatura em que todos os experimentos posteriores com pressão osmótica foram realizados. A calibração do osmômetro foi realizada usando água pura para o ponto zero e duas soluções padrões de 500 e 1000 mOsm/kgH₂O. Foram preparadas duas soluções para cada uma das concentrações desejadas, realizando-se três medidas de osmolalidade para cada uma dessas soluções. O valor da osmolalidade foi determinado pela média das três medidas, e as mesmas são apresentadas na Figura 3.9.

É possível observar uma dependência linear entre a pressão osmótica e a osmolalidade das soluções de NaCl, e com um ajuste de reta dos pontos experimentais, é possível obter a expressão dada pela Equação 3.3 para esse equipamento, nas condições submetidas durante este estudo.

$$\pi = 2590 \times Osmolalidade$$
 (3.3)

Com este resultado pode-se determinar os coeficientes linear e angular, que fornecem a conversão de osmolalidade para pressão osmótica.

3.2.3. Pressão exercida pelos polímeros

A pressão osmótica exercida por uma solução de polímero é diretamente proporcional à concentração da mesma, e essa dependência pode ser expressa por uma expansão de virial. Portanto, para se calcular a pressão exercida por uma solução de determinada concentração, é

preciso conhecer os coeficientes dessa expansão para o polímero em questão. É possível encontrar na literatura os coeficientes para o PVP40 e o PVP360 (Vink,1971).

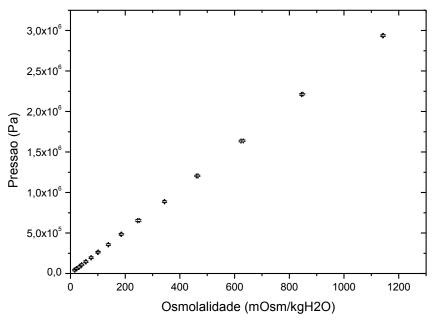


Figura 3.9. Pressão osmótica em função da osmolalidade para soluções de NaCl.

Para baixas concentrações, o único termo relevante é o de primeira ordem, que é proporcional ao inverso do peso molecular do polímero, conforme o modelo do gás ideal descrito pela Equação 3.2. Á medida que a concentração de polímero aumenta, os termos de ordem superior passam a não ser mais desprezíveis, devendo ser levados em conta. Porém, a partir de certa concentração, o comportamento da pressão não depende mais do peso molecular do polímero, demonstrando um comportamento único para todas as macromoléculas do mesmo tipo.

Sendo assim, como soluções de mesma concentração possuem viscosidade maior quando se utiliza polímeros com maior peso molecular, torna-se mais fácil o acesso a altas pressões utilizando soluções com polímeros de menor peso molecular e vice-versa. Como não foi possível encontrar os coeficientes para a calibração da pressão do PVP10 na literatura, foram realizados experimentos para determiná-los e também para verificar os coeficientes da expansão para o PVP40 e do PVP360.

Foram preparadas soluções utilizando os três pesos moleculares do polímero na região de concentração de interesse. Algumas concentrações foram formuladas para dois tipos de polímero, permitindo assim a análise do comportamento da pressão osmótica no caso da

superposição das concentrações. O osmômetro foi utilizado para que se pudesse obter a osmolalidade de cada solução e a pressão osmótica foi obtida utilizando o procedimento de conversão descrito na seção 3.2.1. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.10.

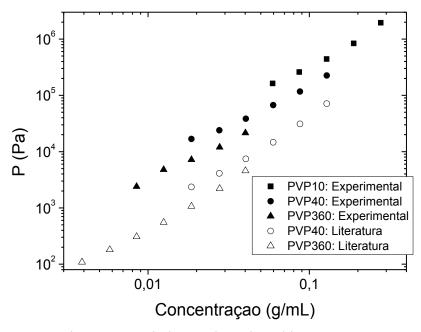


Figura 3.10. Resultados experimentais e teóricos para a pressão osmótica do PVP em três pesos moleculares diferentes.

Verifica-se que o osmômetro não permite medidas de concentrações muito baixas, o que limita o intervalo de concentrações que se pode atingir. Além disso, percebe-se que os valores de pressão obtidos experimentalmente estão acima dos valores encontrados na literatura (McIntosh; Magid; Simon, 1987; Petrache et al, 1998). Duas hipóteses foram levantadas para explicar essas diferenças.

A primeira hipótese supõe que a calibração do osmômetro não esteja adequada, gerando um erro sistemático na medida. Porém, é possível observar que para concentrações em torno de 0,01 g/mL o valor experimental é 10 vezes maior que o valor da literatura, enquanto que para concentrações em torno de 0,1 g/mL esse fator está em torno de 2, refutando assim essa hipótese.

A segunda hipótese sugere que o aumento nas pressões se deve a impurezas e resíduos provenientes da síntese do polímero. Durante a produção do mesmo podem restar fragmentos de polímeros menores que não se agregaram, assim como íons e outras partículas pequenas, produtos das reações químicas que envolvem a fabricação dos mesmos. Esses resíduos fazem

com que a pressão osmótica medida seja maior do que a esperada, e essas impurezas podem variar de um lote para outro do polímero.

Uma maneira eficiente de retirar essas impurezas para recuperar apenas as partículas grandes do polímero é realizar uma diálise. Esse processo consiste em colocar a solução de polímero em uma membrana semipermeável e deixá-la em contato com um reservatório de água pura. Por processo de difusão, as partículas que forem pequenas o suficiente para atravessar os poros da membrana, irão se deslocar de dentro da membrana para o meio aquoso, tentando igualar as pressões osmóticas dentro e fora da mesma.

As membranas utilizadas para esse procedimento foram do tipo SnakeSkin, comercializadas pela empresa Thermo Scientific. Membranas de 10k MWCO foram utilizadas para o PVP40 e para o PVP360, enquanto membranas de 7k MWCO foram utilizadas para o PVP10. As soluções de polímero foram preparadas em concentrações de até 10% em massa e inseridas na membrana. As membranas foram então seladas e cada uma delas foi inserida em béquer contendo água pura. O volume de água contido no béquer era de no mínimo 50 vezes o volume da solução, sendo que a mesma era trocada periodicamente até que o volume total fosse de 300 vezes o volume de solução.

O sistema foi mantido em leve agitação ao longo de todo o processo de diálise, durando cerca de uma semana. Após esse processo, a quase totalidade das partículas pequenas será descartada juntamente com o buffer, e então restarão apenas as partículas grandes no interior da membrana, e os polímeros são recuperados por método de liofilização. Novos experimentos foram realizados para se verificar a pressão osmótica após o processo de diálise, e os resultados estão presentes na Figura 3.11.

Observa-se que o processo de diálise se mostra eficiente, pois a pressão osmótica diminui substancialmente após o processo de diálise, validando a hipótese levantada. Portanto, esse procedimento deve ser realizado para que se tenha certeza do valor da pressão exercida pelo polímero e para garantir que partículas pequenas não irão se inserir entre as membranas.

Após o processo de diálise e recuperação dos polímeros, estes foram resuspendidos nas concentrações desejadas e foram realizadas medidas no osmômetro, para que se pudesse obter a curva de pressão osmótica em função da concentração de polímero em solução, conforme descrito anteriormente. Os resultados para os polímeros com três pesos moleculares distintos são mostrados na Figura 3.12.

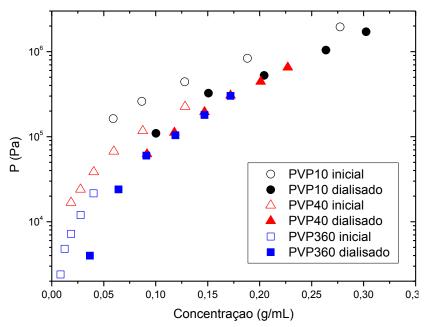


Figura 3.11. Comparação dos resultados de pressão osmótica do PVP após o processo de diálise.

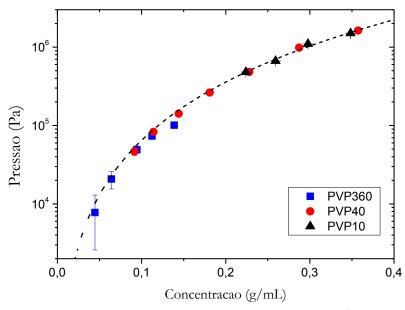


Figura 3.12. Pressão osmótica em função da concentração para os três polímeros.

Observa-se que as curvas para cada um dos polímeros praticamente se sobrepõem, portanto, é possível utilizar uma única equação para descrever o conjunto de pontos obtidos para os três polímeros. É importante notar que cada região acessível de pressão depende do peso molecular do polímero na solução. Usando a expansão de virial para ajustar os pontos experimentais, obtém-se a Equação 3.4 para descrever a pressão osmótica em função da concentração de polímero.

$$\pi = (4 \cdot c^2 + 25 \cdot c^3) \times 10^6 \tag{3.4}$$

Com base nesta equação é possível determinar a pressão osmótica de uma solução de qualquer um dos três polímeros, desde que sua concentração seja conhecida e esteja no intervalo considerado. Se compararmos os resultados obtidos com dados presentes na literatura, como mostra a Figura 3.13, observa-se que com as concentrações de polímero utilizadas neste estudo, é possível alcançar valores mais altos de pressão.

Vê-se pela Figura 3.13 que o intervalo de pressão obtido neste trabalho contém valores onde a concentração é maior que o dobro dos resultados encontrados na literatura. Esses valores de pressão permitem o acesso a regiões onde as membranas estão bem confinadas, fornecendo informações sobre as interações entre as mesmas nesse regime.

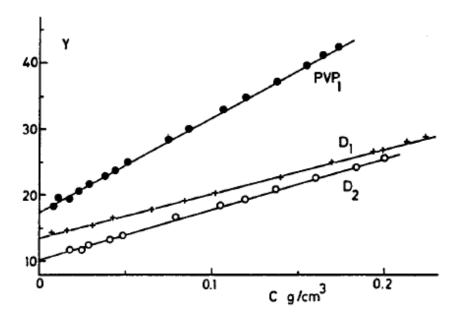


Figura 3.13. Pressão osmótica em função da concentração, onde PVP1 é o PVP40. A variável Y é igual à $\left(\frac{\pi}{c^2} - \frac{A_1}{c}\right)$, onde A1 é o primeiro coeficiente da expansão de Virial e π está em atm (Vink, 1971).

3.3. Membranas sob pressão osmótica

3.3.1. Preparação das bicamadas

A osmose é um processo conhecido como a busca do equilíbrio das pressões exercidas pelo soluto entre duas soluções separadas por uma membrana semipermeável, ou seja, uma membrana que permite a passagem do solvente, mas não a passagem do soluto. Ao colocar em um dos compartimentos uma solução de concentração molar maior do que a outra haverá uma diferença entre as pressões, conforme a Equação 3.2, portanto, por um processo espontâneo, o solvente irá se deslocar de um compartimento para o outro, buscando igualar as pressões osmóticas em ambos os lados. Isso quer dizer que o solvente que está presente na parte mais diluída irá se deslocar para a região mais concentrada, igualando as concentrações molares.

