UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**INTERAÇÕES ENTRE BICAMADAS LIPÍDICAS
E INTERFACES HIDROFÓBICAS**

Edla Moraes de Abreu Pereira

Tese de Doutorado

ORIENTADORA: Ana Maria Carmona-Ribeiro

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biocolóides
do Departamento de Bioquímica do IQUSP

SÃO PAULO
2003

“Interações entre bicamadas lipídicas e interfaces hidrofóbicas”

EDLA MORAES DE ABREU PEREIRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. ANA MARIA CARMONA RIBEIRO
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ – USP

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ – USP

Profa. Dra. LIA QUEIROZ DO AMARAL
IF – USP

Prof. Dr. OSVALDO NOVAES DE OLIVEIRA JUNIOR
IFSC – USP

SÃO PAULO
28 DE NOVEMBRO 2003.

À memória de minha mãe

Agradecimentos

À Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pelo convite para fazer uns “cálculos” no Laboratório (início de tudo), pela orientação, apoio e incentivo.

À Prof^a Denise F. Siqueira Petri, pela colaboração, pelas discussões e apoio.

Ao Dirceu e aos meus filhos Marcelo e Maurício pela compreensão e incentivo.

Aos colegas do Laboratório, que decisivamente contribuíram para realização desse trabalho: Claudia, Débora, Fábio, Felipe, Luis Fernando, Renata Rapuano e Sergio.

Ao Felipe M. Correia pela grande ajuda na digitação da Tese.

À FAPESP, CNPq pelo apoio ao trabalho, através de auxílio à pesquisa no laboratório.

Ao Instituto de Química da USP pelas facilidades oferecidas.

Índice

<i>Índice de figuras</i>	3
<i>Índice de tabelas</i>	7
<i>Lista de abreviações</i>	8
<i>Resumo</i>	9
<i>Abstract</i>	10
1 Introdução	11
1.1 Apresentação	11
1.2 Auto-associação de moléculas anfífilas	13
1.3 Agregados supramoleculares	13
1.3.1 Fatores determinantes da auto-associação de anfífilos	13
1.3.2 Tipos de agregados	15
1.3.2.1 Monocamadas	17
1.3.2.2 Bicamadas planas	18
1.3.2.3 Lipossomos ou vesículas	20
1.3.2.4 Membranas-modelo	22
1.3.2.5 Membranas suportadas	23
1.4 Adsorção de membranas em superfícies	25
1.4.1 Aspectos físico-químicos da adsorção em superfícies	25
1.4.2 Aspectos bio-tecnológicos	30
1.5 Força de interação entre e inter-membranas	33
1.5.1 Forças entre partículas	34
1.5.1.1 Forças de van der Waals	34
1.5.1.2 Efeito do meio na energia de interação de van der Waals	35
1.5.1.3 Cálculo das forças de atração de van der Waals entre partículas com camadas adsorvidas	37
1.5.1.4 Interações elétricas	38
1.5.1.5 Sobreposição de duplas-camadas e repulsão entre partículas	41
1.5.1.6 Soma das forças de atração de van der Waals e repulsão eletrostática: Teoria DLVO ...	42
1.6 Tensão superficial e ângulo de contato	44
1.7 Látex	49
1.8 Métodos utilizados - Princípios	51
1.8.1 Elipsometria	51
1.8.1.1 Reflexão na interface plana entre dois meios isotrópicos	52
1.8.1.2 Reflexão e transmissão por um sistema de múltiplas interfaces	54
1.8.2 Mobilidade eletroforética – potencial-Zeta	58
1.8.3 Espalhamento de luz	63
1.8.3.1 Espalhamento de Rayleigh	64
1.8.3.2 Medidas de tamanho médio de partículas, através de espalhamento dinâmico de luz ...	65
2 Materiais e métodos	70
2.1 Reagentes e materiais	70
2.2 Equipamentos	71
2.3 Métodos experimentais:	75
2.3.1 Preparação dos filmes poliméricos	75
2.3.2 Preparação de dispersões fosfolipídicas e sintéticas	75

2.4	Métodos analíticos para determinação das concentrações de PC, DHP, DODAX ..	77
2.4.1	Determinação da concentração de PC e DHP por dosagem de fósforo inorgânico.....	77
2.4.2	Determinação da concentração de DODAB e DODAC por microtitulação	77
2.4.3	Determinação da concentração de DODAAc	78
2.5	Determinação de isothermas de adsorção.....	78
2.6	Determinação de espessura de camada adsorvida, por elipsometria ex situ e in situ	78
2.7	Medidas de ângulo de contato.....	81
2.8	Medidas de tensão superficial	81
2.9	Determinação de tamanho e potencial-Zeta das partículas	82
3	Resultados e discussão.....	84
3.1	Adsorção de lipídios sintéticos e fosfolipídios em filmes poliméricos e interface ar-água.....	84
3.1.1	Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).....	84
3.1.2	Dihexadecilfosfato de sódio (DHP)	87
3.1.3	Fosfatidilcolina (PC)	90
3.1.4	Efeito de sal sobre cinéticas de adsorção de DODAB sobre filmes poliméricos por elipsometria in-situ.	93
3.1.5	Efeito de sal e do método de dispersão de DODAB sobre cinéticas de decaimento de tensão superficial na interface ar-água.	96
3.2	Adsorção de sais de dioctadecildimetilamônio (DODAX) sobre partículas de poliestireno sulfato e sobre a interface ar-água.....	99
3.2.1	Efeitos de [DODAX] e [NaCl] sobre tamanho, D_z , de partículas de PSS	99
3.2.2	Efeito de método de dispersão de DODAX, [DODAX] e [NaCl] sobre a tensão superficial na interface ar-água.....	105
4	Conclusões	109
5	Referências bibliográficas.....	112

Índice de Figuras

<i>Figura 1-1 Apresenta algumas das estruturas formadas pela auto-associação de moléculas anfifílicas.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 1-2a Três principais classes de fosfolipídios contendo colinas. Em fosfatidilcolinas (lecitinas), uma ponte glicerol de 3 carbonos liga-se a 2 longas cadeias de ácidos graxos com um agrupamento fosforil colina; por convenção os ácidos graxos ocupam as posições 1 e 2 da ponte glicerol, enquanto a cabeça polar está na posição 3. Esfingomielina consiste de uma única cadeia de ácido graxo conjugada via uma ligação amida ao nitrogênio da esfingosina, a qual é novamente ligada ao fosforil colina. A parte lipídica sem a cabeça polar é conhecida como ceramida. Cadeias hidrocarbônicas também podem ser ligadas à ponte glicerol via ligações éter como no terceiro caso de lipídios fosfocolinas.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 1-2b Alguns fosfolipídios fosfatidil.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 1-3 Possíveis resultados da interação entre partículas sólidas e vesículas de bicamada</i>	<i>24</i>
<i>Figura 1-4 Representações de uma interface entre as fases α e β</i>	<i>27</i>
<i>Figura 1-5 Processo de floculação tratado como uma reação pseudoquímica. As linhas sólidas indicam as partículas da fase dispersa, e as linhas pontilhadas as partículas de solvente. No caso (a) as partículas dispersas são do mesmo material, e no caso (b), de materiais diferentes.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 1-6 Definição de termos para o cálculo de energias de atração de van der Waals.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 1-7. Representação de perfil de potencial eletrostático de duas superfícies planas de mesma carga separadas por uma distância d.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 1-8 Perfil esquemático de uma curva de energia total de interação entre partículas esféricas em função da distância de separação entre as partículas.</i>	<i>44</i>
<i>Figuras 1-9 Componentes da Tensão Interfaciais necessários para a dedução da equação de Young.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 1-10 A- poliestireno; B- hidrocloreto de azobisisobutiramidina, ABA. 2HCL (1,2-azo-bis-(2-metilpropamidina)dicloreto.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 1-11 Reflexão e transmissão de uma onda plana entre dois meios semi-infinitos 0 e 1. Φ_0 e Φ_1 são os ângulos de reflexão e refração respectivamente. p e s são os eixos paralelo e perpendicular ao plano de incidência, respectivamente. A direção de propagação é definida pelo produto vetorial de vetores unitários na direção de p e s ($\mathbf{p} \times \mathbf{s}$).....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 1-12 Reflexão e transmissão de uma onda plana por um sistema de múltiplas interfaces. Meio ambiente (0)- filme (1)- substrato (2), com bordas paralelas ao plano. d1 é a espessura do filme, Φ_0 é o ângulo de incidência no meio 0 e Φ_1, Φ_2 são os ângulos de refração, respectivamente.....</i>	<i>55</i>

<i>Figura 1-13 Representação esquemática de uma dupla camada difusa</i>	<i>59</i>
<i>Figura 1-14 Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica, segundo a teoria de Stern.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 1-15 Sistema ótico utilizado na medição do potencial Zeta.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 1-16 Esquema PALS</i>	<i>62</i>
<i>Figura 1-17 Arranjo experimental básico utilizado em experimentos de espalhamento de luz</i>	<i>64</i>
<i>Figura 1-18 Intensidade (I_0) de luz espalhada por uma partícula esférica pequena ($a \ll \lambda$) localizada na origem O, em função do ângulo de espalhamento (teoria de Rayleigh). As distâncias da origem às linhas i,ii e iii representam as intensidades relativas da componente polarizada verticalmente, horizontalmente, e a luz espalhada total, respectivamente.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 1-19. Flutuações de luz espalhada</i>	<i>66</i>
<i>Figura 1-20 (A) Representação gráfica de Distribuição Log-normal de diâmetros de partículas. (B) Distribuição multimodal de diâmetros (MSD), seguida de uma tabela com os tamanhos e os respectivos pesos.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 2-1 Representação esquemática de um Elipsômetro Automatizado.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 2-3 Estrutura molecular da fosfatidilcolina, PC.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 2-4 Estrutura molecular de DODAB e DHP.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 2-5 Representação esquemática de um sistema de multicamadas, com propriedades óticas previamente determinadas para obtenção de espessura média em ar da camada de DODAB.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 3-1 Representação esquemática de um sistema de multicamadas formado por: chapa de silício- polímero- lipídio, com propriedades óticas previamente determinadas para obtenção de espessura média em ar (ex situ) da camada de DODAB</i>	<i>84</i>
<i>Figura 3-2 Espessura d da camada adsorvida de DODAB sobre filmes de PSS em ar, em função da concentração de DODAB. Em (a) temos o filme de PSS revestido rotacionalmente sobre chapas de SiO₂/Si. Em (b) o filme é revestido sobre chapas de silício silanizadas (TMCS). A linha tracejada representa o valor da espessura teórica para deposição de uma monocamada de DODAB. Do lado direito representamos o esquema de multicamadas.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 3-3 Efeito de concentração de vesículas (DODAB) sobre a molhabilidade do filme de PSS a partir de medidas de ângulo de contato de avanço e recesso.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 3-4 A espessura d, da camada adsorvida de DHP sobre filmes de PSA, em ar como função da concentração de DHP. Em (a), o filme de PSA é revestido sobre chapas de SiO₂/Si. Em (b) a chapa de silício é silanizada (TMCS). A linha tracejada representa o valor teórico da espessura de uma monocamada de DHP. Ao lado está representado o esquema de multicamadas, d, de $2,5 \pm 0.2$ nm (fig. 3.1.3), a qual coincide com a espessura média de DODAB adsorvida sobre PSS sem silano e com a espessura teórica calculada para uma monocamada de DODAB.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 3-5 Isotermas para adsorção de DHP de pequenas vesículas (sonicadas) de DHP (95 nm de diâmetro) sobre microesferas de PSA (diâmetro médio de 190 nm) em</i>	

água a 25 ° C. A linha tracejada representa o valor teórico de espessura para uma única bicamada. Ao lado está representado o esquema da partícula recoberta 89

Figura 3-6 A espessura d , da camada adsorvida de PC sobre filmes de PSA em ar, em função da concentração do lipídio. Em (a) o filme é revestido sobre chapas de SiO₂/Si. Em (b), a chapa de silício está silanizada. Em (a), a linha tracejada representa o valor teórico da espessura de uma monocamada de PC. Em (b) a linha tracejada representa a mudança do valor de espessura teórica de uma bicamada a uma monocamada de PC. Ao lado está o esquema de multicamadas 90

Figura 3-7 Isotermas de adsorção de fosfatidilcolina (PC) a partir de vesículas (diâmetro médio de 62 nm) sobre microesferas de PSA (diâmetro médio de 76 nm) em água, a 25°C, como previamente publicado por Carmona-Ribeiro and Herrington, 1993. O patamar alcançado é consistente com a deposição em máxima adsorção de 3 monocamadas de PC. Ao lado está a representação esquemática da partícula de PSA recoberta com 3 monocamadas, isto é, 1 monocamada mais 1 bicamada. 92

Figura 3-8 Resultados de espessura A em mg/m² equivalente a d em nm, obtidos da cinética ex situ do filme de poliestireno em água pura e em 3 diferentes concentrações de NaCl após adicionar vesículas de DODAB a uma concentração final de 0.2 mM. (A) filme puro de PSS em água, em (B), (C) e (D), filme de poliestireno em contato com dispersões de DODAB e NaCl. 93

Figura 3-9 Medidas elipsométricas in situ de espessura d em função do tempo para filmes de PSS, após adicionar vesículas de DODAB 0.18 mM em água (A), 0.1 mM NaCl (B), ou 50 mM NaCl (C). 94

Figura 3-10 Medidas elipsométricas in situ da espessura d como uma função da raiz quadrada do tempo para filmes de PSS, após adição de vesículas de DODAB em água (A), de 0.1 mM NaCl nas dispersões de DODAB (B), ou 50 mM NaCl adicionados (C). As linhas sólidas nos estágios iniciais, indicam a dependência linear com raiz de t , onde o coeficiente angular representa o coeficiente D de difusão, em cm² s⁻¹. 96

Figura 3-11 Tensão superficial na interface ar-água como função do tempo, de diluições 0.2 mM de DODAB em água a soluções de NaCl em concentrações finais iguais a 0 (■), 7 (●), 25 (▲) e 50 mM de NaCl (▼). 97

Figura 3-12 Modelo representando a hipótese dos defeitos hidrofóbicos. Com o sal NaCl adicionado às vesículas de DODAB, apareceriam na bicamada defeitos hidrofóbicos causando efeitos de fusão, como (1) fusão intervesicular, (2) fusão de vesícula com a interface ar-água, e (3) fusão com a superfície polimérica 99

Figura 3-13 Efeito de concentração de vesículas e/ou fragmentos de sais de DODA sobre tamanho de partículas, $D(z)$, em função do tempo, após adicionar 0.05 (□), 0.1 (○), 0.2 (△), 0.4 (▽), 0.6 (◇), 0.8 (◁) e 1.0 mM (▷) de lipídios em 2x10¹¹ partículas de PSS / mL 100

Figura 3-14 Efeito de sal NaCl sobre tamanho (Dz) como uma função de tempo, após 24 horas de interação das partículas com dispersões de DODAX obtidas por sonicação, seguida da adição de 0.05 (□), 0.5 (○) e 5.0 mM NaCl (△) em misturas DODAX/PSS nas concentrações: (A) 0.2 mM DODAB, (B) 0.8 mM DODAB; (C) 0.2 mM DODAC, (D) 0.8 mM DODAC; (E) 0.05 mM DODAAc e (F) 0.8 mM DODAAc... 101

Figura 3-15 Esquema de fragmentos de DODAX sobre partículas em água e após adição de sal. 102

Figura 3-16 Distribuição de tamanho para misturas DODAX BF / PSS em 0.04 mM DODAX e 2.10 11partículas PSS / ml, após 24 de interação de interação, antes(A,B,C) e após adição de 5 mM de NaCl (A',B',C'). X representa os contra-íons empregados os quais foram brometo (A), cloreto(B) e acetato(C). 104

Tabela 5..... 105

Figura 3-17– Efeito do sal sobre a cinética de tensão superficial para dispersões de DODAX0.2 mM: DODAB (A), DODAC (B), DODAAc (C). As concentrações de sal foram:0 (■), 1.0 (○), 2 (▲), 10 (▼), 20 (△) e 50 mM (◁)..... 106

Figura 3-18 A: Efeito do método de preparação de bicamada sobre tensão superficial γ na interface ar-água em função do tempo, após adicionar 2.0 mM de NaCl em 0.2 mM de fragmentos de DODAB, BF, (▲) e vesículas grandes, LV,(□). B: Efeito de sal sobre a cinética de γ para 0.2 mM de fragmentos de DODAB (vesículas sonicadas) ,em uma faixa de concentração de NaCL: 0 (■), 1.0 (○), 2 (Δ), 10 (∇), 20 (△) e 50 mM (◁) 107

Figura 3-19 Cinéticas de tensão superficial na interface ar-água para vesículas inteiras (vortexadas) de DODAX 0.2 mM preparadas em água, após adição de 50 mM de NaCl, em presença de partículas(○) 2×10^{11} part./ml e na ausência delas (□)... 108

Índice de Tabelas

Tabela 1 Forma de empacotamento de lipídios e estruturas formadas por estes lipídios [Israelachvili, 1992].....	16
Tabela 2 Propriedades de microesferas de poliestireno sulfato (PSS) e poliestireno amidina (PSA) em água antes de serem usadas no preparo de filmes poliméricos. Partículas de PSA usadas para obter isoterma de adsorção para DHP são indicadas por (*).	71
Tabela 3 Efeito de lipídios sobre a molhabilidade de filmes poliméricos, os quais foram obtidos por revestimento rotacional de polímeros (PSS e PSA) solubilizados em tolueno a uma concentração final de 8 mg/ml sobre chapas de silício com e sem TMCS.....	92
Tabela 4 Diâmetro médio (Dz) em nm e potencial-zeta (ζ) em mV para partículas de poliestireno sulfato em presença de fragmentos de bicamada de DODAX em diferentes concentrações de NaCl e de DODAX. Cada mistura contém 2×10^{11} partículas/mL de poliestireno sulfato (PSS). O tempo de interação entre bicamadas e partículas foi de 24 horas. * T.E.M. significa microscopia eletrônica de transmissão ** SL significa espalhamento de luz.	103
Tabela 5 Diâmetros médios e potenciais-zeta de partículas de PSS em presença de fragmentos de bicamadas de DODAX em condições de estequiometria de áreas (0.04 mM DODAX e 2×10^{11} partículas/ml).As partículas e vesículas interagiram por 24 horas e após isso foi adicionado sal 0.5 mM	105

Lista de abreviações e símbolos

AFM	Microscópio de força atômica
BF	Fragmentos de bicamada
C.C.	Condições de contorno
D	Espessura de filme determinada por elipsometria
DHP	Di-hexadecilfosfato de Sódio
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DODAAC	Acetato de Dioctadecildimetilamônio
DODAB	Brometo de Dioctadecildimetilamônio
DODAC	Cloreto de Dioctadecildimetilamônio
DODAX	Sais de Dioctadecildimetilamônio, onde X= Cl ⁻ , Br ⁻ , AAc ⁻
D_z	Diâmetro médio de partícula polimérica obtido por espalhamento de luz
LS	Espalhamento de luz
LV	Vesículas grandes
PC	Fosfatidilcolina
PSA	Poliestireno amidina
PSS	Poliestireno sulfato
TEM	Microscópio de força eletrônica
TMCS	Trimetilclorosilano
Γ	Tensão superficial
Z	Potencial-zeta
Θ	Ângulo de contato

Resumo

Determinações de tensão superficial(γ) na interface ar-água e espessuras médias elipsométricas in situ (d), foram usadas para estudar as interações entre dispersões de lípides (em forma de bicamadas) e filmes de poliestireno sulfato produzidos por revestimento rotacional sobre placas de óxido de silício. A adição de NaCl para uma concentração final de 50 mM em uma dispersão de 0.2 mM de lipídeo catiônico sintético produziu instantaneamente uma camada de 6 nm de espessura que permaneceu estável com o tempo, indicando uma cinética de adsorção muito rápida, determinada possivelmente, pela atração hidrofóbica entre defeitos sobre a bicamada, induzidos pelo sal, e a superfície do filme. Contudo, em água a adsorção de DODAB cresceu monotonicamente alcançando no máximo uma espessura de 1.6- 1.8 nm (após 15 horas de interação) em função do tempo, a qual não foi consistente com deposição de bicamada. Nos estágios iniciais em água pura, a adsorção do anfifílico aumentou linearmente com a raiz quadrada do tempo, mostrando um processo controlado por difusão de vesículas, com coeficiente de difusão(D), aproximadamente igual a $1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ em boa aproximação com valores determinados para vesículas de outros lípides por outros autores. Medidas elipsométricas sob o ar (ex- situ) de adsorção de DODAB, DHP e PC foram difíceis de realizar devido ao aumento da espessura média do filme polimérico durante o ciclo de lavagem e secagem. Na faixa de concentração de 0.1- 1.0 mM o filme adsorvido de DODAB em ar foi mais hidrofóbico (ângulo de contato de avanço $\theta_A = 84^\circ \pm 3^\circ$) do que aquele para o filme puro de polímero ($\theta_A = 71^\circ \pm 4^\circ$). Nenhum efeito do filme de DHP sobre a molhabilidade do filme de PSA foi observado, apenas um aumento de rugosidade revelado pela mudança em $\Delta\theta$ de 2° para 11° (tabela 3). Filmes planos de PSA são hidrofóbicos($\theta_A = 86^\circ \pm 5^\circ$). Após interação com PC, as superfícies tornam-se menos hidrofóbicas($\theta_A = 75^\circ \pm 3^\circ$). A tensão superficial em ar-água para uma dispersão lipídica em água pura diminuiu rapidamente sob adição de sal (7-50 mM de NaCl), sugerindo a ocorrência de fusão de vesículas, induzida por sal, com a interface ar-água. O estudo da interação entre sais de DODA e partículas poliméricas por medidas de tamanho e potencial-zeta das partículas permitiu observar deposição de bicamadas otimizada por adição de sal a baixas concentrações(0.05-5.0 mM NaCl).

Abstract

Determinations of surface tension (γ) at the air—water interface, contact angles (θ), and in and ex-situ ellipsometric mean thickness (d) were used to study the interaction between dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) small vesicles and spin-coated polystyrene sulfate (PSS) films on silicon wafers. Upon the addition of NaCl (50 mM final concentration) to a 0.2 mM DODAB dispersion, adsorption from vesicles on PSS films immediately yielded a DODAB layer 6.0 nm thick which remained stable as a function of time. However, in water, in situ DODAB adsorption monotonically increased reaching at most 1.6—1.8 nm as a function of time (from 15 mm of interaction), which were not values consistent with bilayer deposition. At early stages in pure water, DODAB adsorption linearly increased with the square root of time, indicating a vesicle diffusion controlled process with ca. $1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ as the vesicle diffusion coefficient (D) in nice agreement with reported D for similar vesicles. In contrast, adding 50 mM salt, resulted in a very fast adsorption kinetics determined by the hydrophobic attraction between salt-induced defects on the bilayer and the film surface. Ex situ measurements of DODAB, DHP and PC adsorption were difficult because wetting/drying cycles of the polymeric films increased its mean thickness. From 0.1 up to 1.0 mM DODAB, the adsorbed film in air was more hydrophobic (advancing contact angle, $\theta_A = 84 \pm 3^\circ$) than the bare PSS film ($\theta_A = 71 \pm 4^\circ$). No effect of DHP film on the wettability of PSA film could be observed, just a increase of roughness revealed by the change of $\Delta\theta$ from 2° to 11° (table 3). Pure PSA films are hydrophobic, as revealed by the mean advancing angle $\theta_A = 86 \pm 5^\circ$. After interaction with PC, the surfaces turn less hydrophobic with a mean $\theta_A = 75 \pm 3^\circ$. Air-water surface tension for a DODAB dispersion in pure water rapidly decreased upon salt addition (7-50 mM NaCl), suggesting salt-induced vesicle fusion with the air—water interface occurred, in nice agreement with salt-induced vesicle fusion at the hydrophobic polymer-water surface. The investigation of the interaction between DODA salts and polymeric particles from diameter and zeta-potential measurements, allowed us to detect bilayer deposition optimized by salt addition in low concentration (0.05-5.0 mM NaCl).

1 Introdução

1.1 Apresentação

O objetivo deste trabalho é estudar a interação entre bicamadas sintéticas ou fosfolipídicas e interfaces hidrofóbicas.

Membranas de bicamada depositadas sobre superfícies sólidas são de interesse prático e científico por diversas razões. Elas permitem a biofuncionalização de sólidos inorgânicos (semicondutores, superfícies recobertas com ouro, etc) e materiais poliméricos. Elas fornecem um meio ambiente natural para a imobilização de proteínas sob condições não-denaturantes e em uma direção bem definida. Elas permitem a preparação de camadas ultrafinas, de alta resistência elétrica sobre condutores e a incorporação de receptores dentro destes isolantes para projetos de biosensores. Além disso, a imobilização dessas bicamadas sobre superfícies planas, constitui membranas-modelo, que podem ser usadas para entender o fenômeno de auto-organização de moléculas nas interfaces e as forças intermoleculares envolvidas na interação com as superfícies.

Bicamadas depositadas separadas da superfície sólida por camadas de água de espessura nanométrica ou polímeros maleáveis em forma de filmes finos, mantêm as propriedades termodinâmicas e estruturais das bicamadas livres [Sackmann, 1996]. Isto permite a aplicação de várias técnicas sensíveis à superfície, como: Elipsometria, Espalhamento Quase-elástico de Luz (QELS), Espectroscopia Plasmon de Superfície, Ressonância Magnética Nuclear (NMR) entre outras, para o estudo de deposição.

A interação de bicamadas com superfícies sólidas ainda é um fenômeno pouco conhecido, seja no que diz respeito aos diversos modos de auto-organização na interface, quanto no que se refere às forças intermoleculares envolvidas na interação. Na primeira parte desse trabalho(seção3-1), são investigados arranjos moleculares lipídicos provenientes de dispersões aquosas dos anfílicos DODAB, DHP e PC sobre filmes planos poliméricos, preparados sobre chapas de silício por revestimento rotacional("spin coating"). A escolha desses lípides está associado ao fato de serem anfílicos formadores de vesículas de bicamada, sendo por isto utilizados a pelo menos duas décadas, em muitas aplicações[Carmona-Ribeiro,1992,2001],além de apresentarem outras importantes propriedades tais como: serem altamente carregadas em água, no

rígido estado gel em temperatura ambiente e apresentarem uma interface mais uniforme que outros colóides, permitindo com isso sua aplicação como colóides modelo para testar teorias [Carmona-Ribeiro, 1989; Carmona-Ribeiro et al., 1991]. A estratégia consiste primeiramente em medidas de espessura de filmes lipídicos secos em ar, resultantes da interação dos filmes poliméricos com dispersões aquosas dos três lipídios acima, através da técnica de elipsometria *ex situ*, a qual apresentou dificuldades devido ao aparecimento de rugosidades no filme polimérico durante o processo de lavagem e secagem. Porém, com as medidas de ângulo de contato das superfícies adsorvidas, obtidas através do método da gota sésil, foi possível fazer uma interpretação estrutural para cada par lipídio/filme polimérico.

A partir dos resultados obtidos, resolvemos observar a interação de DODAB com filmes de poliestireno sulfato de carga oposta (seção 3-1), medindo dinamicamente espessuras, através da técnica elipsometria *in situ*. A cinética de adsorção foi feita depois da estabilização de espessura do filme polimérico em água. Além disso, foram feitas medidas de tensão superficial na interface ar-água da dispersão lipídica na presença de sal (NaCl), medidas de molhabilidade(ângulo de contacto) dos filmes poliméricos antes e após interação com DODAB.

A segunda parte do trabalho(seção 3-2), consiste na investigação da interação entre as bicamadas-modelo, representadas por sais de DODA com os contra-íons: brometo, cloreto e acetato e partículas de poliestireno sulfato, representando as superfícies hidrofóbicas. Para estimar essa interação foram feitas medidas de tamanho, D_z (diâmetro) em função da concentração de lípidos ao longo do tempo, através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, usando o efeito de correlação, e medidas de potencial zeta, ζ determinadas por mobilidade eletroforética das partículas de poliestireno na presença de dispersões de DODAX, nas diversas concentrações. O efeito de pouco sal (0.05 – 5.0 mM NaCl) no tamanho e potencial foi observado. Também foram feitas cinéticas de tensão superficial para os sais de DODA na presença de NaCl. Finalmente, foi investigada a interação dos sais de DODA e partículas sob a especial condição de equivalência entre áreas superficiais totais de partículas e bicamadas, em água e em presença de pouco sal.

1.2 Auto-associação de moléculas anfifílicas

A associação de lipídios em bem definidas estruturas como micelas e vesículas de bicamadas derivam da interação hidrofóbica entre caudas hidrocarbônicas, a qual induz as moléculas a se reunirem, e da natureza hidrofílica dos grupos cabeça, que impõe a condição a estes de permanecerem em contato com a água. Estes dois efeitos concorrem para gerar a idéia de duas forças opostas: uma tendendo a diminuir e a outra a aumentar a área do grupo cabeça em contato com a água. Estas interações levam ao conceito de uma **área superficial ótima** por grupo cabeça, na qual a energia livre total de interação por molécula lipídica é um mínimo. (Israelachvili. et al., 1977).

1.3 Agregados Supramoleculares

1.3.1 Fatores determinantes da auto-associação de anfifílicos

Do ponto de vista termodinâmico, a interação hidrofóbica é que dirige a formação e estabilização de agregados anfifílicos. O efeito hidrofóbico é de natureza entrópica, permitindo uma maior organização das moléculas anfifílicas em forma de agregados, às custas de um aumento da entropia da água. Esta interação promove uma minimização do contato entre as cadeias hidrocarbônicas e a água (solvente).

Outros fatores, tais como forças de van der Waals e pontes de hidrogênio, têm efeito estabilizante menor sobre o agregado, quando comparados com a interação hidrofóbica.

Figura 1-1 Apresenta algumas das estruturas formadas pela auto-associação de moléculas anfifílicas

A forma e o tamanho do agregado podem mudar em consequência de variações da solução como, composição, temperatura, força iônica e pH (Gennis, 1889; Evans e Wennerström, 1994).

As membranas celulares, as bicamadas, as micelas e as fases hexagonais invertidas, são exemplos de agregados supramoleculares (fig. 1-1).

Devido às dimensões desses sistemas estarem na faixa de partículas coloidais (1nm- 1µm), do fato de serem formados por agregação de moléculas e de estarem dispersos em um meio diferente(por exemplo, meio aquoso), além de apresentarem uma grande relação área-volume, é adequado supor tais sistemas como sendo formados por duas fases: a fase difusa(colóide) e o meio de dispersão(solvente) separados por uma interface bem definida(Evans e Wennerström, 1994). Por isso é que, a grande maioria das propriedades físico-químicas desses agregados é explicada segundo a Química de Colóides e Superfícies.

Considerações geométricas podem ser aplicadas para estabelecer as possíveis estruturas. Estas dependem da área superficial ótima e do volume da cadeia hidrocarbônica, e são limitados pelo máximo comprimento que as cadeias hidrocarbônicas possam alcançar. Estas considerações ilustram porque lipídios de

cadeia única, lisofosfatidilcolina, por exemplo, podem agregar-se em pequenas micelas e lipídios de dupla cadeia, como diacil fosfatidilcolina, não podem (Israelachvili. et al., 1977).