Quando a mistura de lecitina e simulsol polidisperso é inserida em solução de polímeros, conforme descrito na seção 3.1, as moléculas do polímero irão "competir" por água com os surfactantes, e o solvente irá se deslocar até que o equilíbrio osmótico seja atingido, fazendo com que a fase lamelar seja formada. Esse processo de deslocamento do solvente se dá pela diferença entre as pressões osmóticas, conforme descrito acima, e ao atingir o equilíbrio, haverá uma separação de duas fases, sendo uma a solução de polímeros e outra os lipídios organizados na fase lamelar.

A separação de fases é mostrada na Figura 3.14 com uma solução de polímeros mais densa e transparente, e uma solução de lipídios, menos densa e translúcida. O equilíbrio é atingido quando a pressão osmótica é a mesma nas duas fases que coexistem. Os lipídios organizam-se em bicamadas regularmente espaçadas, sendo que a periodicidade lamelar no equilíbrio corresponde a um valor de D, para uma dada pressão osmótica de equilíbrio.

A pressão osmótica exercida pelo polímero é controlada através da concentração do mesmo na solução, dessa maneira, faz-se variar a pressão para diferentes composições de membrana. Quando a fase lamelar é formada na solução de polímero, parte da água que estava presente na solução se desloca para a fase lamelar, conforme representado na Figura 3.15, e assim a concentração efetiva de polímeros na solução *bulk* aumenta, sendo necessária então uma correção na concentração efetiva da solução. O procedimento de correção é descrito a seguir.



Figura 3.14. Separação da fase lamelar (alto) e da solução polimérica (baixo) nos capilares.

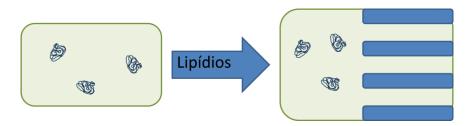


Figura 3.15. Representação esquemática do efeito da inserção dos lipídios na solução de polímeros.

3.3.2. Correção na pressão efetiva

Experimentos para a caracterização das fases lamelares foram realizados anteriormente (Gerbelli, 2012), onde se obteve uma curva da periodicidade lamelar em função do inverso da fração volumétrica de lipídio em água. Utilizando o modelo geométrico de bicamada rígida, é possível fazer um ajuste na região de interesse dessa curva, e obter uma expressão que relaciona essas duas grandezas, como mostra a Figura 3.16 para uma membrana composta por 100% de lecitina.

Quando a fase lamelar se forma na solução de polímeros, a periodicidade lamelar final é aquela para a qual a pressão osmótica na solução de polímeros e na fase lamelar é a mesma. A partir dos experimentos de SAXS, é possível determinar a periodicidade lamelar em equilíbrio com a solução de polímeros. Utilizando a lei de diluição usual, descrita pela Equação 2.2, para um dado valor de D, é possível determinar o valor da fração volumétrica de água, que é conhecida experimentalmente, para cada uma das composições de membrana. Como a massa de lipídios é conhecida experimentalmente, pode-se determinar a quantidade de água que foi deslocada da solução de polímero para hidratar a fase lamelar.

A pressão osmótica inicial da solução de polímeros também é conhecida a partir da concentração de polímeros e da curva de calibração apresentada na Figura 3.12. No entanto,

como uma parte da água foi deslocada para a fase lamelar, a concentração efetiva de polímero é maior do que a inicial, e o valor da pressão precisa ser corrigido para um valor efetivo. O procedimento detalhado de como se dá essa correção é apresentado abaixo.

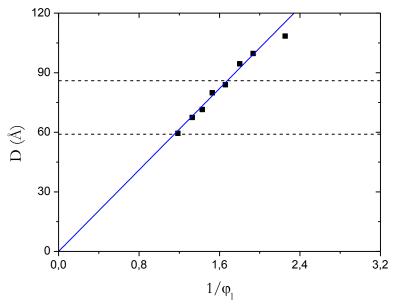


Figura 3.16. Lei de diluição da fase lamelar, com dados experimentais e ajuste para uma membrana composta por 100% de lecitina.

Para um dado valor de *D*, a equação de parametrização da curva de diluição, obtida anteriormente, permite a determinação do valor corresponde de fração volumétrica de lipídio.

A fração volumétrica de lipídio na fase lamelar (φ_l^L) é dada pela razão entre o volume de lipídio (V_l) e o volume total ocupado pela fase lamelar (V_T^L) . Essa relação pode ser reescrita em função das massas de lipídio (m_l) e de água na fase lamelar (m_a^L) , e suas densidades (ρ_l) e (ρ_a) , respectivamente, conforme representado na Equação 3.5. Para obter a massa de água na fase lamelar, podemos reescrever a Equação 3.5, obtendo assim a Equação 3.6.

$$\varphi_l^L = \frac{v_l}{v_T^L} = \frac{v_l}{v_l + v_a^L} = \frac{\frac{m_l}{\rho_l}}{\frac{m_l}{\rho_l} + \frac{m_a^L}{\rho_a}}$$
 (3.5)

$$m_a^L = \frac{m_l \rho_a}{\rho_l} \left(\frac{1}{\varphi_l^L} - 1 \right) \quad (3.6)$$

A concentração inicial da solução de polímero (c_i) é obtida pela razão entre a massa de polímero (m_p) e o volume total da solução (V_T^S) . O volume da solução é dado pela soma dos volumes de polímero (V_p) e de água (V_a) , portanto, podemos reescrever a expressão da concentração de polímero em função das massas de polímero e de água (m_a) e suas

densidades, como mostra a Equação 3.7. Reescrevendo a Equação 3.7, podemos obter a expressão para determinar a massa de água, que é dada pela Equação 3.8.

$$c_i = \frac{m_p}{V_T^S} = \frac{m_p}{V_p + V_a} = \frac{m_p}{\frac{m_p}{\rho_p} + \frac{m_a}{\rho_a}}$$
 (3.7)

$$m_a = m_p \rho_a \left(\frac{1}{c_i} - \frac{1}{\rho_p}\right) \quad (3.8)$$

Sabendo que a massa de solução (m_s) igual à soma das massas de água e de polímero e utilizando a Equação 3.8, é possível obter a Equação 3.9, que pode ser reescrita e apresentada na forma da Equação 3.10.

$$m_{s} = m_{a} + m_{p} = m_{p} \left[1 + \rho_{a} \left(\frac{1}{c_{i}} - \frac{1}{\rho_{p}} \right) \right] (3.9)$$

$$m_{p} = \frac{m_{s}}{1 + \rho_{a} \left(\frac{1}{c_{i}} - \frac{1}{\rho_{p}} \right)} (3.10)$$

A massa total de água é a soma das massas de água na fase lamelar e na fase do polímero (m_a^p) , então, é possível, a partir da Equação 3.9, obter a Equação 3.11.

$$m_a^P = m_s - m_p - m_a^L$$
 (3.11)

A concentração final da solução de polímero (c_f) é dada então pela razão entre a massa de polímero e o volume total ocupado pela fase do polímero (V_T^P) , sendo esse a soma entre o volume do polímero e o volume de água na fase do mesmo (V_a^P) . A partir dessas informações é possível reescrever a expressão em função das massas de polímero e de água na fase do mesmo e de suas densidades, conforme explicitado na Equação 3.12.

$$c_f = \frac{m_p}{V_T^P} = \frac{m_p}{V_p + V_a^P} = \frac{m_p}{\frac{m_p}{\rho_p} + \frac{m_q^P}{\rho_a}}$$
 (3.12)

Utilizando as Equações 3.6, 3.10 e 3.11 na Equação 3.12, podemos obter uma expressão para a concentração efetiva da solução de polímero em função das variáveis conhecidas pelo preparo das amostras e obtidas experimentalmente, conforme descrito pela Equação 3.13.

$$c_f = \frac{c_i}{1 - \frac{m_l}{m_S \rho_l} \left(\frac{1}{\rho_l^L} - 1\right) \left[c_i + \rho_a \left(1 - \frac{c_i}{\rho_p}\right)\right]} (3.13)$$

Conhecendo-se a concentração efetiva da solução de polímero é possível recalcular a pressão osmótica nas membranas. A pressão osmótica exercida pelo polímero é controlada

através da concentração do mesmo na solução, dessa maneira, fazemos variar a pressão para diferentes composições de membrana. É importante que o raio hidrodinâmico do polímero seja sempre superior à distância de separação entre as membranas, garantindo que o mesmo não irá se inserir entre as membranas, permanecendo sempre na solução *bulk* e exercendo uma pressão externa apenas, que será contrabalanceada pelas interações entre as membranas.

3.4. Experimentos de SAXS

3.4.1. Arranjo experimental

A principal técnica utilizada neste estudo foi o Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS). Conforme já descrito brevemente na seção 2.4.1, o arranjo experimental desta técnica é composto basicamente por uma fonte de radiação com comprimentos de onda na faixa dos raios-x, um porta amostras e um detector para coletar a radiação espalhada, conforme ilustrado na Figura 2.6.

Os feixes de raios-x das máquinas utilizadas são produzidos por fontes convencionais, cujo processo de produção é descrito a seguir. Um filamento de tungstênio é colocado em uma das extremidades da fonte, sendo este atravessado por uma corrente elétrica, gerando elétrons por processo de emissão termoiônica. Pela presença de uma diferença de potencial entre o cátodo, local onde os elétrons são gerados, e o ânodo, os elétrons serão acelerados, até que atinjam este último.

Ao serem desacelerados, os elétrons geram radiação e, no caso das fontes utilizadas aqui, estes são freados por uma placa de cobre. Um monocromador, que pode ser constituído por um conjunto de cristais, seleciona o comprimento da radiação que será direcionada à amostra, passando por um conjunto de fendas para colimação do feixe. Sendo assim, a radiação característica produzida por uma fonte de Cu possui comprimento de onda em torno de 1,5418 Å, pois este é o comprimento de onda característico da banda Kα deste metal.

As amostras foram inseridas em capilares de vidro e quartzo, com espessura nominal de 1,5 mm, e porta amostras específicos para esses capilares foram utilizados durante os experimentos. Com o auxílio de suportes adaptados, os capilares foram colocados em uma centrífuga com uma rotação de aproximadamente 4000 rpm por cerca de um minuto, para que as amostras com alta viscosidade atingissem o fundo do capilar, que logo em seguida são

selados para evitar evaporação e contaminação das amostras. Esse processo pode gerar uma orientação preferencial na organização das membranas.

Um equipamento do modelo Nanostar, comercializado pela empresa Bruker, foi utilizado para a realização de experimentos no Centro de Pesquisa Paul Pascal (CRPP, Pessac - França). As amostras são inseridas em uma câmara a vácuo e podem ter a temperatura controlada por um sistema de circulação de água. O detector utilizado neste aparelho é um detector a gás para aquisições em duas dimensões, do modelo Hi-Star. A distância entre o detector e a amostra utilizada para os experimentos foi de cerca de 27 cm, fornecendo um intervalo de q entre aproximadamente 0,01 e 0,85 Å⁻¹.

O equipamento utilizado para os experimentos realizados no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP, São Paulo – Brasil) foi do modelo Xeuss, comercializado pela empresa Xenocs. O detector utilizado neste aparelho também permite aquisições em duas dimensões, porém, é um detector híbrido, do modelo Pilatus 300K, comercializado pela empresa Dectris. A distância entre o detector e a amostra utilizada para os experimentos foi de cerca de 77 cm, fornecendo um intervalo de q entre aproximadamente 0,004 e 0,35 Å⁻¹. No equipamento Xeuss a coleta de dados é feita em ar, a pressão atmosférica.

O tempo de coleta de dados para cada uma das amostras varia bastante, dependendo de fatores diversos, como por exemplo, a transmitância da amostra e a intensidade do feixe de raios-x que a atinge e a distância entre a mesma e o detector. Para amostras analisadas no equipamento Nanostar, o tempo de coleta típico variou entre 1 e 3 horas, enquanto no equipamento Xeuss o tempo de aquisição típico foi entre 15 e 45 minutos.

As imagens dos equipamentos e seus respectivos porta amostras são apresentados nas Figuras 3.17 e 3.18.

3.4.2. Redução dos dados

Após a realização dos experimentos, conforme descrito na seção 3.4.3, é necessário fazer um tratamento dos dados antes da análise dos mesmos. A intensidade final obtida é resultado do espalhamento do sistema de interesse, mas também do solvente e do material que contém a amostra, além de outras possíveis fontes de contagens no detector.

Portanto, é necessário que se subtraia todo o espalhamento que não seja proveniente do sistema de interesse, restando apenas a intensidade do mesmo, conforme representado na Figura 3.19.

Sendo assim, a intensidade final pode ser calculada através da Equação 3.14, onde $I_{amostra}$ e I_{fundo} são as intensidades obtidas para o sistema e para o solvente, respectivamente, I_{ruido} e I_{sombra} são aquisições para correções devido à eletrônica do equipamento e sombra do beamstopper, Φ representa o fluxo, T a transmitância e t o tempo de aquisição. Essas grandezas se referem à amostra, quando o índice for a, ao fundo, quando o índice for f e ao ruido, quando o índice for f o termo $d\Sigma/d\Omega_{\acute{a}gua,20^{\circ}C}$ representa o valor da seção de choque e o termo $I(0)_{\acute{a}gua,20^{\circ}C}$, o valor da intensidade extrapolado para f tendendo a 0, ambos para água a f 20°C.

$$I_{final}(q) = \left[\left(\frac{I_{amostra}(\mathbf{q})}{\Phi_a T_a t_a} - \frac{I_{fundo}(\mathbf{q})}{\Phi_f T_f t_f} - \frac{I_{ruido}(\mathbf{q})}{t_r (\Phi_a T_a - \Phi_f T_f)} \right) \frac{1}{I_{sombra}(\mathbf{q})} \right] \frac{d\Sigma / d\Omega_{\acute{a}gua, 20^{\circ}C}}{I(0)_{\acute{a}gua, 20^{\circ}C}} \quad (3.14)$$

As correções realizadas utilizando a Equação 3.14 geram dados em escala absoluta de intensidade. Porém, neste trabalho, não são utilizados os mesmos capilares para aquisições das amostras e do fundo, o que gera um erro nos cálculos, pois os capilares podem apresentar diferentes espessuras de material que o compõe e de amostra. Esse erro é corrigido alterando os valores de transmitância.

Um exemplo dos dados antes e após a correção é apresentado na Figura 3.20. É possível observar que o pico de terceira ordem se torna mais proeminente após a redução dos dados, assim como as bases dos picos ficam mais bem definidas.

Esse procedimento é efetuado utilizando o software SUPERSAXS, desenvolvido pelo professor Dr Cristiano Luis Pinto de Oliveira¹ do Instituto de Física da Universidade de São Paulo. Após a realização da correção, os dados podem ser utilizados para análise.

3.4.3. Ajustes

Com os dados já tratados é possível utilizar os modelos propostos nas seções 2.4.2 e 2.4.3 para ajustá-los. Esses ajustes fornecem informações para a caracterização das fases lamelares, como organização tridimensional e estruturação das mesmas.

-

¹ Email para contato: crislpo@if.usp.br

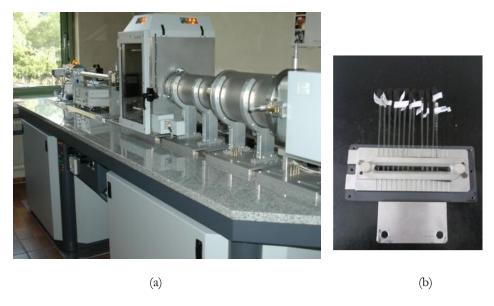


Figura 3.17. (a) Equipamento Nanostar – Bruker e (b) porta amostras para capilares.

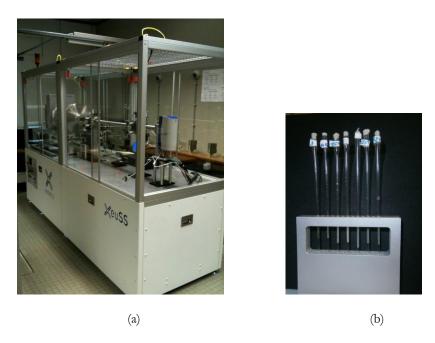


Figura 3.18. (a) Equipamento Xeuss – Xenocs e (b) porta amostras para capilares.

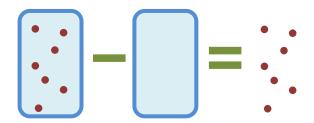


Figura 3.19. Representação esquemática do tratamento de dados de SAXS.

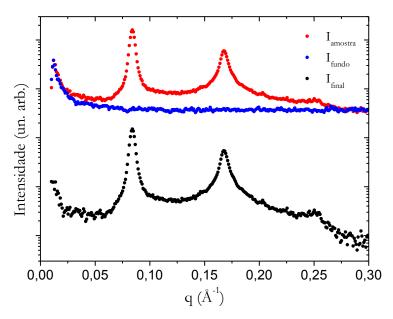


Figura 3.20. Exemplo de tratamento de dados de SAXS.

Os ajustes foram efetuados utilizando o método de mínimos quadrados e convergem para curvas muito próximas das obtidas experimentalmente. (Oliveira et al, 2012) Os ajustes efetuados utilizando os dois modelos para duas amostra são mostrados nas Figuras 3.21a e 3.21b.

É possível observar que os modelos descrevem bem as curvas experimentais, apesar de o modelo de gaussianas se mostrar mais adequado, principalmente para os sistemas lamelares mais diluídos. Isso ocorre porque o fator de forma utilizando gaussianas tem uma descrição mais suave das bicamadas, se aproximando mais da realidade. No entanto, o modelo de degraus possui menos parâmetros ajustáveis, o que torna a convergência do ajuste mais rápida.

A espessura da membrana e o parâmetro de Caillé são grandezas de relevante importância neste estudo. A espessura da membrana é determinada através do perfil de contraste de densidade eletrônica, que é obtido por meio do fator de forma das bicamadas, e o parâmetro de Caillé é obtido através do fator de estrutura. Foram realizados ajustes usando ambos os modelos para uma série de amostras de membrana composta por 70% de lecitina e 30% de simulsol, visando a comparação dos resultados obtidos para cada um deles. Os resultados são apresentados nas Figuras 3.22a e 3.22b.

Os valores obtidos com os ajustes utilizando cada um dos modelos não divergem significantemente, mantendo os mesmos comportamentos para os parâmetros. Isso mostra que ambos os modelos são equivalentes para a determinação dos parâmetros em questão.

Portanto, a escolha do modelo a ser utilizado deve levar em consideração a precisão desejada do perfil de contraste de densidade eletrônica e o número de parâmetros a serem ajustados.

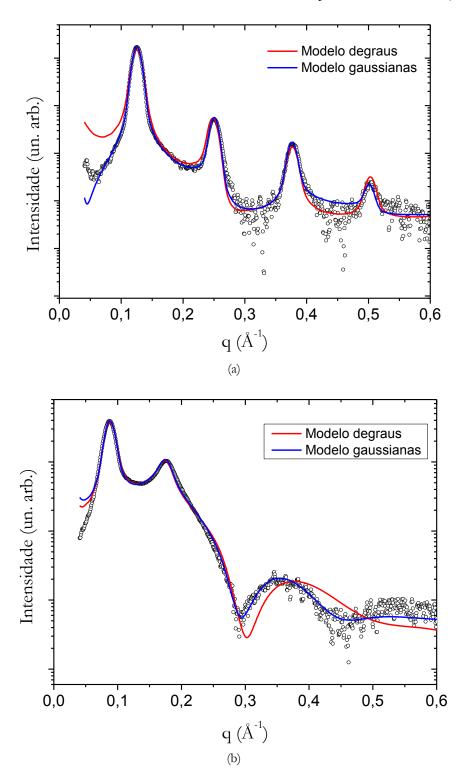


Figura 3.21. Curvas de SAXS com exemplos de ajustes para sistema lamelar (a) concentrado e (b) diluído.

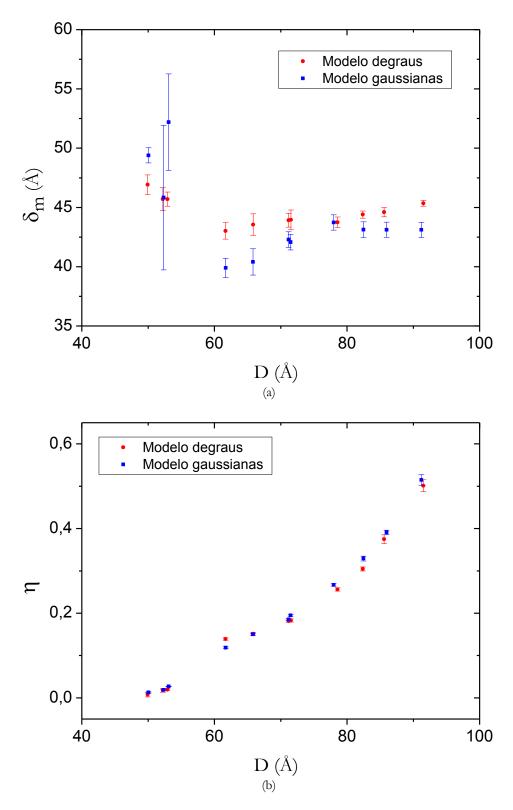


Figura 3.22. Comparação dos valores obtidos a partir dos ajustes utilizando ambos os modelos para (a) espessura das bicamadas e (b) parâmetro de Caillé.

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES

4.1. Estudo das Interações entre membranas

O estudo foi desenvolvido utilizando a técnica de SAXS como principal ferramenta para a obtenção de informações sobre as membranas lipídicas. Nas Figuras 4.1a e 4.1b é possível observar imagens típicas que são geradas pelo espalhamento de estruturas lamelares, e são conhecidas como difratogramas.

No difratograma da Figura 4.1a se vê a formação de anéis, e a intensidade de cada um deles é constante ao longo dos mesmos, o que indica que as bicamadas estão organizadas em todas as direções com igual probabilidade.

Na Figura 4.1b a intensidade dos anéis não são distribuídas uniformemente ao longo dos mesmos, o que sugere uma leve preferência de orientação das membranas. Essa orientação é causada pelo processo de centrifugação a que são submetidos os capilares, porém, caso a orientação não seja da amostra toda, como seria o caso de filmes orientados, os modelos utilizados continuam válidos.