A energia livre de auto-associação de surfactantes em soluções diluídas é constituída dos seguintes termos (Evans e Wennerström, 1994):

- Uma contribuição hidrofóbica favorável, devido às cadeias hidrocarbônicas isoladas no interior do agregado.
- Um termo de superfície, que reflete duas tendências opostas dos grupos polares: 1) a tendência de se aglomerarem para minimizar o contato entre cadeias hidrocarbônicas e água; 2) a tendência de se manterem afastados, decorrente de repulsão eletrostática, repulsão de hidratação e impedimento estérico.
- Um termo de empacotamento, que no nível mais simples, requer que o interior hidrofóbico do agregado exclua água e cabeças polares.

Termos de superfície e empacotamento assumem diferentes formas funcionais para cada agregado geométrico. A forma que dá o mínimo de energia livre para um determinado conjunto de condições determina a estrutura ótima do agregado.

Para soluções diluídas em que interações entre agregados não são importantes, essas concepções podem ser convenientemente assumidas no parâmetro de empacotamento crítico ou parâmetro geométrico (N_s), dado por:

$$N_s = v / l a_0,$$

Onde, v é o volume da porção hidrofóbica da molécula do surfactante; l é o comprimento da cadeia hidrocarbônica e a_0 é a área ótima da cabeça polar.

1.3.2 Tipos de agregados

A associação entre o parâmetro geométrico N_s e os agregados supramoleculares formados é apresentada na tabela 1. Observa-se que os anfífilicos em forma de cone ($N_s < 0.5$) formam micelas esféricas ou do tipo bastão, anfífilicos de forma cilíndrica ($0.5 < N_s < 1$) formam **vesículas(bicamadas fechadas)**, e particularmente quando $N_s \approx 1$, tem-se as **bicamadas planas**, e anfífilicos na forma de cone invertido ($N_s > 1$) formam

estruturas na fase hexagonal invertida. Observa-se ainda que a estrutura do agregado supramolecular aumenta à medida que o parâmetro cresce.

Lipídio	Parâmetro geométrico (v/a_0l)	Forma de empacotamento crítico	Estrutura formada
Lipídios de cadeia simples (surfactantes) com área da cabeça polar grande: <i>SDS em baixa concentração de sal</i>	$< 1/3$	Cone	Micela esférica
Lipídio de cadeia simples com área de cabeça polar pequena: <i>SDS e CTAB em alta concentração de sal, lipídios não iônicos.</i>	$1/3 - 1/2$	Tronco de cone	Micela cilíndrica
Lipídios de cadeia dupla com área de cabeça polar grande, cadeias fluidas: <i>Fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina, dioxadecilfosfato, sais de dialquil dimetilamônio.</i>	$1/2 - 1$	Tronco de cone	Bicamadas flexíveis, vesículas.
Lipídios de dupla cadeia com área de cabeça polar pequena, lipídios aniônicos em alta concentração salina, cadeias saturadas rígidas: <i>Fosfatidiletanolamina, fosfatidil serina + Ca^{2+}.</i>	~ 1	Cilindro	Bicamadas planas
Lipídio de dupla cadeia com área de cabeça polar pequena, lipídios não iônicos, cadeias poli (cis) insaturadas: <i>Fosfatidiletanolamina insaturada, cardiolipina + Ca^{2+}, ácido fosfatídico + Ca^{2+}, colesterol.</i>	> 1	Tronco de cone invertido ou cunha	Micelas invertidas

Tabela 1 Forma de empacotamento de lipídios e estruturas formadas por estes lipídios [Israelachvili, 1992].

Os agregados supramoleculares estão dispersos em um meio, apresentando uma interface de separação bem definida. Estas interfaces são geralmente regiões de alta energia livre, onde fenômenos tais como adsorção e formação de duplas camadas elétricas podem acontecer.

Foram realizados estudos sobre vesículas de anfífilicos sintéticos carregados e feitos cálculos de estabilidade coloidal desses agregados através de aplicação da teoria DLVO, teoria desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek, para determinação de estabilidade coloidal [Carmona-Ribeiro; Midmore, 1992]. Além do mais, as interações entre tais estruturas supramoleculares são regidas por forças intermoleculares e de superfície, como forças eletrostáticas relativas a dupla camada

elétrica, e forças de van der Waals (dipolo-dipolo induzido) [Debye], dipolo- dipolo [Keesom], dipolo induzido-dipolo induzido [London].

Agregados supramoleculares em forma de vesículas possuem uma temperatura de transição de fase (T_c), abaixo da qual se encontram em estado gel caracterizada por uma maior rigidez das cadeias hidrocarbônicas, e acima da qual as cadeias estão mais fluídas, e com maior mobilidade estando a bicamada na fase líquido-cristalina. A transição de fase tem sido observada tanto em membranas-modelo quanto em algumas membranas naturais. Ela depende da carga dos lipídios, da composição molecular da membrana, do número de duplas ligações nas cadeias hidrocarbônicas e da incorporação de outras moléculas na estrutura [Bangham et al., 1967; Eibl; Blume, 1979; Blandamer et al., 1995].

Os principais sistemas que modelam membranas são: monocamadas, bicamadas planares e lipossomos ou vesículas.

1.3.2.1 Monocamadas

São sistemas auto-organizáveis bidimensionais. Elas resultam do fato das moléculas anfifílicas se orientarem na interface ar/água formando uma camada com a espessura de uma molécula. Podem ser estudados na interface ar-água ou serem transportados para suportes sólidos. Fosfolipídios e outras moléculas anfifílicas formam uma monocamada orientada com a porção polar em contato com a fase aquosa e a cadeia carbônica voltada para o ar. A monocamada é dita insolúvel, quando a concentração do anfifílico na subfase aquosa é nula. A maneira usual de se preparar monocamadas insolúveis de anfifílicos é através da dissolução desses num solvente orgânico volátil e da deposição de gotas da solução sobre a interface ar-água. Quando o solvente evapora a monocamada se forma.

A formação espontânea de uma monocamada na interface ar-água resulta invariavelmente na redução da tensão superficial, a qual pode ser expressa pela seguinte relação:

$$\pi_s = \gamma^0 - \gamma$$

Onde γ^0 é a tensão superficial sem anfifílicos e γ é a tensão quando há anfifílicos presentes. Assim, π_s representa a pressão da superfície, necessária para impedir que o filme se espalhe.

A maior vantagem das monocamadas é a possibilidade de variar a pressão de superfície em função da área média por molécula. Esse sistema tem sido particularmente útil no estudo da físico-química de surfactantes.

Embora algumas proteínas possam ser incorporadas em monocamadas, o sistema é pouco adequado para o estudo de proteínas integrais de membranas.

1.3.2.2 Bicamadas Planas

Formadas por moléculas de anfífilos têm uma posição importante no estudo de auto-organização, representando um papel crucial em processos biológicos e industriais [Evans e Wennerström, 1994].

Para formar bicamadas os anfífilos devem possuir grupos cabeça com áreas pequenas, e/ou regiões hidrocarbônicas volumosas ($N_s = v / l a_0 \approx 1$).

Particularmente, o aumento de volume hidrocarbônico afeta as propriedades dos agregados. Como exemplo tem-se o aumento da hidrofobicidade do lipídio, que diminui drasticamente sua concentração micelar crítica (CMC). A CMC de lipídios formadores de micelas é em torno de 10^{-2} a 10^{-5} M enquanto a CMC de lipídios formadores de bicamada está entre 10^{-6} e 10^{-10} M. Para lipídios formadores de micelas o tempo, τ , de permanência da molécula dentro do agregado é aproximadamente de 10^{-4} s, enquanto que para os formadores de bicamada este tempo é de aproximadamente 10^{+4} s [Israelachvili, 1992].

A bicamada lipídica é a estrutura básica comum a todas as membranas biológicas e, como nos lipossomos, serve como uma barreira impermeável à maioria dos íons e moléculas hidrossolúveis. Nas células, está associada a proteínas, que viabilizam o transporte de determinados solutos, ou seja, as membranas são permeáveis a compostos para os quais dispõem de transportadores específicos.

A composição de lipídios e proteínas varia conforme a membrana. Nas membranas biológicas os fosfolipídios são os principais componentes estruturais. Existem dois tipos de fosfolipídios, os glicerofosfolipídios e as esfingomielinas, os quais estão mostrados na fig.1-2.a e 1-2.b. Os glicerofosfolipídios estão presentes em maior quantidade que as esfingomielinas. Eles derivam de um glicerol que é esterificado por dois ácidos graxos, enquanto um grupo polar é ligado ao terceiro grupo OH do glicerol, esse terceiro grupo é fosforilado e o grupo polar pode ser iônico, zwitteriônico ou não-iônico. Fosfatidilcolina, PC, é o fosfolipídio mais abundante

nas membranas celulares de organismos superiores, com um grupo polar hidrofílico fosfocolina mostrado na figura 1-2.b. Moléculas de Pc não são solúveis em água e em meio aquoso alinham-se aproximadamente, em bicamadas planas no intuito de minimizar a interação desfavorável entre a fase aquosa da solução e as longas cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos. Tais interações são completamente eliminadas quando as bicamadas se juntam para formarem vesículas fechadas e seladas. Fosfatidilcolinas diferenciam-se de outras moléculas anfipáticas (detergentes, lisolecitina) em que bicamadas planas são formadas ao invés de estruturas micelares. Pensa-se que isto se deva ao fato da dupla cadeia de ácido graxo dar a molécula uma forma geral tubular, mais possível de agregação em bicamadas planas comparada com detergente com uma cabeça polar e uma única cadeia, cuja forma cônica ajusta-se muito bem em uma estrutura esférica micelar (ver tabela 1).

Figura 1-2a Três principais classes de fosfolípidios contendo colinas. Em fosfatidilcolinas (lecitinas), uma ponte glicerol de 3 carbonos liga-se a 2 longas cadeias de ácidos graxos com um agrupamento fosforil colina; por convenção os ácidos graxos ocupam as posições 1 e 2 da ponte glicerol, enquanto a cabeça polar está na posição 3. Esfingomielina consiste de uma única cadeia de ácido graxo conjugada via uma ligação amida ao nitrogênio da esfingosina, a qual é novamente ligada ao fosforil colina. A parte lipídica sem a cabeça polar é conhecida como ceramida. Cadeias hidrocarbônicas também podem ser ligadas à ponte glicerol via ligações éter como no terceiro caso de lípidios fosfocolinas.

b	Agrupamento Fosfatidil	Grupo cabeça	Nome usual	Abreviação
	choline	PC
		ethanolamine	PE
		serine	PS
		glycerol	PG
		O-H	acid	PA
		inositol	PI

Figura 1-2b Alguns fosfolípidios fosfatidil.

Compostos sintéticos de dialquilamônio são muito usados em aplicações técnicas. Eles apresentam duas caudas hidrocarbônicas, além de um grupo cabeça polar derivado do grupo amônio. Na figura 2-4, mostramos três compostos derivados do amônio usados no trabalho, que são os sais de DODA, que se caracterizam por serem sais de amônio quaternário com uma cabeça polar catiônica tendo $X = Br^{-1}, Cl^{-1}, Ac^{-1}$, como os contra-íons.

1.3.2.3 Lipossomos ou Vesículas

Essas estruturas são mais estáveis porque não apresentam caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece nas bordas da bicamada plana. Vesículas podem ser formadas de tal forma a envolver quantidades de materiais hidrossolúveis dentro de seu compartimento aquoso e quantidades de materiais hidrofóbicos dentro da membrana da bicamada, conforme Fig.1-1. Devido a esta propriedade, os lipossomos têm sido testados como uma via alternativa para administração de medicamentos. A droga é encapsulada nos lipossomos durante sua preparação, e são transportados pela circulação

até os tecidos; por fusão com a membrana plasmática, ela é introduzida diretamente nas células alvo.

Existem vários métodos de se produzir vesículas, e as propriedades físicas e funcionais das mesmas variam com o método de preparação. Para sistemas artificiais dispersos em solução aquosa existem os seguintes métodos: 1-sonicação em banho, 2-sonicação com sonda (tip), 3- vaporização com clorofórmio. O primeiro resulta em vesículas multilamelares [Kunitake et al., 1977], o segundo em vesículas unilamelares [Mortara et al., 1978; Kano et al., 1979] e/ou fragmentos de bicamada [Pansu et al., 1990; Carmona-Ribeiro et al., 1991], e o terceiro em vesículas unilamelares grandes [Carmona-Ribeiro, 1983; Carmona-Ribeiro et al., 1984]. Para sistemas naturais como os fosfolípidios, um dos métodos de preparação é a injeção etanólica seguida de diálise para eliminar o etanol [Batzri; Korn, 1973; Kremer et al., 1977].

A respeito da estabilidade cinética das vesículas, cabe lembrar que esta depende do processo pelo qual duas vesículas fundem para formar uma estrutura maior [Evans; Wennerström, 1994].

O processo de fusão pode ser visto como ocorrendo em duas etapas. Na primeira ocorre a aproximação das vesículas, etapa esta que depende fortemente das forças interbicamadas. Para sistemas carregados com baixa concentração de eletrólitos, a repulsão das duplas camadas elétricas previne fortemente o encontro de duas vesículas. A segunda etapa representa a fusão de vesículas propriamente dita. Fatores que influenciam o processo de fusão são: a fluidez interna da bicamada, a facilidade com que estruturas que não são bicamadas se formam, e as tensões mecânicas na bicamada. Alguns peptídeos, lípidios como a lisolecitina, ou íons como o cálcio podem agir como promotores de fusão. A diversidade química dos agentes promotores de fusão indica que não existe um mecanismo simples que cause a fusão, ao contrário, a fusão de vesículas pode ser induzida por diferentes agentes.

1.3.2.4 Membranas-modelo

As membranas-modelo, em particular, apresentam características funcionais muito interessantes, pois se constituem em **sistemas biomiméticos** por excelência. De fato, além da semelhança estrutural com as membranas celulares, as membranas-modelo têm uma série de propriedades em comum com as membranas da célula, tais como movimentos laterais e de “flip-flop” dos anfífilicos na bicamada, a ocorrência da transição de fase do estado gel para o estado líquido-cristalino na temperatura de transição de fase (T_c), a possibilidade de servir como matriz para a reconstituição do sistema proteína-membrana, a capacidade de apresentar atividade osmótica, e por fim a capacidade de servir como barreira ao transporte de íons [Rupert, 1987; Israelachvili, 1992].

As membranas-modelo na forma de monocamadas podem ser superpostas em uma seqüência previamente planejada e as montagens podem ser manipuladas de diferentes maneiras. Monocamadas também podem ser usadas para evitar a evaporação de água em lagos e reservatórios. A evaporação pode ser reduzida consideravelmente, revestindo a superfície da água com uma camada monomolecular insolúvel. As monocamadas insolúveis apresentam ainda o efeito de reduzir a formação de ondas na superfície [Shaw, 1975].

As bicamadas podem agir, por exemplo, como solventes para proteínas de membranas [Wennerström, 1994].

As vesículas ou lipossomos além de servirem como sistema modelo para o estudo de membranas celulares, têm uma série de outras aplicações [Rupert, 1987; Carmona-Ribeiro, 1992], dentre as quais pode-se destacar o uso das mesmas como sistemas para catálise de reações químicas através da concentração de um dos reagente na interface bicamada-água [Fendler, 1980; Cuccovia et al., 1989], como sistema modelo para o armazenamento de energia solar permitindo a compartimentalização de doadores e receptores de elétrons relativamente a água [Baat et al., 1991], como sistemas para floculação e estabilização de dispersões [Carmona-Ribeiro; Midmore, 1992], como modelo de sistemas coloidais [Carmona-Ribeiro et al., 1985; Carmona-Ribeiro, 1989], como agentes que interagem com células de bactérias ou mamíferos [Tapias et al., 1994], como sistemas para o encapsulamento de materiais [Larsson, 1994], como sistemas que liberam drogas previamente armazenadas para ação específica num determinado alvo [Fendler, 1982; Larsson, 1994], no tratamento do

câncer, como sistemas para apresentação de proteínas ou transfecção de DNA [Felgner; Holm, 1989; Behr, 1994], e que podem gerar bicamadas ou monocamadas adsorvidas [Wängnerud; Jönsson, 1994; Li; Ruckenstein, 1996; Carmona-Ribeiro; Herrington, 1993; Carmona-Ribeiro; Midmore, 1992, Lessa; Carmona-Ribeiro, 1996; Rapuano; Carmona-Ribeiro, 1997].

1.3.2.5 Membranas suportadas

Em 1984 Roger Horn relatou que vesículas unilamelares de fosfatidilcolina poderiam romper e aderir a uma superfície de mica para formar uma cobertura de bicamada. Em 1985, Tamm e McConnell relatou que bicamadas fosfolipídicas poderiam ser formadas sobre vidro, quartzo e superfícies planas de silício por uma transferência sequencial de duas monocamadas da interface ar-água para substratos sólidos [Tamm, L.K. e McConnell, H.M. 1985], enquanto Marra e Israelachvili, descreveram forças principais de interação atuando entre bicamadas fosfolipídicas adsorvidas sobre mica [Marra, J., Israelachvili, J.N. 1985]. Em 1986, Malcolm Jones e co-autores relataram adsorção fosfolipídica sobre contas de vidro dando uma excelente introdução acerca de prováveis observações em torno de adsorção de lipídios sobre minerais, colunas de filtração gel e filtros de membranas [Jackson et al., 1986]. Em 1992, Tamm e co-autores tiraram vantagem da fusão induzida por Ca^{2+} de vesículas de fosfatidilcolina (PC) com uma superfície de quartzo, para estabelecer isto como um segundo método de arranjo de bicamadas lipídicas sobre substratos sólidos [Kalb et al., 1992]. Eles observaram a atrativa possibilidade de incorporar proteínas de canal em bicamadas suportadas em sólidos via reconstituição de proteínas dentro de vesículas e subsequente fusão de vesícula sobre a superfície [Kalb et al., 1992]. Simultaneamente, Bayerl e coautores demonstraram primeiro a formação de bicamadas fosfolipídicas suportadas sobre contas esféricas de sílica [Bayerl, T. M., Bloom, M. 1990]. Carmona-Ribeiro e coautores demonstraram primeiro a deposição de uma bicamada sintética sobre látex de carga oposta via atração eletrostática [Carmona-Ribeiro et al., 1992] e deposição de uma monocamada neutra de fosfolipídio sobre látex amidina via interação hidrofóbica entre cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios e a superfície hidrofóbica do látex [Carmona-Ribeiro et al., 1993]. Em 1993, Sackmann e coautores depositaram uma camada de carboxi mercaptan sobre ouro onde vesículas catiônicas de DODAB fundiram-se espontaneamente gerando deposição de bicamadas, enquanto vesículas de

dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) fundiram-se após adição de 1 mM de Ca^{2+} [Steltzle, M., Weissmueller, e Sackmann, E. 1993]. A figura 1-5 A ilustra a deposição eletrostaticamente dirigida de bicamadas de vesículas carregadas sobre microesferas de poliestireno sulfato.

Figura 1-3 Possíveis resultados da interação entre partículas sólidas e vesículas de bicamada

A utilidade de filmes poliméricos hidrofílicos sobre superfícies sólidas para suportar camadas lipídicas foi primeiramente demonstrada por Sackmann e coautores, os quais apontaram as vantagens do "fofo" colchão polimérico de dextran para acomodar proteínas de membranas tais como enzimas e anticorpos, sob condições não-denaturantes [Elender, G., Kuehner, M., e Sackmann, E. 1996; Sackmann, E. 1996]. Em 1996, Shao e coautores, reconstituíram gramicidina A, um peptídeo formador de canal, retratado por microscopia de força atômica, em bicamadas suportadas de fosfatidilcolina em estado gel [Mou, J. X., Czajkowski, D. M., e Shao, Z. F. 1996], enquanto Galla e coautores cobriram superfícies de ouro com uma monocamada quimiosorvida de ácido mercaptopropiônico ao qual uma bicamada de DODAB foi aplicada para a reconstituição dos canais de gramicidina D, os quais foram observados por medidas de dicroísmo circular [Steinem, C. Janshoff, A. Ulrich. Sieber, M., Galla, H. J. 1996].

Plant e coautores descreveram a formação de bicamadas de fosfolípido/alcanotiol para estudos de receptores em superfície celular usando ressonância plasmon de superfície [Plant, A, Brigham-Burke, M., Petrella, E. C., O'Shannessy, D. J. 1995].

A figura 1-3 **B** ilustra a forma de interação entre uma vesícula fosfolipídica neutra e uma superfície hidrofóbica de látex, [Scchierolli, S.M.; Carmona-Ribeiro, A.M. 1996]

Nos últimos anos tem havido um aumento exponencial na quantidade de resultados experimentais envolvendo bicamadas suportadas sobre superfícies planas como: vidro, dióxido de silício, mica, filmes poliméricos hidrofílicos sobre mica e sobre metais [Charitat et al., 1999], mas a interação entre vesículas lipídicas e partículas continua pouco explorada. Partículas de látex recobertas de lipídios podem ser usadas para imobilizar receptores que mediam sinais através de membranas [Carmona-Ribeiro, 2001; Scchierolli, Carmona-Ribeiro, 1996]. Partículas de látex recobertas de fosfolipídios são também úteis para promover reconhecimento biomolecular e para modular adsorção de proteína sobre o polímero. Anfífilos sintéticos carregados, formadores de bicamada, como sais de DODA e DHP, em uma certa faixa de concentração, são eletrostaticamente adsorvidos em microesferas de poliestireno de carga oposta, formando látexes homodispersos cobertos de bicamada [Charitat et al., 1999].

Recentemente, Malcolm Jones e coautores [Bennett, T. C., Creeth, J. E. e, Jones, M.N. 2000] usando lipossomos aniônicos e catiônicos demonstraram que a adsorção dessas vesículas sobre as partículas sólidas de silício e dióxido de titânio se deu através da adesão de uma camada de vesículas intactas, conforme mostra a parte C da figura 1-3.

1.4 Adsorção de membranas em superfícies

1.4.1 Aspectos físico-químicos da adsorção em superfícies

Primeiramente é conveniente fazer algumas definições gerais sobre superfícies e sobre o fenômeno de adsorção.

As superfícies das fases têm um comportamento diferente daquele apresentado na parte interior das próprias fases, por causa das rápidas mudanças estruturais que devem ocorrer nas fronteiras das fases e suas vizinhanças. Os arranjos de ligação de equilíbrio são rompidos. Nascendo aí uma energia em excesso associada a superfície (isto é, energia de superfície γ), que é medida em energia por unidade de área.

A energia em excesso pode ser minimizada se fizermos com que a área superficial seja mínima. A energia de superfície pode ser diminuída pela segregação de vários componentes na direção da superfície ou em direção contrária, este comportamento é chamado adsorção.

A teoria da adsorção é amplamente aplicada a vários sistemas, e diz que havendo um contato molecular suficientemente íntimo na interface, os materiais vão aderir devido a forças interatômicas e intermoleculares que são estabelecidas entre átomos e moléculas das superfícies do adsorvente e do adsorbato, por exemplo, a atração de van der Waals, e as ligações através de pontes de hidrogênio. Além disso, ligações químicas podem ser algumas vezes formadas na superfície da interface. A partir disso a adsorção pode ser classificada como adsorção física ou adsorção química, respectivamente, apresentando cada qual características bem definidas:

Adsorção Física ou Fisissorção

- forças entre o adsorbato e o adsorvente sem formação de compostos;
- interações não orientadas e não específicas;
- envolve baixas energias de interação ($300 \text{ a } 3000 \text{ J.mol}^{-1}$);
- facilmente reversível, o material dessorvido é o mesmo que foi adsorvido, pode haver várias camadas de material adsorvido;

Exemplo típico: adsorção de nitrogênio (N_2) sobre óxido de silício

Adsorção Química ou Quimissorção

- forças de natureza química que levam à formação de compostos;
- interações de caráter mais específico;
- altas energias de interação ($40.000 \text{ a } 400.000 \text{ J.mol}^{-1}$);
- dificilmente reversível, muitas vezes reações químicas levam à dessorção de material diferente do que foi adsorvido;
- a adsorção não mais ocorre quando a superfície está completamente coberta por uma monocamada do material adsorvido;

Exemplo típico: adsorção de oxigênio (O_2) sobre carvão.

O fenômeno da adsorção de várias espécies, particularmente os anfífilicos podem ocorrer em interfaces ar-líquido, líquido-líquido e sólido-líquido. Para as membranas-modelo estudadas neste trabalho, o maior interesse se concentra na adsorção das mesmas, nas interfaces ar-líquido e sólido-líquido.

O estudo quantitativo de fenômenos de superfície envolve incerteza importante em virtude das dificuldades inerentes ao estudo direto da interfase [Shaw, 1975]. É conveniente encarar a superfície de separação ou interface entre duas fases como um plano matemático, como SS na figura 1-4.a abaixo. Esta aproximação, contudo, não é verdadeira, particularmente na presença de um filme adsorvido. Um filme de adsorção terá uma certa espessura. Sua presença influencia estruturas próximas a ele (por exemplo, por orientação dipolo-dipolo, particularmente na fase aquosa); como resultado tem-se uma região de composição variável com espessura apreciável em termos de dimensões moleculares.

Ao se representar a superfície de separação entre duas fases por um plano matemático, a adsorção pode ser descrita convenientemente em termos de concentrações superficiais excessivas. Sendo $n_{\sigma i}$ a quantidade do componente i na fase superficial σ (figura 1-4.b) existente a mais em σ , em relação a que existiria se as fases α e β se estendessem até a superfície SS sem variação de suas concentrações:

Assim, tem-se que:

Figura 1-4 Representações de uma interface entre as fases α e β .

Sistema ideal

Sistema real

$$U = U_{\alpha} + U_{\beta}$$

$$U = U_{\alpha} + U_{\beta} + U_{\sigma} \text{ (Energia Interna)}$$

$$S = S_{\alpha} + S_{\beta}$$

$$S = S_{\alpha} + S_{\beta} + S_{\sigma} \text{ (Entropia)}$$

$$G = G_{\alpha} + G_{\beta}$$

$$G = G_{\alpha} + G_{\beta} + G_{\sigma} \text{ (Energia Livre de Gibbs)}$$

$$n_i = n_{i\alpha} + n_{i\beta}$$

$$n_i = n_{i\alpha} + n_{i\beta} + n_{i\sigma} \text{ (Quantidade do componente i)}$$

Etc...

Etc...

Pode-se definir agora a função de excesso superficial Γ :

$$\Gamma_i = n_{i\sigma}/\sigma$$

onde σ é a área da superfície de separação entre as fases. Γ_i pode ser positivo ou negativo, e sua magnitude depende da localização de SS. $\Gamma_i < 0$ implica em falta de i na interface e $\Gamma_i > 0$ implica em excesso de i na interface.

Sabe-se que G é função de várias outras variáveis tais como pressão (P), temperatura (T), quantidade de material (n_i) área da superfície (σ), volume (V), entre outras variáveis. Da termodinâmica tem-se que

$$dG = VdP - SdT + \gamma d\sigma + \sum \mu_i dn_i \quad (1.1)$$

onde, S é a entropia, γ é a tensão superficial, μ_i é o potencial químico da substância i, P é a pressão, σ é a área, T é a temperatura, n_i é a quantidade do componente i.

Para P e T constantes e considerando-se a interface, tem-se que:

$$dG_{\sigma} = \gamma d\sigma + \sum \mu_i dn_{i\sigma} \quad (1.2)$$

A energia livre na interface é obtida integrando-se (1.2)

$$G_{\sigma} = \gamma\sigma + \sum \mu_i n_{i\sigma} \quad (1.3)$$

Diferenciando-se a expressão (1.3) tem-se:

$$dG_{\sigma} = \gamma d\sigma + \sigma d\gamma + \sum \mu_i dn_{i\sigma} + \sum n_{i\sigma} d\mu_i \quad (1.4)$$

Comparando (1.4) com (1.2), obtém-se:

$$\sigma d\gamma + \sum n_{i\sigma} d\mu_i = 0$$

Rearranjando tem-se:

$$d\gamma = - \sum_i d\mu_i n_{i\sigma} / \sigma \text{ ou ainda,}$$

$$d\gamma = - \sum_i \Gamma_i d\mu_i \text{ que é a Eq. de Adsorção de Gibbs}$$

A equação da adsorção de Gibbs permite calcular o grau de adsorção que ocorre numa superfície líquida a partir de dados da tensão superficial.

Agora irá se considerar o caso da adsorção na interface sólido-líquido.

Fisicamente, uma interface é caracterizada principalmente pela energia livre interfacial ou tensão, que é resultado da orientação das moléculas constituintes. Estas e outras propriedades interfaciais das membranas podem ser compreendidas em uma larga extensão em termos das leis físico-químicas que as governam [Kerker; Buckingham. 1972, Wängnerud Jönsson, 1994; Li, Ruckenstein, 1996; Sharma et al., 1996].

Neste trabalho, a formação de bicamadas ou de monocamadas sobre uma superfície sólida ocorre pela interação de vesículas com a superfície.

Considerando-se as características de partícula coloidal apresentada por vesículas e as propriedades de interface sólido/líquido, pode-se antever que a deposição de vesículas carregadas seria determinada inicialmente pela clássica combinação de uma força eletrostática devida à interação entre as duplas camadas elétricas associadas às vesículas e a superfície sólida, e de uma força eletrodinâmica de dispersão (van der Waals) entre as vesículas e o sólido.

Quando a solução do agregado supramolecular é colocada em contato com um sólido, a adsorção irá ocorrer, com uma conseqüente redução na concentração da solução. Dos dados analíticos descrevendo a mudança de concentração na solução, bem como de um conhecimento da quantidade total de sólido e da solução equilibrados, é possível determinar a quantidade de soluto (adsorbato) por unidade de massa ou de área superficial do sólido (adsorvente). Estes estudos são geralmente conduzidos a uma temperatura constante, e os resultados que relacionam a quantidade de material adsorvido por unidade de massa ou de área de adsorvente em função da concentração de adsorbato livre em solução constituem uma isoterma de adsorção.

Existem vários tipos de isotermas de adsorção, tais como as isotermas de adsorção de Temkin, de Freundlich, BET etc... [Hiemenz, 1986].

Um dos tipos mais comuns utilizada para descrever a adsorção a partir de uma solução, e que merece ser mencionada com mais detalhes é a isoterma de Langmuir, onde uma das formas pode ser expressa por:

$$X_2^s = (K \cdot a_2^b + 1)$$

Em que X é a fração molar do soluto na superfície, a é a atividade do soluto na solução, e K é uma constante.

Tal isoterma decorre do fato de se considerar a adsorção do soluto segundo a equação abaixo:

A isoterma de Langmuir é importante por ser facilmente entendida teoricamente, e por ser largamente aplicada aos mais diferentes dados experimentais.

A importância das isotermas de adsorção decorrem do seguinte fato: nas interfaces entre dois fluidos (ar-líquido, líquido-líquido) a função de excesso superficial (Γ) pode ser obtida diretamente a partir de valores de tensão superficial (γ) obtidos experimentalmente, aplicando-se a equação de Gibbs. Nas superfícies sólidas esta vantagem experimental para a determinação da tensão superficial não existe. De modo que tudo o que se pode obter da equação de Gibbs com relação a adsorção em superfícies sólidas é uma explicação termodinâmica para as forças fundamentais que dirigem a adsorção. Qualquer outra informação sobre a função de excesso superficial (Γ) deve ser obtida de outras fontes, ou seja, através das isotermas de adsorção.