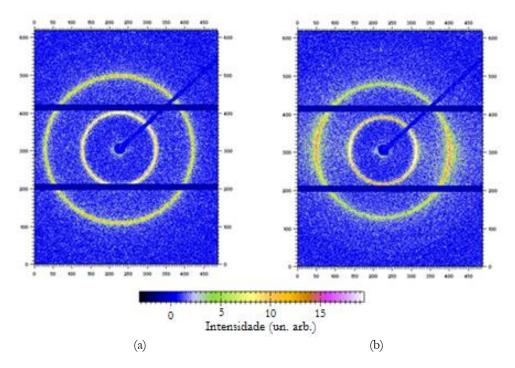


Figura 4.1. Difratogramas obtidos por experimentos de SAXS para membranas de lipídio em uma amostra (a) não orientada e (b) orientada.

Nesta etapa do trabalho foram realizados estudos para avaliar as interações entre membranas. Conforme descrito na seção 3.3.1, a mistura de lecitina e simulsol comercial é inserida em uma solução de polímero. Após a estabilização das amostras, as mesmas foram analisadas por SAXS.

As bicamadas foram preparadas em diversas composições, utilizando o Simulsol comercial, com tamanho dos grupos etoxilados polidisperso (em média igual a 10 monomeros). As soluções de polímero são preparadas em diferentes concentrações, para varrer diferentes regimes de hidratação da fase lamelar. O polímero utilizado para a preparação da solução depende do intervalo de valores de pressão que se deseja acessar, tomando-se o cuidado de que o diâmetro hidrodinâmico do polímero seja inferior a distância de separação entre as membranas.

Na Figura 4.2 são apresentadas as curvas de espalhamento obtidas dos experimentos de SAXS para três diferentes composições de membrana. Em cada conjunto de curvas o que está variando é a pressão osmótica exercida pelos polímeros em solução, sendo que a intensidade da pressão aumenta nas curvas de baixo para cima.

É possível observar que as curvas de intensidade em função do módulo do vetor de espalhamento apresentam ao menos dois picos. Quando se analisam os valores de q para os picos de uma mesma curva, vê-se que o valor da segunda ordem é o dobro do valor de q para o pico de primeira ordem, o que indica que o sistema é lamelar, conforme a relação descrita pela Equação 2.15.

Utilizando essa relação se pode determinar a periodicidade lamelar de cada uma das amostras. É possível verificar que na medida em que se aumenta a pressão, ou seja, quando se olha as curvas de baixo para cima, se observa que os valores de q dos picos de primeira ordem aumentam. Esse comportamento indica que a periodicidade lamelar está diminuindo quando a pressão aumenta. Considerando que a espessura da membrana não se altera substancialmente em comparação às variações na periodicidade lamelar, é possível concluir que o que está diminuindo é a distância de separação entre as membranas.

Após determinar a periodicidade lamelar de cada uma das amostras analisadas, e conhecendo-se a concentração inicial da solução de polímero em cada uma, realiza-se a correção na pressão, para obtenção da pressão efetiva exercida em cada sistema lamelar,

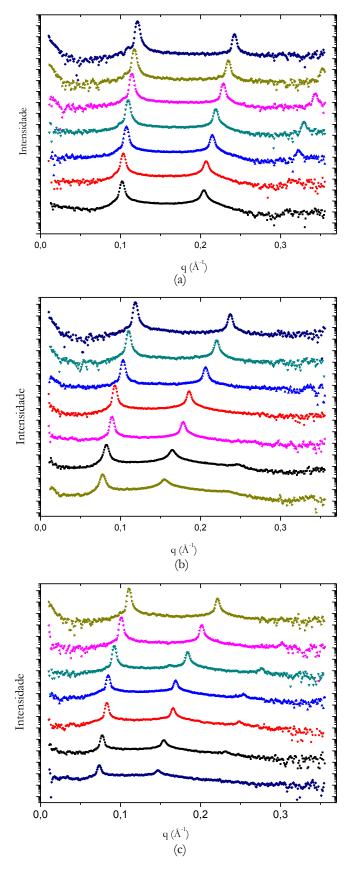


Figura 4.2. Difratogramas variando a pressão osmótica para composições de membrana com (a) 100% (b) 70% e (c) 30% de lecitina.

conforme descrito na seção 3.3.2, e assim é possível construir as curvas de pressão em função de D. Foram utilizadas duas curvas parametrizadas para a correção na pressão, utilizando as Equações 2.2 e 2.3. Os resultados são apresentados na Figura 4.3.

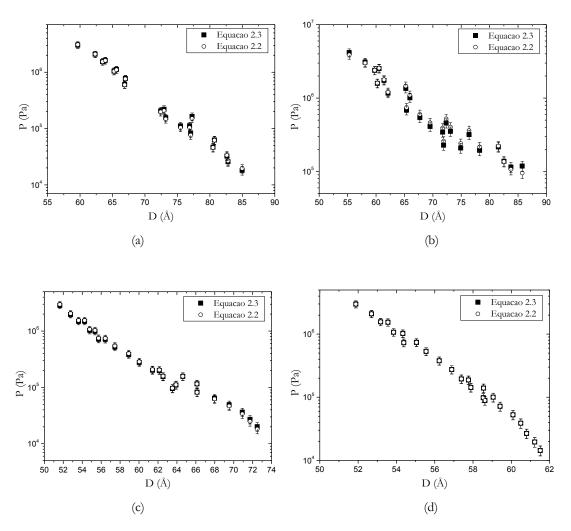


Figura 4.3. Comparação entre os métodos de correção de pressão para membranas compostas por (a) 10% (b) 50% (c) 90% e (d) 100% de lecitina.

Os resultados mostram que ambos os métodos de determinação da fração volumétrica de água presente na fase lamelar são equivalentes para a região de D acessível nestes experimentos, e fornecem valores muito próximos para a pressão osmótica efetiva. Portanto, é possível utilizar qualquer uma das duas curvas para efetuar as correções. Sendo assim, optou-se por usar o modelo geométrico, descrito pela Equação 2.2, que ajusta um pouco melhor os dados experimentais na região de interesse.

Após a realização das correções é possível construir as curvas da pressão osmótica efetiva exercida nas membranas em função da periodicidade lamelar. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.4, separados em dois grupos, para evidenciar a mudança no comportamento das curvas quando aumenta-se a quantidade de Simulsol incorporado a membrana. Para pequenos valores de D, observa-se que as curvas apresentam um decaimento exponencial para baixos valores de D, no entanto, no regime diluído, o comportamento das curvas passa a depender da quantidade de co-surfactante.

Para a membrana composta por lecitina pura, é possível observar que a curva tende a um valor constante de periodicidade lamelar limite, de aproximadamente 62 Å. A curva de pressão possui uma derivada negativa e tendendo a infinito nessa região. As curvas obtidas para as composições de membrana com 70% e 50% de lecitina, apresentam um comportamento bastante diferente, com mudança na concavidade e com derivada tendendo a zero, no regime diluído, isto é, quando P→0. Para um valor de pressão constante como 5.10⁵ Pa, por exemplo, observa-se um aumento na periodicidade lamelar quando se diminui a proporção de lecitina na membrana até 50%, indicando maior contribuição das interações repulsivas. Como o potencial de hidratação é de curto alcance, essa contribuição só pode resultar das flutuações nas bicamadas.

Diminuindo-se a quantidade de lecitina além de 50%, observa-se que as curvas passam novamente a ter um limite de diluição, e a contribuição da interação repulsiva volta a diminuir. Essa nova mudança pode estar associada à mudança de conformação das cadeias poliméricas na interface das bicamadas, que passam a ser estendidas, reduzindo novamente a flexibilidade da membrana, uma vez que as cadeias aumentam a espessura efetiva da membrana, como representado na Figura 4.5.

Para testar a reprodutibilidade dos experimentos foram preparadas duas séries independentes de amostras com a composição de 10% de lecitina, varrendo a linha de diluição Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 4.4c, e verifica-se que dentro da incerteza dos dados experimentais, há uma superposição razoável dos pontos experimentais.

Esses resultados podem ser comparados com as curvas teóricas que descrevem o comportamento esperado quando há uma mudança no balanço de interações atrativas e repulsivas entre membranas, como mostrado na Figura 2.5.

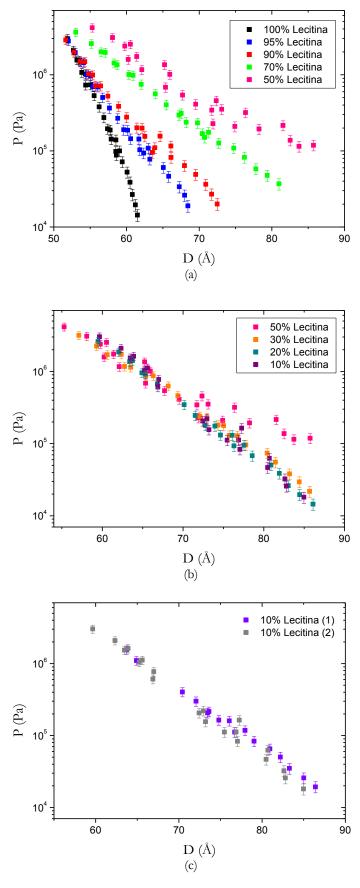


Figura 4.4. Curvas de pressão efetiva em função da periodicidade lamelar (a) para cada uma das composições de membrana, (b) para composições selecionadas e (c) para uma mesma membrana preparada em duplicata.

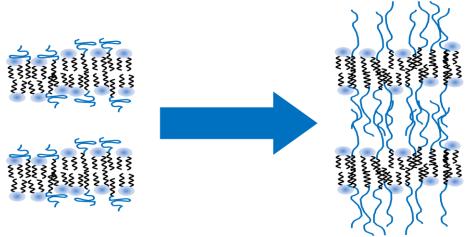


Figura 4.5. Representação esquemática da mudança de conformação das cadeias poliméricas na interface das bicamadas.

Modelos propostos para as interações entre membranas encontrados na literatura levam em conta a distância de separação entre as membranas e não a periodicidade lamelar (McIntosh; Magid; Simon, 1987; Podgornik; Parsegian, 1992; Petrache et al, 1998). Por esse motivo, foi necessário mudar a forma de apresentar os dados experimentais e para isso precisamos conhecer a espessura da membrana, que por sua vez pode ser obtida por diferentes métodos.

Uma primeira abordagem é considerar que a espessura da membrana é cosntante, no intervalo de diluição utilizado para o estudo das interações na fase lamelar, passando a depender apenas da composição da membrana. Na Figura 4.6 são comparados os valores obtidos por esses métodos; (i) contraste eletrônico, (ii) modelo geométrico (Equação 2.2) e (iii) curva de parametrização tangente hiperbólica (Equação 2.3).

Os valores de espessura de membrana fornecidos pelo contraste eletrônico foram obtidos por experimentos realizados previamente (Gerbelli, 2012), considerando-se para cada composição, o período lamelar correspondente. A espessura da membrana é um dos parâmetros que é obtido do ajuste das curvas de espalhamento utilizando o modelo de gaussianas para descrever o fator de forma. No intervalo de diluições das fases lamelares estudadas neste trabalho, pode-se considerar que, para uma dada composição de membrana, os valores de espessura de membrana são muito próximos, e por isso foi adotado o valor médio.

Os valores de espessura de membrana encontrados pelo modelo geométrico e pela curva parametrizada pela tangente hiperbólica são obtidos através do ajuste das curvas de diluição utilizando os modelos descritos pelas Equações 2.2 e 2.3, respectivamente, obtendo assim como parâmetro a espessura da membrana. Os ajustes foram efetuados para cada uma das

composições de membranas, porém, a curva da membrana composta por lecitina pura não pode ser ajustada pelo modelo da tangente hiperbólica.

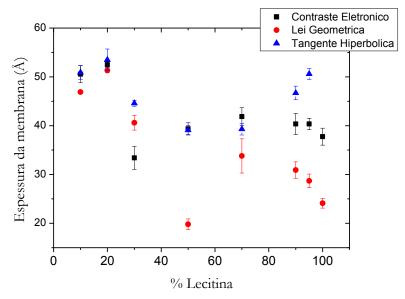


Figura 4.6. Comparação dos resultados obtidos para a espessura média da membrana para cada uma das composições.

Esses métodos fornecem valores bastante discrepantes, como pode ser visto na Figura 4.7, para a composição de 95% de lecitina. É possível observar que os valores para a distância de separação entre as membranas corrigidas pelo modelo da tangente hiperbólica estão subestimados e os obtidos pela lei geométrica estão superestimados. Os valores obtidos pelo ajuste da curva de espalhamento para cada amostra refletem o contraste eletrônico da bicamada e são mais realistas, portanto, esses valores serão adotados para a representação das curvas de pressão em função da distância de separação entre as membranas.

Invés de utilizar os valores já obtidos em experimentos anteriores seria possível também realizar os ajustes das curvas de espalhamento obtidos para as amostras em coexistência com a solução de polímero, o que demandaria mais tempo de análise dos dados, para eventualmente reproduzir os mesmos resultados. No entanto, para verificar essa hipótese, foi realizado o ajuste dos dados obtidos com as amostras submetidas à pressão osmótica, para a série de amostras com composição de 70% de lecitina. Os resultados obtidos são comparados com os resultados anteriores, de acordo com a Figura 4.8.

Nota-se que os resultados obtidos são muito próximos, e as variações podem ser justificadas por diferentes valores de partida para a realização do ajuste das curvas de

espalhamento. Portanto, passou-se a utilizar os valores que já haviam sido obtidos anteriormente para as todas as outras composições de amostra. Observa-se ainda que o comportamento dessa grandeza é praticamente linear, o que permite um ajuste para obtenção da distância de separação entre as membranas ponto a ponto, gerando valores mais precisos do que a média das espessuras. Assim, para cada composição de membrana, é possível obter o valor da espessura da camada aquosa, dado um valor de D.

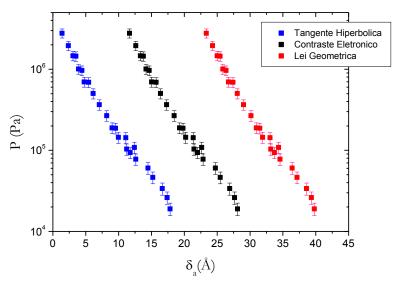


Figura 4.7. Comparação das curvas de pressão corrigidas com a espessura da membrana obtida por três métodos diferentes para a composição de 95% de Lecitina.

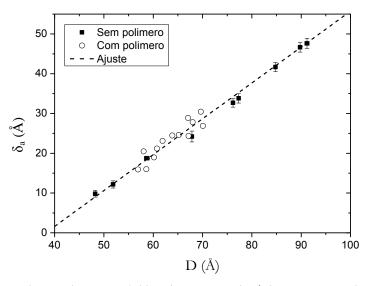


Figura 4.8. Espessura da camada aquosa obtida pelo contraste eletrônico para composição de 70% de lecitina.

As Figuras 4.9 mostram as curvas de pressão em função da distância de separação obtida ponto a ponto pelo método descrito acima, para cada uma das composições de membrana. Para melhor visualização, as curvas foram separadas em dois grupos, Figura 4.9a e Figura 4.9b,

para altas e baixas quantidades de lecitina, respectivamente, evidenciando as mudanças no comportamento das curvas.

Na região confinada, para pressões acima de 10⁶ Pa, observa-se que, para uma dada pressão, a incorporação do co-surfactante até 10%, resulta em diminuição da distância de separação. Nessa região, não se espera que as flutuações das membranas sejam predominantes, e o potencial efetivo deve-se ao balanço entre as forças de hidratação e de van der Waals. Esse resultado indica uma mudança no balanço entre essas duas interações, que pode ser devido ao aumento da interação atrativa, ou redução do potencial de hidratação, ou ambos.

No regime mais diluído, pressão inferior a 10⁵ Pa, a distância de separação aumenta com a inserção de simulsol para uma pressão constante, o que indica um aumento de interações repulsivas. Para as composições com até 70% de lecitina, quando P→0, parece haver um valor limite para a distância de separação, e esse valor aumenta com o aumento da quantidade de Simulsol.

Para a fase lamelar contendo 50% de lecitina, observa-se uma ligeira mudança no comportamento da curva. Não fica evidente se há um valor limite de separação entre as membranas, mas se ele existe, é muito maior do que para as composições anteriores. Esse resultado é compatível com a previsão de alguns modelos teóricos, de uma transição contínua, de um sistema de bicamadas ligado para um sistema não ligado, como ilustrado na Figura 2.5, quando o balanço entre as interações atrativas e repulsivas é alterado.

Para as curvas apresentadas na Figura 4.9b, para membranas mais ricas em simulsol, a evolução das curvas se altera novamente e a observa-se a existência de um limite para a separação entre as bicamadas. Para grandes quantidades de Simulsol, as curvas praticamente se sobrepõem, indicando que a partir de então não há grandes mudanças nas interações devido à inserção de simulsol.

Com as curvas de pressão em função da distância de separação, é possível utilizar o modelo proposto na literatura para as interações entre membranas. Para esse ajuste, é possível utilizar a expressão do potencial efetivo, dado pela Equação 2.6, e tem-se como parâmetros ajustáveis a constante de Hamaker, a amplitude e o alcance da força de hidratação e a constante de rigidez da membrana.

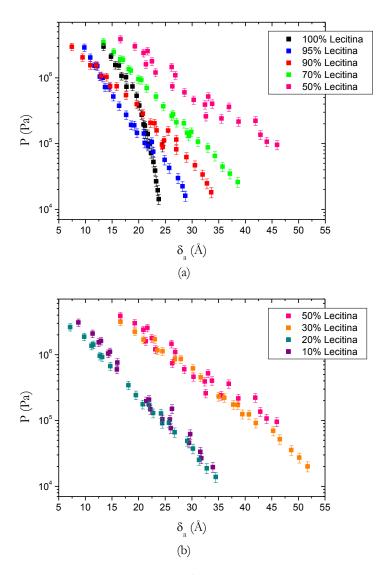


Figura 4.9. Curvas de pressão osmótica em função da distância de separação para (a) membranas com baixa e (b) alta proporção de simulsol.

Para uma membrana composta por lecitina pura é possível encontrar na literatura (Petrache, 1998; Harbich; Helfrich, 1984; McIntosh; Magid; Simon, 1989b; Petrache et al, 1998) valores estimados para esses parâmetros e utilizá-los como referência para realizar os ajustes. No entanto, a interação de van der Waals e o potencial estérico, devido às flutuações, possuem uma dependência com o inverso de δ_a^2 , e os parâmetros que governam essas interações (H e κ) podem variar em um grande intervalo, e ainda assim resultar em um bom ajuste dos dados experimentais.

Utilizando o método de mínimos quadrados para realizar os ajustes, percebe-se que o termo exponencial, proveniente das interações de hidratação, é dominante em relação aos outros dois, gerando erros de algumas ordens de grandeza para os parâmetros H e κ . Foram

realizados testes para a membrana composta por lecitina pura, e como os valores obtidos não são confiáveis, os ajustes utilizando essa equação foram abandonados, pois não é possível o ajuste de forma independente das interações de van der Waals e estéricas.

Uma solução para o problema foi o ajuste utilizando uma equação que simula o potencial efetivo. Inspirado no modelo anterior foi utilizada uma expressão para descrever a pressão, dada por uma forma geral segundo a Equação 4.1.

$$P(\delta_a) = P_h e^{-\delta_a/\lambda} + \frac{c}{\delta_a^3}$$
 (4.1)

De acordo com essa expressão, pode-se obter a intensidade do potencial de interação (V_h) por unidade de área, descrito pela Equação 4.2.

$$V_h = P_h \lambda \tag{4.2}$$

O coeficiente C representa um balanço entre o potencial atrativo de van der Waals e o potencial repulsivo de flutuação, proposto por Helfrich (1978), e pode ser expresso pela Equação 4.3.

$$C \approx \frac{\mu (k_B T)^2}{\kappa} - \frac{H}{6\pi} \tag{4.3}$$

Pode-se esperar que a mudança de um regime dominado pelas interações de van de Waals para um regime dominado por interações repulsivas, devido ás flutuações das membranas, seja acompanhado por uma mudança no sinal do coeficiente C; se as interações forem predominantemente repulsivas, C > 0, e se houver predominância do potencial atrativo, C < 0. As Figuras 4.10 mostram alguns ajustes utilizando a Equação 4.1.

Utilizando a Equação 4.1 é possível descrever de maneira satisfatória o conjunto de dados experimentais, e obter os parâmetros que caracterizam as interações para cada uma das composições de membrana. O comportamento desses parâmetros é ilustrado na Figura 4.11, em função da composição da membrana.

Nota-se que o potencial de hidratação (V_h) é igual a (8 ± 2) x 10^{-2} J/m², enquanto na literatura encontram-se valores que variam entre $2x10^{-4}$ a $2x10^{-1}$ J/m² (Rand et al, 1988; Petrache et al, 1998). A incorporação do co-surfactante à fase lamelar reduz o valor de V_h de uma ordem de grandeza, enquanto o alcance dessa interação aumenta bruscamente, para valores em torno de 5 Å.

De modo geral, nota-se que quando a quantidade de lecitina é em torno de 50%, ocorrem mudanças no comportamento de todos os parâmetros. Essa observação concorda com resultados anteriores (Gerbelli et al, 2013), que indicam que nessa concentração ocorre a mudança de conformação da cadeia polimérica hidrofílica, que passa da conformação enovelada (*mushroom*) para a conformação estendida (*brush*), conforme descrito anteriormente e representado na Figura 4.5.

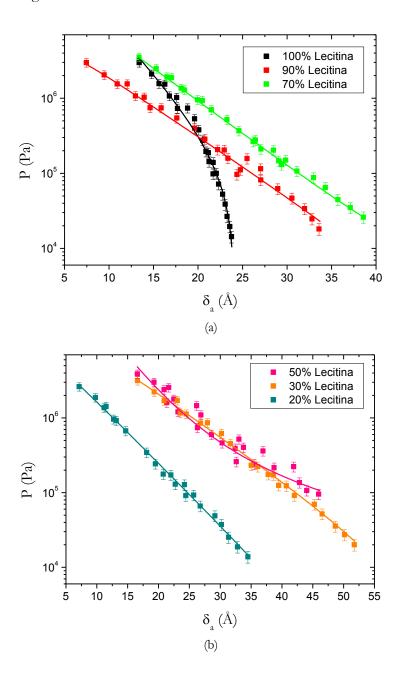


Figura 4.10. Ajustes das curvas de pressão em função da distância de separação para três composições de membrana com (a) baixa e (b).alta proporção de simulsol.