1.4.2 Aspectos bio-tecnológicos

As membranas-modelo têm um largo espectro de aplicações tecnológicas devido a uma série de características notáveis. Algumas aplicações das membranas-modelo são mencionadas a seguir:

- sistemas compatíveis para enzimas imobilizadas [Puu et al., 1995] de grande utilidade para tecnologias de separação, como por exemplo, para a remoção seletiva de toxinas de fluidos biológicos ou para filtração através de nanoporos [Scheer et al., 1995]
- como sistemas de ancoramento em superfícies para o crescimento organizado de estruturas em solução [Kunitake, 1995]
- para o desenvolvimento de biosensores [Cornell et al., 1997]

Em especial, o uso de dispositivos moleculares funcionais para o processamento de sinal e de informação (eletrônica molecular), não é uma revelação recente para cientistas e engenheiros. Além do mais, a eletrônica molecular não é uma tecnologia completamente futurista esperando ainda a chegada de um primeiro protótipo bem sucedido; um exemplo da viabilidade da eletrônica molecular é a largamente usada tecnologia do “display” de cristal líquido (LCD) [Hong, 1994].

Particularmente, os biosensores se apresentam como uma das aplicações mais versáteis da eletrônica molecular, pois suas aplicações vão desde a detecção de poluentes ambientais passando pela detecção de drogas “in vitro”, até o monitoramento da qualidade de alimentos e a realização de diagnósticos médicos [Thompson; Dorn, 1988; Bataillard et al., 1988; Billard et al., 1991; Aizawa et al., 1994; Mendelson, 1994; Shear et al., 1995; Cornell et al., 1997].

Em termos amplos, pode-se definir um biosensor como um dispositivo de detecção molecular que combina o mecanismo de reconhecimento biológico com uma técnica de transdução física, como por exemplo, técnicas de medidas condutimétricas ou capacitivas, em se tratando de um dispositivo de resposta elétrica, onde o sinal resultante da detecção molecular é transduzido e amplificado por um conjunto de circuitos apropriados. Basicamente, uma biomolécula é o elemento primário de transdução, e é capaz de uma detecção e de uma medida em tempo real da concentração de uma determinada espécie química.

O processo de informação biológica é um processo de distribuição maciçamente paralelo, quando comparado com os processos de informação que são utilizados com os recursos da eletrônica atual. Estruturalmente, este modo de processamento de informação é implementado por uma vasta coleção e variedade de redes neurais. Estando situado entre o nível macroscópico das redes neurais e o nível microscópico das reações moleculares, estão os eventos que ocorrem na superfície e no interior das membranas. Muitos processos biológicos importantes, como reconhecimento célula-célula e interação receptor-ligante têm lugar na superfície da membrana. Muitas organelas biologicamente importantes tais como centro de reações fotossintéticas e mitocondriais são baseados em membranas [Hong, 1994].

Bicamadas de membranas fosfolipídicas são as estruturas básicas sobre as quais muitos componentes biomoleculares funcionalmente ativos são “montados”, e eles podem ser encontrados nas células vivas em cada fronteira dos compartimentos

celulares e subcelulares. As biomembranas permitem um fluxo específico de íons através de seus canais proteicos [Voet; Voet, 1995].

Logo, na sua mais ampla definição, eletrônica molecular não é estritamente limitada à utilização de elétrons para o processamento de informação; ela também utiliza movimento de íons e de fótons, bem como movimento de átomos (como nas mudanças conformacionais das proteínas).

O uso de membranas-modelo suportadas em superfícies sólidas permite que sensores eletroópticos sejam desenvolvidos, já que as bicamadas podem ser usadas simultaneamente como isolantes elétricos ultrafinos como uma matriz para a incorporação de receptores (tais como lipídios acoplados a antígenos ou ‘anticorpos), e para a supressão da ligação de ligantes não específicos [Sackmann, 1996].

Existem dois principais tipos diferentes de abordagem para a detecção elétrica de ligantes ligados: medidas de capacitância (ou voltagem) e medidas de corrente [Steltzle et al, 1993].

Para o monitoramento elétrico da ligação dos ligantes, podem ser usados vários suportes como: superfícies recobertas por ouro ou por $\text{SnO}_4/\text{InO}_4$, superfícies de silício cobertas por SiO_2 , estruturas metal-óxido-semicondutor [Sackmann, 1996, 1993].

A capacitância (C_m) de bicamadas lipídicas suportadas contendo proteínas depende do valor complexo da constante dielétrica, da espessura (dm) da camada, da carga da superfície da bicamada lipídica, das proteínas integradas, e da distância entre a bicamada e o suporte.

Ao se considerar medidas de corrente elétrica em sensores baseados em bicamadas lipídicas suportadas em sólidos, tem-se que neste caso é requerido um mecanismo que dispare a abertura dos poros da membrana após a ligação da biomolécula ligante. Desse modo, pode ser desenvolvido biosensores altamente seletivos baseados no transporte de íons através das membranas lipídicas pela incorporação de proteínas formadoras de canais [Seifert, et al., 1993; Cornell et al., 1997]. Uma das possibilidades para a incorporação de proteínas formadoras de canais em bicamadas suportadas em sólidos é a sua reconstituição em vesículas e sua subsequente fusão na superfície [Kalb et al., 1992].

A gramicidina D tem sido usada como um canal modelo para testar a adequação da espectroscopia de impedância para o estudo da permeabilidade a íons. A gramicidina D incorpora em bicamadas onde ela exibe uma conformação que é característica de um estado de canal. Medidas de dicroísmo circular (CD) indicam que a gramicidina D em

vesículas unilamelares grandes de DODAB apresentam um estado formador de canal, e o transporte de íons Cs através destes canais foi medido por análise de impedância [Steinem et al., 1996].

Membranas de lecitina e colesterol foram imobilizadas em ágar, para posterior incorporação de proteínas formadoras de canal como a gramicidina e a valinomicina, e medidas de condutância e de potencial de membrana foram realizadas, bem como a investigação da estabilidade da membrana sob a aplicação de potenciais elétricos e sob agitação mecânica. Essas membranas mostraram-se adequadas tanto no que diz respeito às suas propriedades de condução quanto a estabilidade eletromecânica [Uto et al, 1994].

Bicamadas altamente estáveis, compostas de lipídeos biologicamente relevantes tais como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, e colesterol, foram formados em superfícies de platina. Bacteriorodopsina isolada da membrana púrpura (PM) da *Halobacterium halobium*, citocromo oxidase do coração bovino, acetilcolinesterase do cérebro bovino e o receptor nicotínico (sensível à acetilcolina) do órgão elétrico do Torpedo foram incorporados nessas membranas reconstituídas.

O reconhecimento biomolecular entre a toxina do cólera e o seu receptor monosialogangliosídeo (GMI) é preservado pela incorporação do GM1 em fosfolipídeos suportados por microesferas de poliestireno, e este resultado pode ser importante para o desenvolvimento de imunoenaios e biosensores para amplificação do reconhecimento biomolecular [Sicchierolli; Carmona-Ribeiro, 1996].

1.5 Força de interação entre e inter-membranas

Colóides são partículas dispersas em um meio contínuo, em geral, líquido. Essas partículas, em contínua colisão devido ao movimento browniano, mantêm sua individualidade somente quando a colisão não resulta em associações permanentes. Para os colóides liofóbicos (sem afinidade pelo solvente), a energia livre é mais baixa quando todas as partículas estão agregadas. Esses sistemas, entretanto, podem permanecer dispersos se as partículas forem estabilizadas por carga elétrica de mesmo sinal ou pela adsorção de uma camada de polímero ou de anfifílico capaz de impedir o contacto entre elas. Assim, um colóide é estável quando as colisões entre suas

partículas não resultam em formação de agregados, ou seja, em coagulação ou floculação.

1.5.1 Forças entre Partículas

1.5.1.1 Forças de van der Waals

As forças de atração entre as partículas favorecem a floculação e se opõem à estabilidade coloidal. Para entender a origem destas forças, é necessário considerar as interações entre as moléculas individuais. As interações macroscópicas (como as existentes entre partículas coloidais) são o resultado da somatória das interações entre os pares de moléculas constituintes das partículas. Para muitas destas interações, a energia potencial depende de uma potência inversa à da distância de separação. O alcance da interação é diferente para os diferentes valores do expoente. As interações que envolvem uma lei de dependência inversa com a sexta potência da distância de separação são as mais importantes do ponto de vista da química coloidal. Estas interações são sempre atrativas e são do seguinte tipo:

Dipolo permanente /dipolo induzido (Keeson)

Dipolo permanente /dipolo permanente (Debye)

Dipolo induzido /dipolo induzido (London)

As expressões para estas interações têm em comum uma dependência inversa com a sexta potência da distância de separação, bem como fatores de proporcionalidade que descrevem a polarização de uma molécula, como polarizabilidade e momento dipolar.

Para moléculas idênticas, os 3 tipos de atração somados dão a energia líquida de atração de van der Waals.

Para moléculas não polares, a maior contribuição para energia de atração vem da componente de London. Nos dois casos, a energia de interação tem uma dependência inversa com a sexta potência da distância de separação.

A interação entre pares de moléculas deve agora sofrer um tratamento de aumento de escala para que possamos calcular a interação entre corpos macroscópicos. A estratégia para este aumento de escala é a somatória de todas as atrações entre os

pares de moléculas que compõem dois corpos. Este procedimento foi efetuado por Hamaker para corpos de diferentes geometrias.

A expressão resultante para a energia de atração entre dois blocos de extensão infinita é:

$$\Phi_A = - \left(\frac{\rho N_A}{M} \right)^2 \left(\frac{\beta \pi}{12} \right) d^{-2} \quad (1.5)$$

onde β é uma relação entre os parâmetros moleculares de polarizabilidade e momento dipolar, também chamado parâmetro de interação; ρ é a densidade dos corpos; N_A é o número de Avogadro e M é o peso molecular.

O conjunto de constantes, $A = -(\rho N_A/M)^2 \beta$ é tradicionalmente conhecido como constante de Hamaker, de modo que a equação 1.5 se torna:

$$\Phi_A = - \left(\frac{A}{12 \pi} \right) d^{-2} \quad (1.6)$$

Para duas esferas do mesmo material a curtas distâncias de separação,

$$\Phi_A = \frac{-AR}{(12s)} \quad R \gg s \quad (1.7)$$

com R = raio das partículas, e s distância de separação, ao longo da linha dos centros.

É interessante notar que a força atrativa entre dois corpos decresce pouco com a distância de separação (dependência inversa com a 1ª potência) do que a força atrativa entre duas moléculas (dependência inversa com a 6ª potência). Para partículas coloidais as interações de van der Waals são significativas para distâncias de separação de até 100 nm. A avaliação numérica das forças atrativas requer o conhecimento da constante de Hamaker. Hiemenz [Hiemenz, 1986] descreve a faixa de A entre 10^{-13} a 10^{-12} ergs (10^{-20} a 10^{-19} J) para a maioria dos materiais.

1.5.1.2 Efeito do Meio na Energia de Interação de van der Waals

A maneira mais simples de se tratar o efeito do meio sobre a interação de van der Waals entre partículas, é considerar a pseudo reação química ilustrada na Figura 1-5

Figura 1-5 Processo de floculação tratado como uma reação pseudoquímica. As linhas sólidas indicam as partículas da fase dispersa, e as linhas pontilhadas as partículas de solvente. No caso (a) as partículas dispersas são do mesmo material, e no caso (b), de materiais diferentes.

Na condição inicial, cada partícula dispersa rodeada pelo solvente se constitui numa unidade cinética independente. Na condição final, as partículas dispersas se agregam e formam um díptico. A variação de energia que acompanha este processo é dada por

$$\Delta\Phi = \Phi_{11} + \Phi_{22} - 2\Phi_{12} \quad (1.8)$$

onde os subscritos se aplicam aos dois tipos de partículas. Cada um dos termos do lado direito da equação (1.8) tem a mesma dependência funcional com os parâmetros de forma e distância, e diferem somente nos parâmetros moleculares contidos na constante de Hamaker. Portanto, $\Delta\Phi$ segue a função de interação apropriada com o seguinte valor da constante de Hamaker:

$$A_{212} = A_{11} + A_{22} - 2A_{12} \quad (1.9)$$

O subscrito 212 se refere a duas partículas do tipo 2 separadas pelo meio do tipo 1. Uma simplificação útil é:

$$A_{12} = (A_{11}A_{22})^{1/2} \quad (1.10)$$

A interação entre corpos diferentes é dada pela média geométrica das interações homogêneas para as duas espécies consideradas separadamente. Combinando as equações (1.9) e (1.10) vem:

$$A_{212} = (A_{11}^{1/2} - A_{22}^{1/2})^2 \quad (1.11)$$

Este é o valor efetivo da constante de Hamaker, A_{212} utilizado para avaliar a atração entre partículas semelhantes em um meio.

Os seguintes pontos devem ser registrados acerca de A_{212} :

- A. A constante de Hamaker é sempre positiva, independentemente dos valores de A_{11} e A_{22} .
- B. Partículas idênticas se atraem no vácuo e em qualquer meio.
- C. A presença de um meio em geral diminui a atração entre as partículas.
- D. Para $A_{11}=A_{22}$, $A_{212}=0$, ou seja, não há atração líquida entre as partículas.

1.5.1.3 Cálculo das Forças de Atração de van der Waals entre partículas com camadas adsorvidas

De acordo com Vold [Vold, 1961] a força atrativa entre partículas de várias geometrias, contendo camadas adsorvidas tem a forma geral:

$$-12V_A = \sum_{ij} f(A_i, H_j)$$

onde, $f(A_i)$ é a função das constantes de Hamaker envolvidas e H_j é função da geometria do sistema. O método para calcular a constante de Hamaker de misturas, que é necessário na avaliação de A para partículas com camadas adsorvidas, é baseado no trabalho de Gregory [Gregory, 1969]. As camadas adsorvidas são consideradas homogêneas e uniformes, isto é, possuem um único valor para a constante de Hamaker, e o modelo adotado é baseado numa queda exponencial normal à interface.

Para o caso de duas partículas esféricas de raios R_1 e R_2 , e constante de Hamaker, A_{p1} e A_{p2} , contendo camadas adsorvidas de espessuras d_1 e d_2 e constantes de Hamaker A_{s1} , e A_{s2} num meio de constante de Hamaker A_m , (Figura 1-6) a energia de interação de van der Waals é dada por

$$\begin{aligned} -12V_A = & H_{s1s2} (A_{s1}^{1/2} - A_m^{1/2})(A_{s2}^{1/2} - A_m^{1/2}) + H_{p1p2} (A_{p1}^{1/2} - A_{s1}^{1/2})(A_{p2}^{1/2} - A_{s2}^{1/2}) + \\ & H_{p1s2} (A_{p1}^{1/2} - A_{s1}^{1/2})(A_{s2}^{1/2} - A_m^{1/2}) + H_{p1s1} (A_{p2}^{1/2} - A_{s2}^{1/2})(A_{s1}^{1/2} - A_m^{1/2}) \end{aligned} \quad (1.12)$$

onde, a função de Hamaker não retardada é dada por:

$$H(x, y) = x/(x^2+xy+x) + y/(x^2+xy+x+y) + 2\ln[(x^2+xy+x)/(x^2+xy+x+y)] \quad (1.13)$$

onde $x = \Delta/2r_1$; $y = r_2/r_1$ e a definição dos termos é dada a seguir, na Figura 1-6

Figura 1-6 Definição de termos para o cálculo de energias de atração de van der Waals

$$H_{s1s2} = \Delta = h$$

$$H_{p1s2} = \Delta = h + \delta$$

$$H_{p1p2} = \Delta = h + 2\delta$$

$$r_1 = r_2 = R$$

$$r_1 = r_2 = R + \delta$$

$$r_1 = R + \delta \quad \text{e} \quad r_2 = R$$

É interessante observar que enquanto para o caso de partículas iguais V_A é sempre negativo, é possível haver uma sequência de valores de constantes de Hamaker que tornem V_A positivo (isto é, haja repulsão). O termo H_{s1s2} é o termo dominante na equação (1-20), de modo que a condição para V_A positivo é que A esteja entre A_{p1} e A_{p2} . Este conceito é uma extensão do caso mais simples da atração entre duas partículas "nuas", num meio m onde $A_{p1} > A_m > A_{p2}$ (ou vice-versa), que também representa repulsão líquida.