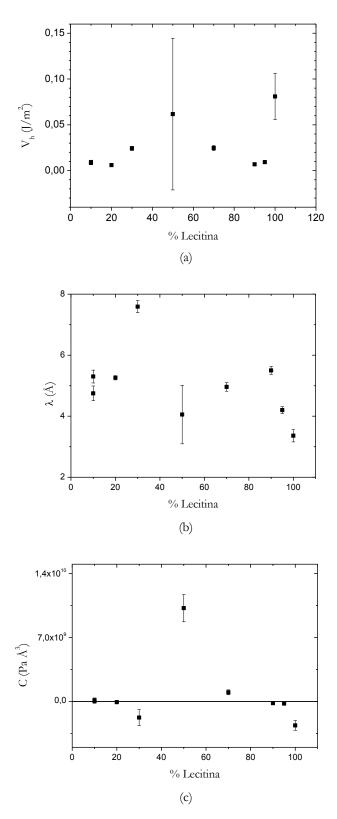


Figura 4.11. Comportamento dos parâmetros (a) V_h (b) B e (c) C da Equação 4.1 das curvas ajustadas para as diversas composições de membranas.

4.2. Caracterização da fase lamelar com cosurfactante monodisperso

4.2.1. Estudo estrutural

Nesta parte dos resultados são apresentados os experimentos realizados com membranas em solução aquosa, para efetuar a caracterização das mesmas utilizando o co-surfactante monodisperso. Foram preparadas diferentes composições de membrana variando a fração volumétrica de lipídio para cada uma delas, seguindo assim uma linha de diluição. Na Figura 4.12 é apresentada, como exemplo, a curva de espalhamento para uma amostra de membrana composta por 70% de lecitina e com fração volumétrica de lipídio de 0,8.

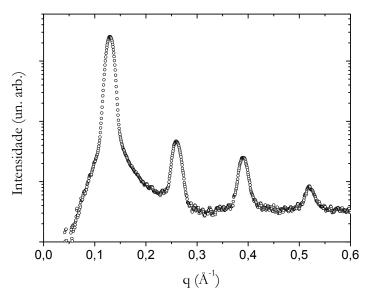


Figura 4.12. Difratograma obtido para uma membrana com 70% de lecitina.

A curva de espalhamento apresenta uma correlação entre os picos que é característica de uma fase lamelar, pois o valor de *q* no pico de primeira ordem é a metade do valor dessa grandeza para o pico de segunda ordem, um terço do valor do pico de terceira ordem, e assim sucessivamente até a quarta ordem, que é a máxima que pode ser observada.

A partir dos espectros de raios-x e utilizando a Equação 2.15 é possível obter o valor de *D* para cada amostra analisada, e assim construir um gráfico dessa grandeza em função do inverso da fração volumétrica de lipídio, ou seja, em função da hidratação do sistema. Na Figura 4.13 é apresentada a curva obtida para a membrana composta por 70% de lecitina em massa.

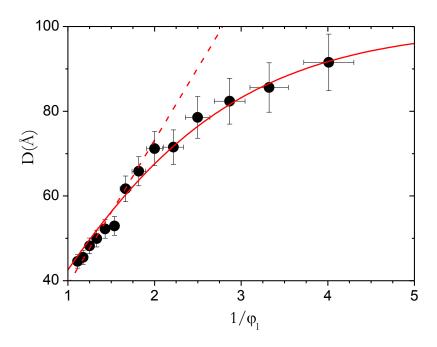


Figura 4.13. Ajuste da periodicidade lamelar em função do inverso da fração volumétrica de lipídio para uma membrana composta por 70% de lecitina.

A linha tracejada é obtida através do modelo de lei de diluição usual, descrito pela Equação 2.2. Observa-se que o comportamento dos dados experimentais não pode ser descrito por esse modelo, exceto em um pequeno intervalo onde as membranas estão confinadas e de baixa hidratação. Portanto, conforme já mencionado anteriormente, é necessário realizar o ajuste utilizando outro modelo.

Com o ajuste dos dados experimentais de D em função de $^{1}/_{\varphi_{l}}$ utilizando a Equação 2.3, representado pela curva contínua na Figura 4.13, obtém-se a espessura das membranas que compõem a fase lamelar, assim como o limite de diluição do sistema.

Outras composições de membranas foram preparadas e algumas amostras foram formuladas para seguir de diluição de cada uma delas. A Figura 4.14 mostra um gráfico da periodicidade lamelar em função do inverso da fração volumétrica dessas diferentes composições de membrana.

As curvas apresentam o mesmo comportamento global, que consiste em uma evolução linear até que se atinge um *plateau*. No entanto, observa-se que há um efeito causado pela inserção de co-surfactante na membrana. Para uma fração volumétrica constante, observa-se

que a periodicidade lamelar varia em função da composição da membrana, aumentando com o aumento da proporção de simulsol na mesma. Isso indica que o valor de D_{∞} , obtido por ajustes utilizando a Equação 2.3, aumenta com o aumento da quantidade de Simulsol na membrana, conforme mostrado no destaque da Figura 4.14.

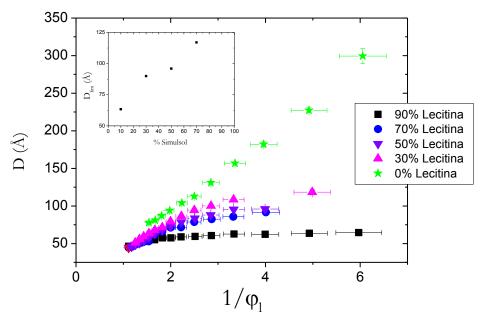


Figura 4.14. Periodicidade lamelar em função do inverso da fração volumétrica de lipídio e o limite de diluição para diferentes composições

Fazendo ajustes utilizando o modelo de degraus para o fator de forma das membranas de cada uma das curvas de intensidade obtidas pelo espalhamento de raios-x, obtém-se parâmetros estruturais das mesmas. Há especial interesse no parâmetro de Caillé, que está relacionado à flexibilidade da membrana, e na espessura da mesma. As Figuras 4.15a e 4.15b apresentam os resultados de η e δ_m para cada uma das amostras analisadas e assim, se pode observar uma tendência do comportamento desses parâmetros para cada composição.

Observa-se que o parâmetro de Caillé apresenta um crescimento exponencial para a membrana composta por 90% de lecitina. Em escala logarítmica, os dados podem ser descritos por uma única reta. No entanto, ao aumentar a quantidade de simulsol na membrana, como é o caso das misturas com 70% e 30% de lecitina, se torna evidente uma mudança no comportamento desse parâmetro, sendo que uma reta não é mais suficiente para descrever o comportamento de η, então se torna possível determinar duas regiões.

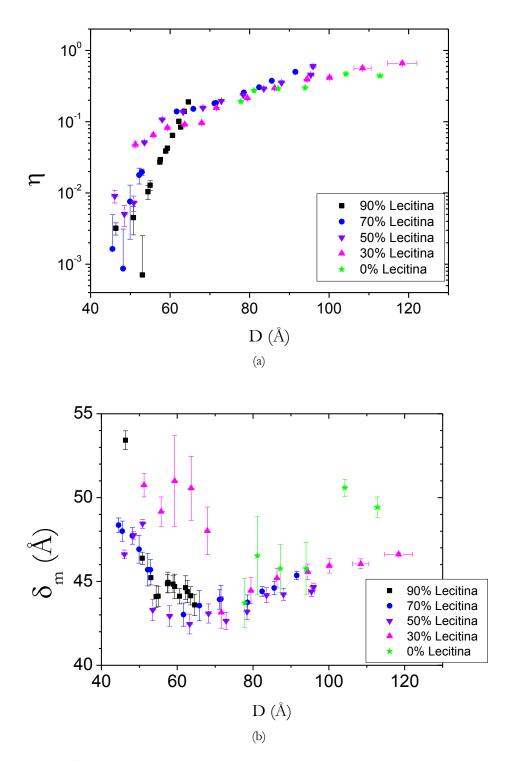


Figura 4.15. (a) Parâmetro de Caillé e (b) espessura da membrana em função da periodicidade lamelar para cada composição da mesma.

Ao aumentar ainda mais a proporção de Simulsol, como é o caso das bicamadas compostas por 30% e 0% de lecitina, se observa que o comportamento volta a ser único, porém, com valores maiores e inclinação menor em escala logarítmica, ou seja, se alcança a região que não era acessível para a membrana composta por 90% de lecitina.

Para as composições em que se observa uma mudança no comportamento de η , percebe-se que este fenômeno ocorre para D em torno de 60 Å, valor este que separa as duas regiões observadas. Para altos valores de D as membranas possuem grandes distâncias de separação e valores de η proporcionais aos de membranas com alta flexibilidade, indicando que as interações dominantes estão mudando. O aumento da quantidade de Simulsol permite o acesso às regiões não atingidas pelas membranas compostas apenas de lecitina (Gerbelli et al, 2013).

A mudança no comportamento do parâmetro de Caillé ilustra uma mudança no regime de interações entre as bicamadas, que se tornam mais flexíveis com o aumento da quantidade de Simulsol na membrana, indicado pelos valores de parâmetro de Caillé próximos de 1 e grandes distâncias de separação entre membranas.

Observando agora o comportamento das espessuras das membranas, nota-se que para valores grandes de D a espessura da membrana é praticamente constante, e começa a diminuir com a diminuição da periodicidade lamelar. Porém, essa grandeza passa a aumentar bruscamente ao atingir uma periodicidade lamelar em torno de 60 Å.

A mudança na espessura da membrana indica que há uma mudança na estrutura da mesma, na parte hidrofóbica, que é prevista por argumentos geométricos (Luzzati; Tardieu, 1974). Com o confinamento do sistema a camada aquosa diminui, fazendo com que a concentração na cadeia de polímeros presente no co-surfactante aumente. A variação na concentração gera mudanças na conformação dos polímeros da parte hidrofílica do simulsol, que passam de enovelados para estendidos, aumentando consideravelmente a espessura das mesmas (Gennes, 1980). O fenômeno de diminuição da espessura das bicamadas está relacionado ao aumento das interações repulsivas quando elas estão muito próximas.

É possível afirmar que as mudanças nos comportamentos do parâmetro de Caillé e da espessura da membrana ocorrem aproximadamente para os mesmos valores de *D*, o que indica que há uma relação entre os dois fenômenos.

4.2.2. Efeitos de temperatura

Resultados presentes na literatura indicam que além de variações na concentração, as variações de temperatura também geram mudanças na conformação do PEG, favorecendo uma conformação mais estendida (Wisniewska, 2013). Portanto, deve-se esperar que variações de temperatura na fase lamelar, onde o co-surfactante está presente, resulte em alterações na interface, devido a mudança de conformação das cadeias de PEG ligadas as moléculas de ácido graxo.

A investigação desse efeito foi realizada para duas composições de membrana, com 70% e 50% de lecitina. O efeito da variação de temperatura sobre a lei de diluição e sobre o parâmetro de Caillé é ilustrado na Figura 4.16, para essas duas composições.