1.5.1.4 Interações Elétricas

Se somente forças de van der Waals operassem entre partículas coloidais, deveríamos esperar que estas se agregassem e precipitassem como uma massa sólida. A presença de uma força eletrostática repulsiva impede que isto aconteça. Superfícies sólidas se eletrificam em presença de eletrólitos por dois mecanismos:

- Ionização ou dissociação de grupos superficiais, por exemplo, dissociação de prótons de superfícies carboxílicas.

- Adsorção de íons da solução. Por exemplo, adsorção de Ca^{2+} em cabeças zwitteriônicas de bicamadas lipídicas, adsorção de íons Ag^+ por partículas de AgI em excesso de Ag^+ , ou de I^- . A adsorção pode também ocorrer em sítios de carga oposta que se tornaram disponíveis por dissociação, (por exemplo, de H^+). Este caso é conhecido como troca iônica.

A variação do potencial com a distância a partir de uma superfície carregada de forma arbitrária é um problema clássico da eletrostática. O problema geral é descrito pela equação de Poisson:

$$\frac{\delta^2 \Psi}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 \Psi}{\delta y^2} + \frac{\delta^2 \Psi}{\delta z^2} = \frac{-\rho^*}{\epsilon} \quad (1.14)$$

onde definimos ϵ , como o produto $\epsilon_r \epsilon_0$ para levar em conta o efeito do meio. Nestas expressões, ρ^* é a densidade superficial de carga do sistema, uma quantidade que depende de x , y e z . A solução para a equação diferencial é uma expressão para o potencial que satisfaz a equação (1.14), e as condições de contorno do problema específico. Descrevendo a concentração iônica em termos do potencial por meio do fator de Boltzmann, chega-se à equação de Poisson-Boltzmann:

$$\frac{\delta^2 \Psi}{dx^2} = \frac{-e}{\epsilon \sum z_i n_{i0} \exp\left(\frac{-z_i e \Psi}{\kappa T}\right)} \quad (1.15)$$

A aproximação de Debye-Hueckel dá a solução da equação 1.15 quando $z_i e \Psi / \kappa T \ll 1$ com o potencial decaindo exponencialmente em função da distância a partir da superfície

$$\Psi = \Psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (1.16)$$

onde $\kappa = \sum z_i^2 2n_{i0} / \epsilon \kappa T$.

Essa relação de constantes aparece em todas as discussões sobre dupla camada, e o inverso deste parâmetro κ tem dimensões de comprimento é chamado de "espessura da dupla camada".

Sem a aproximação $z_i e \Psi / \kappa T \ll 1$, a solução da equação 1-15 é a dada pela teoria de Gouy-Chapman, onde a variação do potencial com a distância é dada por:

$$Y = Y_0 \exp(-\kappa x)$$

onde Y é definido por:

$$Y = \frac{\left(\exp\left(\frac{ze\Psi}{2\kappa T}\right) - 1 \right)}{\left(\exp\left(\frac{ze\Psi}{2\kappa T}\right) + 1 \right)} \quad (1.17)$$

Até o momento, os eletrólitos foram tratados como cargas pontuais, sem nenhuma identidade química, exceto sua valência. Esta aproximação não é aceitável para as proximidades de uma superfície. A solução deste problema, devida a O. Stern, é dividir a parte aquosa da dupla camada, por uma fronteira hipotética, situada a uma distância δ da superfície, conhecida como plano de Stern definido pelos íons que estão adsorvidos à superfície.

Assim, uma isoterma de adsorção pode ser escrita para estes íons como, por exemplo, a de Langmuir, com a constante de afinidade proporcional ao fator de Boltzmann e a energia potencial composta por duas contribuições: $e\Psi_\delta$, a energia elétrica associada com o íon na camada de Stern, e Φ , a energia química específica associada à adsorção. Aplicando o modelo do condensador de placas paralelas à camada de Stern, pode-se demonstrar que a queda de potencial nesta camada aumenta com a quantidade de íons adsorvida, alcançando um limite, quando a superfície está saturada.

Valores do parâmetro Φ podem ser experimentalmente determinados para interfaces mercúrio-água, através de estudos eletrocapilares. A adsorção de íons nesta interface, para ânions monovalentes segue a ordem [Hiemenz, 1986]:

Em geral, a adsorção específica é maior quanto maior o tamanho do íon e, portanto, quanto maior sua polarizabilidade.

Tratando a adsorção de íons, a teoria de Stern afasta da teoria de Gouy-Chapmann a objeção de "congestionamento superficial". Entretanto, introduz uma série de dificuldades, como a da avaliação dos parâmetros κ e Φ . A generalidade da equação de Gouy-Chapmann é perdida quando os efeitos de adsorção específica são considerados.

Nas discussões subseqüentes, estaremos preocupados com os valores de potencial na dupla camada. Este valor pode ser tomado como o potencial no plano de Stern, Φ_δ , ou o valor do potencial sobre a superfície Φ_0 .

O potencial a ser usado nos cálculos de energia de repulsão é o potencial de Stern, Φ_δ , em vez do potencial de superfície Φ_0 . Em casos como AgI, onde o potencial de superfície é governado pelo equilíbrio entre os íons determinantes do potencial, Φ_0 pode ser perfeitamente conhecido. Em outros casos, o valor da densidade superficial de carga é perfeitamente conhecido, e o valor do potencial de superfície calculado, admitindo-se dissociação incompleta, ou adsorção específica de íons. Na maioria dos casos, entretanto, a aproximação mais próxima de Φ_δ , pode ser medida experimentalmente, e é chamado potencial zeta (ζ).

1.5.1.5 Sobreposição de Duplas-Camadas e Repulsão entre Partículas

A Figura 1-7 representa duas superfícies separadas por uma distância d , imersas num reservatório infinito contendo eletrólito de concentração n_0 .

Figura 1-7. Representação de perfil de potencial eletrostático de duas superfícies planas de mesma carga separadas por uma distância d .

No equilíbrio, a resultante de todas as forças deve ser nula. Tomemos por exemplo, um elemento de volume à distância $d/2$ da superfície de uma das placas. Dois tipos de força devem atuar neste elemento: pressão e força eletrostática, cujas expressões são:

$$\begin{aligned} F_x &= d p / d x \\ F_{el} &= \rho^* d \Psi / d x \end{aligned} \quad (1.18)$$

Combinando as duas expressões com o critério de equilíbrio, e substituindo o valor de ρ^* , vem:

$$d/dx (p - \epsilon/2 (d\psi/dx)^2) = 0$$

Ou,

$$p - \epsilon/2 (d\psi/dx)^2 = \text{constante} \quad (1.19)$$

Estamos interessados no valor desta constante no ponto médio da região entre as placas, onde podemos tirar vantagem das condições de simetria, observando que ψ é mínimo no ponto médio; ou $d\psi/dx = 0$, para $x = d/2$. Para grandes distâncias de separação, o potencial no ponto médio é:

$$\psi_{d/2} = \psi_1 + \psi_2 \approx 2 \left(\frac{4\kappa\kappa T_0}{ze} \right) \exp\left(\frac{-\kappa d}{2} \right) \quad (1.20)$$

que pode ainda ser escrito como:

$$F_R \approx 64 n_0 \kappa T Y_0^2 \exp(-\kappa d) \quad (1.21)$$

considerando-se apenas os primeiros termos da expansão do cosh $(ze\psi_{d/2}/kT)^2$. Como κ depende de $n_0^{1/2}$ a forma geral da força de repulsão pode ser escrita como:

$$F_R = (\text{constante } 1) n_0 \exp [(-\text{constante } 2) n_0^{1/2}]$$

O termo exponencial é mais sensível a n_0 . Portanto, esta expressão mostra que a força de repulsão decresce com o aumento da concentração de eletrólito.

1.5.1.6 Soma das forças de atração de van der Waals e repulsão eletrostática: Teoria DLVO

A teoria de Deryaguin, Landau, Verwey e Overbeck (DLVO) de estabilidade coloidal que ocupa uma posição central na área de colóides e superfícies, envolve a estimativa da energia de interação entre superfícies devida à sobreposição das duplas camadas, e da atração de van der Waals. Na seção anterior, a energia resultante da

sobreposição de duplas-camadas foi revista. Uma solução analítica exata para o problema não pode ser dada, e recorre-se, portanto a várias aproximações. Se admitirmos que o equilíbrio de adsorção-desorção de íons é mantido na aproximação das partículas carregadas, duas situações bem definidas podem ser equacionadas:

- Se a carga superficial for resultante da adsorção de íons determinantes do potencial, o potencial de superfície permanece constante durante a interação, e a carga se ajusta.
- Se o potencial de superfície for resultante da ionização, a densidade de carga superficial se mantém constante, e o potencial se ajusta.

Healy e colaboradores [Healy, 1970] deduziram expressões para interações a carga constante, e potencial constante. A grandes distâncias de separação (pouca sobreposição das duas duplas camadas envolvidas na interação), as duas expressões se tornam iguais. A mesma conclusão foi obtida por Overbeek [Overbeek, 1977].

Uma outra aproximação para a energia total de interação é a deduzida por Reerink e Overbeek [Reerink e Overbeek, 1954]. A distância de separação entre as partículas é considerada grande o suficiente para que o potencial em cada ponto entre as partículas seja dado pela soma dos potenciais individuais, e somente adsorção não-específica de íons foi considerada.

A energia potencial total para a interação entre duas partículas coloidais é definida como:

$$V = V_A + V_R$$

V_A é a energia atrativa de van der Waals que, no caso de partículas esféricas com uma bicamada adsorvida, será dada pelas equações 1.12 e 13.

V_R é o termo de energia repulsiva de interação entre as duplas camadas elétricas associadas às partículas, explicitamente dadas por Reerink e Overbeek (Reerink e Overbeek, 1954) em água a 25 °C como:

$$V_R = 4.62 \times 10^{11} (a\gamma^2/v^2) \exp(-kh)$$

Onde:

$$\gamma = \frac{\exp\left(\frac{z}{2}\right)-1}{\exp\left(\frac{z}{2}\right)+1} z = \frac{q_e v \psi_\delta}{(\kappa T)}$$

v é a valência dos contra-íons;

h é a menor distância de separação entre as superfícies das partículas;

$\kappa = ((8nv^2 q_e^2) / (\epsilon\kappa T))^{1/2}$ ou $\kappa = C_e^{1/2} 3 \cdot 10^9 / (0.31)m^{-1}$ com C_e sendo a concentração molar do sal.

Assim, a combinação entre a atração de van der Waals e a repulsão eletrostática leva a uma curva de energia potencial de interação com um máximo e pelo menos um mínimo em função da distância de separação, cujo perfil esquemático é mostrado na Figura 1-8.

Figura 1-8 Perfil esquemático de uma curva de energia total de interação entre partículas esféricas em função da distância de separação entre as partículas.

1.6 Tensão Superficial e Ângulo de Contato

Uma interface é como o nome sugere, uma fronteira entre fases. Pelo fato das interfaces serem muito finas, na maioria dos casos apenas alguns diâmetros moleculares de espessura, algumas vezes tendemos imaginá-las como bidimensionais, e negligenciamos a sua espessura. No entanto, a terceira dimensão é de grande significado. De fato, as rápidas mudanças na densidade e/ou composição através das

interfaces fornece a elas sua propriedade mais importante, um excesso de energia livre ou tensão lateral que é usualmente denominada tensão interfacial.

Quando três fases estão presentes, três interfaces são possíveis, uma para cada par de fluidos. Algumas vezes todas as três interfaces se encontram, e a junção delas forma uma curva conhecida como a linha de contato das três fases. Se uma das fases é um sólido, a linha de contato situa-se ao longo da superfície. Neste caso o ângulo que a interface fluida faz com a superfície sólida é chamado de ângulo de contato. Desde que ele determina as propriedades de molhamento dos sólidos pelos líquidos, o ângulo de contato é uma segunda propriedade fundamental importante nos fenômenos interfaciais [Clarence; Neogi, 1985].

Tensão interfacial (superficial) e ângulo de contato são duas grandezas diferentes, embora elas estejam estreitamente relacionadas. Tensão superficial descreve a interface entre duas fases, e o ângulo de contato descreve a borda da fronteira de duas fases onde ela termina numa terceira fase.

Duas fases devem ser especificadas para descrever a tensão superficial, três fases são necessárias para descrever ângulo de contato.

Como o próprio indica, tensão superficial (γ) é uma força que opera sobre uma superfície e age perpendicularmente para o interior das fronteiras da superfície, tendendo a diminuir a área da interface.

De fato, num líquido esta definição é apropriada, pois no mesmo as moléculas situadas no seu interior são em média, sujeitas a forças de atração iguais em todas as direções, ao passo que as moléculas situadas, por exemplo, numa superfície líquido-ar estão submetidas a forças de atrações não balanceadas ou não equilibradas no que resulta uma força em direção ao interior do líquido. O maior número possível de moléculas se deslocará da superfície para o interior do líquido: a superfície tenderá por isso a contrair-se espontaneamente. Isso explica porque gotículas de um líquido ou bolhas de um gás tendem a adquirir a forma esférica [Shaw, 1975].

Os vários efeitos de superfície podem ser expressos em relação à variação de energia livre de Gibbs (EG) sob um aspecto termodinâmico [Hiemenz, 1986].

Considerando o trabalho infinitesimal dW necessário para aumentar a área de uma certa superfície $d\sigma$, tem-se que infinitesimalmente ocorre a seguinte relação:

$$dW = \gamma \cdot d\sigma$$

no entanto, à temperatura (T) e a pressão (P) constantes, tem-se $dW = dG$.

Logo,

$$dG = \gamma \cdot d\sigma, \text{ onde } \gamma \text{ é a tensão superficial}$$

Assim, pode-se definir tensão superficial e energia livre superficial como o trabalho necessário para aumentar a superfície em uma unidade de área, por um processo isotérmico e reversível.

A partir disso tem-se a definição analítica de tensão superficial:

$$\gamma = \left(\partial G / \partial \sigma \right)_{T,P}$$

Desta forma tem-se duas interpretações que são equivalentes para a tensão superficial: força por unidade de comprimento de fronteira (abordagem geométrica) e energia por unidade de área da superfície (abordagem termodinâmica). De fato, as dimensões de energia por área ($\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$) e força por comprimento ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$) são equivalentes.

Resumindo, para interfaces fluido-fluido, γ pode ser considerada como a mudança de energia livre acompanhando a criação isotérmica e reversível de uma nova área superficial e desse modo γ pode ser considerada como a força necessária para estender a superfície. No entanto, este não é o caso para a superfície sólida [Blake, 1984]. Nos sólidos falta um mecanismo de ajuste ao equilíbrio termodinâmico e, além do mais, sua rigidez permite que eles mantenham um equilíbrio mecânico enquanto acomodam estados não uniformes de tensão ou deformação.

Uma definição alternativa de tensão superficial que pode ser aplicada tanto a sólidos como a líquidos é dada por:

$$\gamma = G^s - \sum_i \Gamma_i \cdot \mu_i$$

,onde G^s é a energia livre de superfície por unidade de área, e Γ_i é a adsorção específica do i-ésimo componente tendo um potencial químico μ_i .

Esta expressão envolve somente quantidades integrais que são indiferentes se o caminho feito para alcançá-las é isotérmico e reversível. Um último aspecto a ser considerado reside no fato da tensão superficial variar com a temperatura, onde com o aumento da temperatura há uma diminuição da tensão superficial (exceção feita para alguns metais), sendo que esta relação é quase linear.

Deste modo, em experimentos envolvendo tensão superficial se faz necessário que não ocorra grandes variações de temperatura.

Pode-se medir a tensão superficial de várias maneiras.

Os métodos para a medida de tensão superficial, ou tensão interfacial, podem ser divididos em [Rabockai, 1979]:

(1) Estáticos, por exemplo os métodos da ascensão capilar e da gota pendente.

(2) Dinâmicos, sendo que os métodos dinâmicos podem ser divididos em dois grupos:

(2.1) Métodos nos quais a superfície é rompida durante o processo de medida. Por exemplo, o método do anel, e o método da placa de Wilhelmy.

(2.2) Métodos nos quais a superfície se encontra em movimento durante a medida. São exemplos os métodos de escoamento e das ondas capilares.

Um dos objetivos deste trabalho é o de se estudar a variação da tensão superficial de dispersões de anfífilos que formam bicamadas fechadas (vesículas) em função do tempo de equilibração e da concentração. Será empregado para esta medida o método do anel de Du Noüy [Hiemenz, 1986].

Quando uma gota de um líquido é colocada sobre uma superfície sólida plana ela poderá espalhar-se como um filme mais ou menos uniforme, ou permanecerá como uma gota, com um ângulo de contato com a superfície sólida [Goodwin, 1993, Padday, 1993].

Medidas de ângulo de contato são usuais como um meio de caracterizar os estados físicos e químicos de superfícies complexas [Israelachvili; Gee, 1989]. A medida de ângulo de contato entre uma gota e uma superfície sólida pode esclarecer muitos processos importantes tais como molhabilidade, adsorção e adesão, e características da superfície incluindo heterogeneidades químicas, limpeza e orientação molecular [Hiemenz, 1986].

O ângulo de contato é definido como o ângulo (medido no líquido), formado na junção de três fases, por exemplo, junção sólido/líquido/gás.

Este pode ser determinado matematicamente a partir de tensões superficiais que podem ser encaradas como forças ao longo do perímetro de uma gota (figura 1-9, e equação abaixo), através da equação de Young [Hiemenz, 1986]:

Figuras 1-9 Componentes da Tensão Interfaciais necessários para a dedução da equação de Young.

$$\gamma_{s/v} = \gamma_{s/l} + \gamma_{l/v} \cos\theta, \quad \text{Eq. de Young}$$

onde, $\gamma_{s/v}$ é a tensão superficial na interfase sólido-gás

$\gamma_{s/l}$ é a tensão superficial na interfase líquido-gás

$\gamma_{l/v}$ é a tensão superficial na interfase sólido-líquido

θ é o ângulo de contato entre a gota e o sólido.

O sólido se mostrará completamente umedecido pelo líquido se o ângulo de contato for nulo, e somente parcialmente umedecido se o ângulo de contato tiver um valor finito.

A medida de ângulo de contato para gotas de tamanho crescentes dá origem ao ângulo de contato de avanço, θ_A e a medida do ângulo de contato de gotas de tamanho decrescentes dá origem ao ângulo de contato de recesso, θ_R .

Os ângulos de contato são estáticos ou dinâmicos dependendo se a fronteira líquido-sólido-ar é estacionária ou se move durante o processo de medição.

Para medidas de ângulos de contato estáticos o método mais utilizado é o da gota séssil ou gota pendente, onde uma gota é colocada sobre uma determinada superfície e o ângulo que ela forma com a superfície durante o avanço ou recesso é medido através de um aparato, o qual está descrito na secção 2-7. Este tipo de medida é relativamente simples.

Um aspecto muito importante a ser considerado é o fenômeno da histerese, definida como sendo a diferença entre o ângulo de contato de avanço θ_A e o ângulo de recesso θ_R [Hiemenz, 1986].

Superfícies de óxido de silício microeletrônico obtido por processo de oxidação térmica têm sido caracterizadas quanto a sua molhabilidade antes e após sofrerem um processo de polimento mecânico-químico [Thomas, et al, 1996].

Lâminas de silício típicas para uso em microeletrônica também têm sido caracterizadas pela técnica de ângulo de contato no que diz respeito à verificação da eficiência dos processos de limpeza de lâminas [Park; Raghavan, 1993; Verhaverbeke et al., 1993].

Algumas aplicações de caráter biotecnológico são o estudo da influência da molhabilidade de superfícies metálicas frente à adesão bacteriana, a qual é importante para a indústria de alimentos [Petermann et al., 1993], o estudo da adsorção de proteínas e da adesão bacteriana no copolímero polietilenoglicol-poliestireno [Holmberg et al, 1993], da adesão de proteínas em lâminas de silício de uso microeletrônico recobertas com diclorodimetilsilano [Mcguire; Krisdhasima, 1993], e o estudo do molhamento de superfícies poliméricas de poliestireno e do copolímero poli(estireno/metacrilato) frente a adsorção física de bicamadas de anfífilicos sintéticos tais como brometos, cloretos e acetatos de dioctadecildimetilamônio (DODAB, DODAC, DODAAc, respectivamente) [Lessa, 1996; Lessa; Carmona-Ribeiro, 1996].

Em cada um destes estudos a variação do ângulo de contato está intimamente relacionada com modificações das superfícies no que diz respeito ao molhamento, devido à adsorção de estruturas orgânicas ou bioorgânicas sobre as mesmas.

1.7 Látex

Desde seu surgimento, os látex se tornaram muito importantes no campo da química dos colóides, como um sistema modelo para o estudo de fenômenos fundamentais [Ottewill e Shaw, 1966].

As partículas esféricas e homodispersas eram sintetizadas por polimerização em emulsão [Bovey e Koithoff 1950]. O mecanismo aceito para polimerização em emulsão supunha dependência de tamanho e número de partículas formadas com a concentração de tensoativo de forma a se obter descontinuidades nestes parâmetros na região da

concentração micelar crítica (CMC) do emulsificante. A grande desvantagem do uso destas partículas era a etapa de purificação, que não garantia a retirada total do tensoativo.

Cargas negativas ou positivas puderam então ser introduzidas na superfície das partículas pelo uso de iniciadores como persulfato de potássio ou azobisisobutiramidina [Goodwin, Ottewill e Pelton, 1979], respectivamente.

A cinética de coagulação utilizando látex como modelo pode ser estudada por diversas técnicas experimentais [Ottewill e Shaw, 1966.; Higushi, Okada, Stelder e Lemberger, 1963] Recentemente, a cinética de coagulação foi também seguida por técnica que permite o fracionamento de agregados e sua determinação quantitativa [Takayasu e Galembeck, 1993]

Embora ainda sejam amplamente usados como modelos, a expectativa inicial sobre a idealidade dos látexes ficou seriamente abalada pela impossibilidade de se encontrar uma explicação razoável para o máximo encontrado na curva de potencial de superfície em função da força iônica [Midmore e Hunter, 1988]

A existência do máximo foi explicada pela presença de "cabelos" na superfície do látex. As cargas localizadas nas protusões poliméricas deslocam o plano de cisalhamento para longe da superfície do látex. O deslocamento do plano de cisalhamento reduz o valor do potencial zeta, ζ e por causa da probabilidade de condução iônica entre o plano de cisalhamento e a superfície, a mobilidade pode ser reduzida de maneira anômala. Estes efeitos são particularmente pronunciados a baixas concentrações de eletrólito. O problema da condutividade na superfície das partículas foi tratado teoricamente por Dukhin e Hunter [Dukhin, 1993; Midmore e Hunter, 1988].

Na preparação de látexes o estireno tem sido freqüentemente usado como monômero e um dos motivos é a conveniência de manuseio no laboratório, além de conduzir a partículas amorfas de poliestireno as quais são esféricas. As propriedades de superfície de um látex derivam de fragmentos de iniciadores. O persulfato de potássio mostrou ser um conveniente iniciador para polimerização do estireno e formação de partículas coloidais aniônicas. Para formar partículas coloidais catiônicas freqüentemente se utilizou o grupo azo (mostrado abaixo) do tipo: $XR - N = N - RX$, onde R = um grupo orgânico, geralmente alifático e heterocíclico, e X = a, dissociável e carregado. A decomposição térmica destes compostos libera nitrogênio e conduz à formação dos radicais livres, $\cdot RX$. Abaixo, representamos o iniciador hidrocloreto de

azobisisobutiramidina [Goodwin, Ottewill e Pelton, 1979] com o qual é possível produzir látexes catiônicos como o PSA usado neste trabalho.

Figura 1-10 A- poliestireno; B- hidrocloreto de azobisisobutiramidina, ABA. 2HCL (1, 2-azo-bis-(2-metilpropamidina)dicloreto.

1.8 Métodos utilizados - Princípios

1.8.1 Elipsometria

É uma sensível técnica ótica que pode ser usada para medir a espessura e o índice de refração de filmes finos em interfaces. Ela é baseada no fato que, em geral, um filme fino provoca mudança no estado de polarização de um feixe de luz elipticamente polarizado após ser refletido pela interface (Azzam e Bashara 1987).

Para a interpretação dos dados elipsométricos obtidos quando luz polarizada é refletida e transmitida por substratos limpos ou com filmes, recorre-se à teoria eletromagnética da luz para descrever as expressões dos coeficientes de amplitude complexa de reflexão e transmissão em termos das propriedades óticas que caracterizam o sistema em estudo.

1.8.1.1 Reflexão na interface plana entre dois meios isotrópicos

Com referência à figura 1-10, consideremos a reflexão oblíqua de uma onda plana na interface entre dois meios 0 e 1, homogêneos, óticamente isotrópicos com índices de refração N_0 e N_1 , respectivamente. É feita a hipótese que a mudança no índice de refração é abrupta através da interface. As notações aqui utilizadas para os vetores campo elétrico e índices de reflexão são aqueles recomendados na Conferência Internacional sobre Elipsometria (Universidade de Nebraska, 1968). A dependência temporal do campo eletromagnético é $e^{j\omega t}$. A propagação das ondas planas em um meio absorvente isotrópico é descrita pelos índices de refração complexo, $N = n - j k$, onde n é o índice de refração e k é o coeficiente de extinção do meio; p e s são as direções paralela e normal ao plano de incidência, adotadas para a polarização do vetor campo elétrico.

Figura 1-11 Reflexão e transmissão de uma onda plana entre dois meios semi-infinitos 0 e 1. Φ_0 e Φ_1 são os ângulos de reflexão e refração respectivamente. p e s são os eixos paralelo e perpendicular ao plano de incidência, respectivamente. A direção de propagação é definida pelo produto vetorial de vetores unitários na direção de p e s ($p \times s$).

A onda incidente do meio 0 gera uma onda refletida no mesmo meio e uma transmitida (ou refratada) no meio 1. O ângulo de incidência Φ_0 e o ângulo de refração Φ_1 são ambos medidos em relação a normal à interface. Os campos eletromagnéticos das ondas nos dois meios obedecem às leis de Maxwell e as condições de contorno. Para as CC serem satisfeitas, (1) as direções de propagação das ondas incidente, refletida e transmitida deverão estar em um mesmo plano, chamado plano de incidência, perpendicular à interface (é o plano da folha na fig.1-10), (2) o ângulo de incidência deverá ser igual ao ângulo de reflexão, e (3) os ângulos de incidência Φ_0 e Φ_1 serão relacionados pela lei de Snell,

$$N_0 \sin \Phi_0 = N_1 \sin \Phi_1 \quad (1.22)$$

Se os meios 0 e 1 são transparentes, de tal maneira que N_0 e N_1 são números reais, os ângulos Φ_0 e Φ_1 são também reais e o procedimento de como a onda plana é refletida ou transmitida é simples. Já, quando um ou ambos os meios é absorvente, ao ângulos Φ_0 e Φ_1 tornam-se em geral, complexos e conseqüentemente os campos tornam-se fisicamente mais complicados, embora o procedimento se mantenha.

Para uma dada amplitude e polarização da onda incidente, a amplitude e polarização das ondas refletida e transmitida podem ser determinadas da condição de continuidade das componentes tangencial dos vetores campo elétrico e magnético, através da interface.

É conveniente determinar as amplitudes das ondas refletidas e transmitidas em termos da onda incidente para as polarizações p e s somente[Azzam e Bashara 1987]. Seja (E_{ip}, E_{is}) (E_{rp}, E_{rs}) (E_{tp}, E_{ts}) as representações das amplitudes complexas dos vetores elétricos das componentes p e s das ondas refletida e incidente. Então, r_p e r_s , t_p e t_s , os coeficientes de amplitude complexa de Fresnel para as componentes p e s são:

$$r_p = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = \frac{N_1 \cos \Phi_0 - N_0 \cos \Phi_1}{N_1 \cos \Phi_0 + N_0 \cos \Phi_1} \quad (1.23); \quad t_p = \frac{E_{tp}}{E_{ip}} = \frac{2N_0 \cos \Phi_0}{N_1 \cos \Phi_0 + N_0 \cos \Phi_1} \quad (1.25);$$

$$r_s = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = \frac{N_0 \cos \Phi_0 - N_1 \cos \Phi_1}{N_0 \cos \Phi_0 + N_1 \cos \Phi_1} \quad (1.24); \quad t_s = \frac{E_{ts}}{E_{is}} = \frac{2N_0 \cos \Phi_0}{N_0 \cos \Phi_0 + N_1 \cos \Phi_1} \quad (1.26).$$

Para examinar separadamente o efeito de reflexão e transmissão sobre a amplitude e fase da onda, escrevem-se os coeficientes complexos de Fresnel como:

$$r_p = |r_p| e^{j\delta_{rp}}, \quad (1.27); \quad t_p = |t_p| e^{j\delta_{tp}} \quad (1.29);$$

$$r_s = |r_s| e^{j\delta_{rs}}, \quad (1.28); \quad t_s = |t_s| e^{j\delta_{ts}} \quad (1.30).$$

onde $|r_p|$, $|r_s|$, $|t_p|$ e $|t_s|$ são as razões das amplitudes das vibrações dos vetores campo elétrico, e os δ_r e δ_p as mudanças de fase sofridas pelas vibrações elétricas das componentes p e s, da onda refletida e transmitida.

A técnica da **Elipsometria de Reflexão** é baseada em medidas dos estados de polarização das ondas incidente e refletida através da determinação da razão ρ , fração de energia refletida, entre os coeficientes de reflexão de Fresnel para as polarizações p e s;

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} \quad (1.31).$$

É freqüente reescrever ρ na forma:

$$\rho = \text{tg}\Psi \, e^{j\delta} \quad (1.32),$$

onde a partir de (1.27), (1.28) e (1.31) vê-se que: $\text{tg}\Psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}$ e $\Delta = \delta_{rp} - j\delta_{rs}$.

Assim, Ψ e Δ determinam as mudanças diferenciais em amplitude e fase, respectivamente, experimentada sob reflexão pelas componentes vibracionais do vetor campo elétrico paralelo e normal ao plano de vibração.

1.8.1.2 Reflexão e Transmissão por um sistema de Múltiplas Interfaces

Um caso de considerável importância na elipsometria é aquele no qual luz polarizada é refletida e/ou transmitida por um substrato coberto por um único filme, segundo a figura 1-11.

Figura 1-12 Reflexão e transmissão de uma onda plana por um sistema de múltiplas interfaces. Meio ambiente (0)- filme (1)- substrato (2), com bordas paralelas ao plano. d_1 é a espessura do filme, Φ_0 é o ângulo de incidência no meio 0 e Φ_1 , Φ_2 são os ângulos de refração, respectivamente.