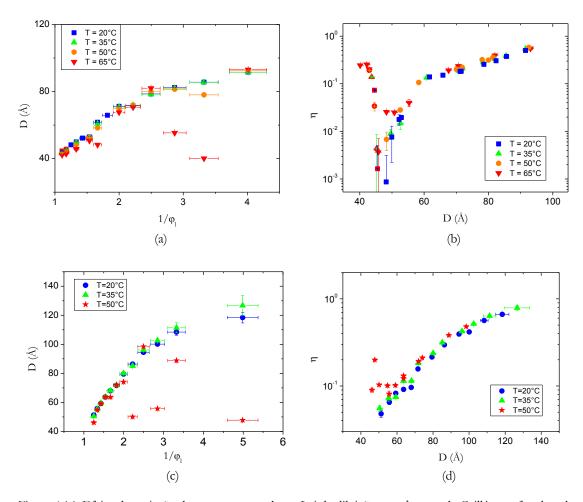


Figura 4.16. Efeito de variação da temperatura sobre a Lei de diluição e parâmetro de Caillé para fase lamelar composta de (a) e (b) 70% de Lecitina e (c) e (d) 50% de Lecitina.

Na Figura 4.16a é possível observar a evolução da linha de diluição de membranas compostas por 70% de lecitina, em função da temperatura. Verifica-se que as alterações no período lamelar começam a ocorrer apenas para temperaturas acima de 50°C, onde D começa a diminuir para o regime diluído, fazendo com que o limite de diluição também diminua. Ao mesmo tempo, o parâmetro de Caillé aumenta, indicando aumento da flexibilidade da membrana. Efeito semelhante é observado para a composição mais rica em Simulsol, sendo que o aumento do parâmetro de Caillé é menos acentuado.

Para a composição com 70% de lecitina supomos que as cadeias de PEG estejam na configuração enovelada e o aumento de temperatura deve promover configuração mais estendida. A observação de que o período lamelar diminui só é compatível se admitirmos que as cadeias passam a fazer parte da bicamada, o que reduz também a adsorção de água. Se isso ocorre, poderíamos esperar que o módulo de compressibilidade (B) seja bastante reduzido, o que contribuiria para o aumento do parâmetro de Caillé, (proporcional a B^{-1/2}). Esse efeito é mais apreciável na membrana onde a configuração inicial é enovelada, do que para a composição contendo 50% de co-surfactante, para a qual a configuração inicial é preferencialmente estendida.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram estudados os efeitos da inserção de ácidos graxos etoxilados em bicamadas fosfolipídicas, com enfoque na investigação do balanço de interações entre as membranas, assim como a obtenção de parâmetros estruturais e elásticos que caracterizam a fase lamelar.

Estudos prévios foram realizados para a caracterização das membranas utilizando o cosurfactante com cadeias poliméricas de tamanho variado (Gerbelli, 2012; Gerbelli et al, 2013). Esses estudos revelaram o potencial da metodologia utilizada para obtenção de informações sobre a organização espacial da estrutura lamelar, através de mudança sistemática da composição da mesma e ajustes diretos das curvas experimentais de SAXS.

Esses mesmos sistemas foram utilizados neste estudo para investigar as interações entre as membranas e os efeitos causados pela variação na composição. Tal abordagem experimental coloca em evidência mudanças no balanço das interações. Os experimentos foram realizados acessando diferentes regiões de pressão osmótica, permitindo a investigação de regimes diluídos, especialmente para as membranas ricas em Simulsol.

Os resultados obtidos para uma membrana composta por lecitina pura reproduzem satisfatoriamente os dados que são encontrados na literatura (McIntosh; Magid; Simon, 1987; Petrache et al, 1998). Com esta metodologia é possível o acesso experimental ao potencial efetivo de interações entre as membranas, e este pode ser comparado aos modelos teóricos.

Com a introdução do co-surfactante ocorrem mudanças na flexibilidade da membrana, tornando acessível um regime onde as interações repulsivas de longo alcance, devido às flutuações térmicas, são relevantes. A mudança na flexibilidade da membrana permite um estudo da contribuição dessa grandeza no balanço de interações entre bicamadas. Verificou-se que a inserção deste altera, também, de maneira significativa a intensidade do potencial repulsivo de hidratação, assim como o alcance dessa interação.

A incorporação de simulsol até uma composição de 50% de lecitina em massa nas membranas confere maior flexibilidade às mesmas. Esse efeito é observado pelo aumento na distância de separação no equilíbrio entre as membranas, ao aumentar a quantidade de simulsol para uma pressão constante. Esse comportamento é confirmado pelo parâmetro C, que descreve o balanço entre as interações atrativas e repulsivas de longo alcance. O valor do

parâmetro aumenta, passando de negativo para positivo. Esse fenômeno se deve à inserção de cadeias alifáticas simples à região interna das bicamadas.

A partir dessa composição de membrana, ao aumentar a quantidade de simulsol, há uma mudança na conformação dos polímeros da região hidrofílica, que passam de uma organização enovelada para estendida. Sendo assim, o parâmetro C volta a ser negativo, indicando um aumento na rigidez das bicamadas, assim como a distância entre elas no equilíbrio tende a diminuir para pressões constantes.

As previsões teóricas (Lipowsky; Leibler, 1986; Podgornik; Parsegian, 1992) sugerem uma transição contínua do sistema ligado, onde as membranas interagem, para um sistema não ligado, onde há um aumento do potencial devido às flutuações térmicas, e os resultados experimentais demonstram a possibilidade dessa transição de segunda ordem.

No entanto, esses trabalhos não apresentam uma função analítica que possa ser utilizada para ajustar os dados experimentais, fornecendo os parâmetros que caracterizam as interações. Portanto, a proposta de um modelo simplificado para a curva de pressão permite obter parâmetros que fornecem indícios sobre o balanço das interações entre as membranas.

É importante notar que não foram encontrados resultados experimentais na literatura que ilustrassem a previsão teórica dessa transição, sendo que este trabalho apresenta as primeiras evidências experimentais desse comportamento. A metodologia aplicada neste trabalho permite o acesso a regiões de pressão que não eram acessíveis em trabalhos anteriores, o que mostra um regime diferente e quantidade maior de dados, trazendo mais precisão aos resultados obtidos.

A segunda etapa consistiu na caracterização de fases lamelares utilizando um co-surfactante com o tamanho controlado dos polímeros da parte hidrofílica. Esse sistema possui um regime monofásico, diferentemente dos estudos com o simulsol polidisperso (Gerbelli, 2012) em que se observou uma coexistência de fases lamelares para determinadas composições de membranas.

O uso de um co-surfactante mais bem caracterizado, do ponto de vista da composição, permite um maior controle da interface da membrana, pois o tamanho das cadeias poliméricas é conhecido e maior do que a média do co-surfactante polidisperso, fornecendo dados mais claros e com maior precisão.

Os resultados mostraram que as observações anteriores são compatíveis, utilizando-se ambos os co-surfactantes. O limite de diluição da fase lamelar aumenta com o aumento da proporção de simulsol, como é o caso do limite de diluição maior que 100Å para membranas com 30% de lecitina, até que esse limite não é mais observado para membranas compostas puramente por simulsol.

Além disso, o comportamento do parâmetro de Caillé apresenta dois regimes com crescimento exponencial, sendo que a inserção do co-surfactante nas bicamadas possibilita o acesso a esse novo regime, que não era acessível para membranas com mais de 70% de lecitina. As distintas regiões do parâmetro de Caillé estão relacionadas a distintos regimes de interação, sendo que as mudanças ocorrem para periodicidades lamelares em torno de 70Å.

Também são observadas mudanças no comportamento da espessura das membranas em torno de 70Å, que corresponde às mudanças no comportamento do parâmetro de Caillé. Observa-se que no regime confinado há um aumento dessa grandeza, ou seja, ao confinar as membranas, há uma mudança na conformação dos polímeros presentes na região hidrofílica dos co-surfactantes, que ficam estendidos. Esse fenômeno acontece pelo aumento na concentração relativa de polímero e representa uma mudança no domínio de interações entre as membranas.

Apesar de a concentração dos polímeros se mostrar um parâmetro importante para a mudança na conformação dos polímeros, verificou-se que há indícios de que a temperatura também desenvolve um papel importante nesse fenômeno. Apesar de os resultados não mostrarem uma evolução contínua, uma transição ocorre para uma determinada temperatura, e essa aumenta com o incremento da quantidade de simulsol nas bicamadas. Portanto, a temperatura constitui um segundo parâmetro que pode ser utilizado para alterar as propriedades elásticas da membrana.

Em suma, observa-se que o comportamento global dos parâmetros estruturais e elásticos das bicamadas não se modifica ao inserir co-surfactantes monodispersos ou polidispersos. Além disso, os resultados obtidos para as interações entre membranas corroboram com as observações realizadas na caracterização, onde se identificam mudanças na flexibilidade das membranas e conformações das cadeias poliméricas.

Por mais que a inserção de simulsol aumente a flexibilidade da parte hidrofóbica das bicamadas, pela inserção de ácidos graxos de cadeia carbônica única, essas membranas com espessura maior apresentam uma distância de separação menor do que membranas com simulsol em conformação enovelada e mesma periodicidade lamelar. No regime confinado, esse efeito corresponde a uma limitação para as flutuações das membranas, pois pode haver interpenetração das cadeias poliméricas, fazendo com que as membranas fiquem mais rígidas.

Ainda que se observe um aumento nos valores do parâmetro de Caillé com a inserção de simulsol, essa taxa de crescimento é menor quando a quantidade de co-surfactante é grande. Esse fenômeno se deve à interpenetração das membranas, pois há uma redução do espaço disponível entre as bicamadas.

Os modelos teóricos para as interações entre as membranas tornam difícil a comparação das previsões com modelos reais, pois quando se trabalha com os resultados experimentais, a incorporação do simulsol à membrana altera não apenas a constante de rigidez da mesma, mas é possível que altere também a constante de Hamaker, pois a composição das bicamadas está sendo modificada. Essas modificações simultâneas em parâmetros diversos não são consideradas nesses trabalhos.

Uma possível maneira de contornar esse problema seria trabalhar com membranas sob pressão osmótica em diferentes temperaturas, alterando possivelmente apenas o módulo de rigidez das mesmas, mantendo a constante de Hamaker fixa.

Se faz necessário, agora, um aprofundamento da análise dos parâmetros determinados nos ajustes, procurando obter parâmetros que caracterizem os potenciais de interação, e em que momento as flutuações das membranas passam a ter um papel predominante nas interações.

Um modelo que descreva precisamente o potencial de interação entre as membranas daria acesso ao modulo de compressibilidade da fase lamelar, que associado ao parâmetro de Caillé fornece medidas quantitativas do módulo de rigidez das membranas.

Outras possíveis modificações para o sistema seriam utilizar outros tamanhos de polímeros na parte hidrofílica do simulsol, avaliando o efeito que esse comprimento exerce nos parâmetros estudados. Além disso, o efeito das cadeias carbônicas também poderia ser estudado, utilizando moléculas com mais ou menos insaturações e cadeias carbônicas de diferentes comprimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. G. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, p. 199-225, 1998.
- BARBOSA, L. R. S. Estudo de sistemas de relevância biológica por espalhamento de raios-X a baixos ângulos. 2008. 226 f. Tese (Doutorado em Física) Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. *Dynamic Light Scattering*: With Applications to Chemistry, Biology and Physics. Nova York: Dover, 2000, 376 p.
- BROWN, W. Light Scattering: Principles and development. Oxford: Clarendon, 1996, 528 p.
- CAILLÉ, A. Physique Cristalline Remarques sur la diffusion des rayons X dans les smetiques A. C. R. Acad. Sc., B 724, p. 891-893, 1972.
- ENOKI, T. A. Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos. 19/11/2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Física) Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- EVANS, E.; RAWICZ, W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. Physical Review Letters, v. 64, n. 17, p. 2094-2097, 1990.
- FARAUDO, J.; BRESME, F. Origin of the short-range, strong repulsive force between ionic surfactant layers. *Physical Review Letters*, v. 94, p. 077802, 2005.
- FAUCON, J. F. Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, v. 50, n. 17, p. 2389-2414, 1989.
- FEIGIN, L. A.; SVERGUN, D. I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. New York: Plenum Press, 1987. 335 p.
- FRUHWIRTH, T. et al. Structure and order in lamellar phases determined by small-anlge scattering. *J. Appl. Cryst.*, 37, p. 703-710, 2004.
- GENNES, P. G. Conformations of polymers Attached to an Interface. *Macromolecules*, v. 13, n. 5, p. 1069-1075, 1980.
- GERBELLI, B. B. *Propriedades estruturais e elásticas de fases lamelares:* O efeito da composição da membrana. 2011. 146 f. Dissertação (Mestrado em Física) Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- GERBELLI, B. B. et al. Steric-Induced Effects on Stabilizing a Lamellar Structure. Langmuir, v. 29, n. 45, p. 13717–13722, 2013.
- GLATTER, O.; KRATKY, O. Small Angle X-Ray Scattering. London: Academic Press, 1982.

- GOLUBOVIC, L.; LUBENSKY, T. C. Smectic elastic constants of lamellar fluid phases: Crumpling effects. *Physical Review B*, v. 39, n. 16, p. 12110-12133, 1989.
- HAAF, F.; SANNER, A.; STRAUB, F. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses. *Polymer Journal*, v. 17, n. 1, p. 143-152, 1985.
- HARBICH, W.; HELFRICH, W. The swelling of egg lecithin in water. *Chem. Phys. Lip.*, v. 36, n. 1, p. 39-63, 1984.
- HELFRICH, W. Steric Interaction of Fluid Membranes in Multilayer Systems. Z. Naturforsch, 33a, p. 305-315, 1978.
- HULL, M. C.; SAUER, D. B.; HOVIS, J. S. Influence of lipid chemistry on the osmotic response of cell membranes: effect of non-bilayer forming lipids. *J. Phys. Chem. B*, v. 108, n. 40, p. 15890-15895, 2004.
- HUSSON, F.; MUSTACCHI, H.; LUZZATI, V. Entropic forces between amphiphilic surfaces in liquids. *Acta Crystallographica*, v. 13, n. 8, p. 668-677, 1960.
- ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and Surface Forces. 3. ed. Califórnia: Elsevier, 2011. 706 p.
- ISRAELACHVILI, J. N.; WENNERSTROEM, H. Entropic forces between amphiphilic surfaces in liquids. *J. Phys. Chem.*, v. 96, n. 2, p. 520-531, 1992.
- JONES, R. A. L. Soft Condensed Matter. New York: Oxford University Press, 2002. 209 p.
- KLAJNERT, B. et al. DSC studies on interactions between low molecular mass peptide dendrimers and model lipid membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 327, p. 145-152, 2006.
- KORLACH, J. et al. Characterization of lipid bilayers phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, p. 8461-8466, 1999.
- LINDNER, P. Scattering Experiments: Experimental Aspects, Initial Data Reduction and Absolute Calibration. In: LINDNER, P.; ZEMB, T. (Eds.) *Neutrons, X-Rays and Light*: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 22-48.
- LIPOWSKY, R.; LEIBLER, S. Unbinding Transitions of Interacting Membranes. *Physical Review Letters*, v. 56, n. 23, p. 2541-2544, 1986.
- LUZZATI, V.; TARDIEU, A. Lipid phases: structure and structural transition. *Annual Review of Physical Chemistry*, 25, p. 79-94, 1974.
- MALCHAREK, S. et al. Multilayered structures in lipid monolayers films containing surfactant pritein C: effects of cholesterol and POPE. *Biophys. J.*, v. 88, n. 4, 2005.
- MANCIU, M.; RUCKENSTEIN, E. The polarization model for hydration/double layer interactions: the role of the electrolyte ions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 112, n. 1-3, p. 109-128, 2004.

- MCINTOSH, T. J.; MAGID, A. D.; SIMON, S. A. Steric Repulsion between Phosphatidylcholine Bilayers. *Biochemistry*, v. 26, n. 23, p. 7325-7332, 1987.
- MCINTOSH, T. J.; MAGID, A. D.; SIMON, S. A. Cholesterol modifies the short-range repulsive interactions between phosphatidylcoline membranes. *Biochemistry*, v. 28, n. 1, p. 17-25, 1989a.
- MCINTOSH, T. J.; MAGID, A. D.; SIMON, S. A. Range of the solvation pressure between lipid membranes: dependence on the packing density of solvent molecules. *Biochemistry*, v. 28, n. 19, p. 7904-7912, 1989b.
- MCINTOSH, T. J.; SIMON, S. A. Hydration Force and Bilayer Deformation: A Reevaluation. *Biochemistry*, v. 25, n. 14, p. 4058-4066, 1986.
- MILNER, S. T.; ROUX, D. Flory theory of the unbinding transition. *Journal de Physique I*, n. 9, p. 1741-1754, 1992.
- MYERS, D. Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications. 2. Ed. New York: Wiley-VCH, 1999
- NALLET, F.; LAVERSANNE, R.; ROUX, D. Modelling X-ray or neutron scattering spectra of lyotropic lamellar phases: interplay between form and structure factors. *Journal de Physique II*, n. 4, p. 487-502, 1993.
- NINHAM, B. W. On progress in forces since the DLVO theory. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 83, n. 1, p. 1-17, 1999.
- OLIVEIRA, C. L. P. Estudos de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos por Sistemas Biológicos: Teoria e Aplicações. 28/04/2005. 283 f. Tese (Doutorado em Física) Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- OLIVEIRA, C. L. P. et al. Gaussian deconvolution: a useful method for a form-free modeling of scattering data from mono- and multilayered planar systems. *Applied Crystallography*, 45, p. 1278-1286, 2012.
- PABST, G. Global properties of biomimetic membranes: perspectives on molecular features. Biophysical Reviews and Letters, v. 1, n. 1, p. 57-84, 2006
- PABST, G. et al. Structural analysis of weakly ordered membrane stacks. *Journal of Applied Crystallography*, 36, p. 1378- 1388, 2003.
- PAN, J.; TRISTAM-NAGLE, J.; NAGLE, J. Effects of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. Physical Review E, v. 80, p. 021931, 2009.
- PARSEGIAN, V. A.; FULLER, N.; RAND, R. P. Measured work of deformation of lecithin bilayers. *PNAS*, v. 76, p. 2750-2754, 1979.

- PEDERSEN, J. S. Modelling of Small-Angle Scattering Data from Colloids and Polymers Systems. In: LINDNER, P.; ZEMB, T. (Eds.) *Neutrons, X-Rays and Light*: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 391-420.
- PETRACHE, H. I. Structure and interactions of fluid phospholipid bilayers measured by high resolution x ray scattering. 24/08/1998. 109 f. Tese (Doutorado em Física) Departamento de Física, Universidade Carnegie Mellon, 1998.
- PETRACHE, H. I. et al. Interbilayer interactions from high-resolution x-ray scattering. *Physical Review E*, v. 57, n. 6, p. 7014-7024, 1998.
- PETRACHE, H. I. et al. Salt screening and specific ion adsorption determine neutral-lipid membrane interactions. *PNAS*, v. 103, n. 21, p. 7982- 7987, 2006.
- PODGORNIK, R.; PARSEGIAN, A. Thermal-Mechanical Flutuations of Fluid Membranes in Confined Geometries: The Case of Soft Confinement. *Langmuir*, v. 8, n. 2, p. 557- 562, 1992.
- RAND, R. P. et al. Variation in hydration forces between neutral phospholipid bilayers: evidence for hydration attraction. *Biochemistry*, 27, p. 7711-7722, 1988.
- ROUX, D.; SAFINYA, C.; NALLET, F. Lyotropic Lamellar Lα Phases. In: GERBART, W. M.; BEN-SCHAUL, A.; ROUX, D. (Eds.) *Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers*. New York: Springer-Verlag, 1994. p. 303-346.
- SACKMANN, E. Thermo-elasticity and adhesion as regulators of cell membranes architecture and function. *J. Phys.: Condens. Matter*, 18, p. R785-R825, 2006.
- SERVUSS, R. M.; HELFRICH, W. Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *Journal de Physique*, v. 50, n. 7, p. 809- 827, 1989.
- SILVA, J. C. Estudo de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução usando espalhamento de raio-X. 26/02/2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Física) Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- SCHMIDT, M; BURCHARD, W. Translational Diffusion and Hydrodynamic Radius of Unperturbed Flexible Chains. *Macromolecules*, 14, p. 210-211, 1981.
- SCHNEIDER, M. B.; JENKINS, J. T.; WEBB, W. W. Thermal fluctuations of large cylindrical phospholipid vesicles. *Biophysical Journal*, v. 45, p. 891-899, 1984.
- SCHURTENBERG, P. Static Properties of Polymers. In: LINDNER, P.; ZEMB, T. (Eds.) Neutrons, X-Rays and Light: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 259-298.
- SIDDHANTA, A.; SHIELDS, D. Secretory vesicle budding from the trans-golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 29, p. 17995-17998, 1998.

- STRANCAR, J.; SENTJURE, M.; SCHARA, M. Fast and Accurate Characterization of Biological Membranes by EPR Spectral Simulations on Nitroxides. *Journal of Magnetic Resonance*, 142, p. 254-265, 2000.
- TAKAHASHI, H.; SINODA, K.; HATTA, I. Effects of cholesterol on the lamellar and the inverted hexagonal phases of dielaidoylphosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1289, n. 2, p. 209-216, 1996.
- VINK, H. Precision Measurements of Osmotic Pressure in Concentrated Polymer Solutions. *European Polymer Journal*, 7, p. 1411- 1419, 1971.
- WANG, W.; YANG, L.; HUANG, H. W. Evidence of Cholesterol Accumulated in High Curvature Regions: Implication to the Curvature Elastic Energy for Lipid Mixtures. *Biophysical Journal*, v. 92, n. 8, p. 2819-2830, 2007.
- WISNIEWSKA, M. et al. Temperature effect on the adsorption equilibrium at the silica-polyethylene glycol solution interface. *Fluid Phase Equilibria*, 360, p. 10-15, 2013.
- WURGER, A. Bending Elasticity of Sur4factant Films: The Role of Hydrophobic Tails. *Phys. Rev. Lett.*, v. 85, n. 2, p. 337-340, 2000.
- ZHANG, R. T.; SUTER, R. M.; NAGLE, J. F. Theory of the structure factor of lipid bilayers. *Phys. Rev. E.*, 50, p. 5047-5060, 1994.