É considerada a hipótese que o filme tenha as bordas planas, paralelas, de separação de um (espessura do filme) e é localizada entre o ambiente semi-infinito (meio onde está imerso) e o substrato (meio onde o filme está depositado). O meio 0, o filme e o substrato são todos homogêneos e óticamente isotrópicos, com índices de refração N_0 , N_1 e N_2 respectivamente. Na maioria das vezes o meio de incidência é transparente e N_0 é real. Vamos considerar que quando a onda incidente encontra primeiro a interface 0-1, parte dela é refletida no meio 0 e parte é refratada no filme, de acordo com os coeficientes de reflexão e transmissão dados anteriormente (1.23 - 1.26). A onda refratada dentro do filme sofre múltiplas reflexões internas nas interfaces 1-2 e 1-0, as quais em geral, não são refletoras. Se os coeficientes de reflexão e transmissão de Fresnel nas interfaces 0-1 (1-0) e 1-2 são representados por r_{01} , t_{01} (r_{10} , t_{10}) e r_{12} , t_{12} respectivamente, as amplitudes complexas das ondas planas parciais sucessivas que formam a onda refletida resultante na meio 0 são dadas por r_{01} , $t_{01}t_{10}r_{12}e^{-j2\beta}$, $t_{01}t_{10}r_{10}r_{12}e^{-j2\beta}$, $t_{01}t_{10}r_{10}^2r_{12}^3e^{-j6\beta}$,, onde β é a mudança de fase sofrida pela onda multirefletida dentro do filme e é dada por:

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d_1}{\lambda} \right) N_1 \cos \Phi_1 \quad (1.33).$$

onde λ , é o comprimento de onda da luz no vácuo, d_1 espessura do filme, N_1 índice complexo de refração do filme e o ângulo de refração no filme, Φ_1 , é o ângulo entre a direção de propagação da onda em zig-zag no filme e a normal à superfície.

A adição das ondas parciais conduz a uma série geométrica infinita para a amplitude total refletida R:

$$R = r_{01} + t_{01}t_{10}r_{12}e^{-j2\beta} + t_{01}t_{10}r_{10}r_{12}^2e^{-j4\beta} + t_{01}t_{10}r_{10}^2r_{12}^3e^{-j6\beta} + \dots$$

Cuja soma dá:

$$R = r_{01} + \frac{t_{01}t_{10}e^{-j2\beta}}{1 - r_{10}r_{12}e^{-j2\beta}} \quad \text{ou} \quad R = \frac{r_{01} + r_{12}e^{-j2\beta}}{1 + r_{01}r_{12}e^{-j2\beta}} \quad (1.34)$$

,onde $r_{10} = r_{01}$ e $t_{10} = (1 - r_{01}^2)/t_{01}$, ao se trocar a direção de propagação da onda refletida no meio 1 e consequentemente N_0 por N_1 nas equações 1.23 e 1.26.

Escrevendo o coeficiente de reflexão total, R, em termos das componentes p e s:

$$R_p = \frac{r_{01p} + r_{12p}e^{-j2\beta}}{1 + r_{01p}r_{12p}e^{-j2\beta}}, \quad R_s = \frac{r_{01s} + r_{12s}e^{-j2\beta}}{1 + r_{01s}r_{12s}e^{-j2\beta}} \quad (1.35)$$

onde β é o mesmo para ambas componentes p e s e é dada por (1.33). Os coeficientes de reflexão de Fresnel nas interfaces 0-1 e 1-2 que aparecem em (1.23) e (1.24) são adaptados para esse sistema:

$$\begin{aligned} r_{01p} &= \frac{N_1 \cos \Phi_0 - N_0 \cos \Phi_1}{N_1 \cos \Phi_0 + N_0 \cos \Phi_1}; \quad r_{01s} = \frac{N_1 \cos \Phi_0 - N_0 \cos \Phi_1}{N_1 \cos \Phi_0 + N_0 \cos \Phi_1} \\ r_{12p} &= \frac{N_2 \cos \Phi_1 - N_1 \cos \Phi_2}{N_2 \cos \Phi_1 + N_1 \cos \Phi_2}; \quad r_{12s} = \frac{N_1 \cos \Phi_1 - N_2 \cos \Phi_2}{N_1 \cos \Phi_1 + N_2 \cos \Phi_2} \end{aligned} \quad (1.36)$$

Onde os 3 ângulos Φ_0 , Φ_1 e Φ_2 entre as direções de propagação nos 3 meios respectivamente, e a normal à superfície do filme são interrelacionados pela lei de Snell (1.22):

$$N_0 \sin \Phi_0 = N_1 \sin \Phi_1 = N_2 \sin \Phi_2$$

Para examinar a mudança de amplitude e fase separadamente, quando uma onda é obliquamente refletida de um substrato recoberto por um filme, os coeficientes de amplitude complexa para as componentes p e s são escritos em termos de seus valores absolutos:

$$R_p = |R_p| e^{-j\Delta_{rp}} \quad \text{e} \quad R_s = |R_s| e^{-j\Delta_{rs}},$$

Onde, R_p , R_s , Δ_{rp} e Δ_{rs} representam a atenuação na amplitude e variação de fase respectivamente, quando a luz polarizada p e s é refletida pelo substrato-filme.

A partir das equações (1.36) é evidente que, devido os coeficientes de Fresnell de reflexão para as componentes p e s serem diferentes, que os coeficientes de reflexão total de um sistema ambiente-filme-substrato para estas duas polarizações sejam também diferentes. Esta é a base da **elipsometria de reflexão**, onde uma mudança de polarização sob reflexão acontece devido à diferença em atenuação de amplitude e variação de fase experimentada pelas componentes p e s.

O elipsômetro mede a quantidade ρ que é a razão entre os coeficientes de reflexão de amplitude complexa total R_p e R_s das componentes p e s. Usando as expressões da equação 1.35 temos que:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \frac{r_{01p} + r_{12p} e^{-j2\beta}}{1 + r_{01p} r_{12p} e^{-j2\beta}} \times \frac{1 + r_{01s} r_{12s} e^{-j2\beta}}{r_{01s} + r_{12s} e^{-j2\beta}} = \text{tg}\Psi \text{e}^{j\Delta_r} \quad \text{ou} \quad \text{tg}\Psi \text{e}^{j\Delta_r} = \frac{R_p}{R_s} \quad (1.37).$$

Onde, os coeficientes de reflexão de Fresnel nas interfaces meio-filme (r_{01p} , r_{01s}) e filme-substrato (r_{12p} , r_{12s}) são dados por 1.36 e a fase β por 1.33. A equação 1.37 relaciona os ângulos elipsométricos Ψ e Δ , determinados experimentalmente através das leituras dos polarizadores A e P respectivamente, com as propriedades óticas do sistema trifásico: N_0 , N_1 , N_2 assim como, com a espessura do filme d_1 , o comprimento de onda λ do feixe incidente e o ângulo incidente Φ_0 . Portanto, a dependência funcional de Ψ e Δ sobre os parâmetros do sistema pode ser simbolicamente escrita como :

$$\text{tg}\Psi \text{e}^{j\Delta_r} = \rho (N_0, N_1, N_2, d_1, \Phi_0, \lambda) \quad (1.38)$$

onde ρ na realidade é dependente de nove argumentos reais: A parte real e imaginária dos 3 índices de refração complexos, λ , d_1 , Φ_0 . Portanto, para obtenção de 2 parâmetros como, espessura d_f e índice de refração n_f de um filme adsorvido sobre substrato a partir da equação fundamental da elipsometria, 1.37, é necessário cálculos interativos com matrizes de Jones (Azzam e Bashara, 1987) para os coeficientes de reflexão total das componentes p e s, onde N_0 pode ser obtido por um refratômetro Abbé ou extraído da literatura e N_2 , índice de refração do substrato, sempre obtido por elipsometria a partir dos ângulos Ψ e Δ medidos em ar e água. Como d_f e n_f não podem ser obtidos diretamente escolhe-se um valor para n_f que deve estar entre os valores dos índices do solvente puro e do filme puro. Os coeficientes de reflexão de Fresnel, 1.36, para cada interface podem então ser determinados. A partir daí, o **coeficiente total de amplitude complexa de reflexão** ρ , pode ser calculado, usando as matrizes de Jones. O resultado reduz-se a uma equação quadrática complexa para a espessura desconhecida d_f do filme, cuja solução geralmente é uma quantidade complexa. Variando sistematicamente os valores de n_f como descrito acima, minimiza-se sua parte imaginária e conseqüentemente se atinge um valor de d_f e n_f onde a parte imaginária de d_f é mínima ou zero.

1.8.2 Mobilidade eletroforética -Potencial Zeta

A maioria das substâncias adquire uma carga elétrica superficial quando colocada em um meio polar, como o aquoso, por exemplo. Os possíveis mecanismos de obtenção dessas cargas são a ionização, a adsorção de íons e a dissolução iônica. Esta carga superficial adquirida influencia a distribuição de íons próximos, no meio polar. Íons de carga oposta (contra-íons) são atraídos para a superfície e íons de mesma carga (co-íons) são repelidos. Incluindo a isso o movimento térmico, tem-se a formação de uma **dupla camada elétrica** feita pela superfície carregada e um excesso neutralizante de contra-íons sobre os co-íons, distribuídos de uma maneira difusa no meio polar.

A teoria da **dupla camada elétrica** trabalha com esta distribuição de íons, assim como com a intensidade dos potenciais elétricos na superfície carregada e no restante do meio.

O modelo de Gouy e Chapman, para a parte difusa da bicamada, (fig. 1-12) considera que:

- _ A superfície carregada é plana, de comprimento infinito e uniformemente carregada.
- _ Os íons na parte difusa, são consideradas cargas pontuais, distribuídos segundo a distribuição de Boltzman
- _ O solvente influencia a bicamada somente através de sua constante dielétrica, a qual é considerada constante em toda a parte difusa.

Figura 1-13 Representação esquemática de uma dupla camada difusa

ϕ_0 é o potencial elétrico na superfície plana e ϕ é o potencial em uma distância x da superfície na solução eletrolítica.

Aplicando a distribuição de Boltzman temos que:

$n_+ = n_0 \exp(-ze\phi/kT)$ e $n_- = n_0 \exp(ze\phi/kT)$, onde $-ze\phi$ e $ze\phi$ representam as energias potenciais e n_+ e n_- são os respectivos números de íons positivos e negativos por unidade de volume em pontos onde o potencial é ϕ e n_0 é a correspondente concentração de cada espécie no seio da solução.

Seja ρ , a densidade volumétrica resultante de carga: $\rho = ze(n_+ + n_-)$ Aplicando a Equação de Poisson para o potencial: $\delta^2\phi/\delta^2x = -\rho/\epsilon$, e adotando as condições de contorno: $\phi=\phi_0$, $x=0$ e $\phi=0$ e $d\phi/dx=0$, quando $x \rightarrow \infty$ e a aproximação de Debye-

Huckel: $\exp[ze\phi_0/2kT] \approx 1 + ze\phi_0/2kT$, temos para o potencial: $\phi = \phi_0 \exp(-kx)$, onde $k = (2e^2N_A c z^2 / \epsilon kT)^{1/2}$ e ϕ_0 o potencial na superfície.

Para a parte interna da dupla camada Stern propôs um modelo no qual a dupla camada é dividida em duas partes separadas por um plano (plano de Stern), localizado acerca de um raio hidratado de íon da superfície carregada, considerando também a possibilidade de adsorção de íons neste plano (Fig. 1-13)

Figura 1-14 Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica, segundo a teoria de Stern.

Onde ϕ_d é o potencial no plano de Stern e os íons adsorvidos (por interação eletrostática e/ou por forças de van der Waals, suficientemente fortes para vencer a agitação térmica), ficam na camada de Stern, região entre a superfície e o plano de Stern. Àqueles que têm centros além do plano formam a parte difusa da dupla camada onde o modelo de Gouy- Chapman é aplicado. δ é a largura da camada

Um pouco além do plano de Stern, incluindo a solução eletrolítica, fica o plano de cisalhamento (Shear plane) que define a unidade eletrocinética que é constituída pela partícula mais moléculas e íons ligados à superfície, e que se move com ela quando é deslocada por movimento browniano ou sob a influência de força elétrica. O potencial eletrocinético é chamado de potencial Zeta ζ . Percebe-se que ele é um pouco menor que o potencial ϕ_d . Geralmente, se considera o potencial Zeta igual ao potencial de Stern, com uma pequena margem de erro. O mesmo não acontece em altas concentrações eletrolíticas e altos potenciais.

O Zeta Potencial Analyzer, instrumento utilizado neste trabalho para medir potencial zeta, trabalha com o fenômeno da Eletroforese, que corresponde ao movimento da unidade electrocinética (superfície carregada + íons ligados) em relação ao líquido estacionário, sob a ação de um campo elétrico externo. Na figura 1-14 mostramos o esquema ótico usado na determinação do potencial Zeta.

Figura 1-15 Sistema ótico utilizado na medição do potencial Zeta

Como já vimos anteriormente, partículas dispersadas em um líquido, freqüentemente adquirem uma carga superficial. Se aplicarmos um campo no líquido, as partículas carregadas mover-se-ão na direção do pólo positivo ou negativo deste campo (Eletroforese). A direção selecionada pelas partículas é uma clara indicação do sinal da carga que elas carregam. A velocidade com que estas cargas se movimentam sob a ação do campo, numa certa faixa de tamanho, depende da quantidade de carga que elas apresentam.

Ao se aplicar um campo pulsado de baixa intensidade no líquido, teremos as partículas se movendo ora para um lado ora para o outro. Ao incidir um feixe de luz laser com freqüência devidamente ajustada em 250 Hz (Manual de instruções, Brookhaven, 1997), teremos espalhamento de luz, cuja freqüência (Efeito Doppler) será proporcional à velocidade da partícula, que por sua vez será proporcional à carga, considerando uma certa faixa de tamanho.

Seja V_{ef} – velocidade eletroforética ou velocidade de deslocamento, então:

$$V_{ef} = \mu_{ef} E, \text{ onde } \mu_{ef} - \text{mobilidade eletroforética}$$

E - intensidade do campo elétrico aplicado

Com o campo dado, mede-se a velocidade eletroforética e calcula-se a mobilidade. A partir da mobilidade eletroforética e a aproximação de Smoluchowski abaixo, o potencial Zeta é determinado.

$$\mu_{ef} = \epsilon_r \epsilon_0 \zeta / \eta \rightarrow \zeta = \eta \mu_{ef} / \epsilon_r \epsilon_0, \quad ka \gg 1, \quad \text{Aproximação de Smoluchowski}$$

μ_{ef} = mobilidade eletroforética

ϵ_r = permissividade elétrica relativa do meio

ϵ_0 = permissividade elétrica do vácuo

ζ = Potencial Zeta, onde o limite $ka \gg 1$, corresponde à hipótese da dupla camada associada à partícula, ser tratada como uma superfície plana carregada.

Para medidas de pequenas mobilidades eletroforéticas, o Zeta Potencial Analyzer utiliza a análise de fase de luz espalhada (PALS), para determinação da mobilidade eletroforética, μ_{ef} e, a partir disso, usando a aproximação de **Smoluchowski** calcular o potencial. Na figura 1.15 apresentamos o esquema PALS.

Figura 1-16 Esquema PALS

Onde, $\vec{E}(t)$ é o campo oscilante dado, $\Delta Q(t)$ é a variação de fase sofrida pela luz espalhada, $\vec{q}$ o vetor de onda, com $|\vec{q}| = 4\pi n_0 / \lambda_0 \sin \theta/2$, onde:

n_0 é o índice de refração do líquido

λ_0 comprimento de onda da luz laser no vácuo e θ é o ângulo de espalhamento.

A partir da aplicação do campo $E(t)$ oscilante, mede-se a diferença de fase $\Delta Q(t)$ da função e, através de ajustes feitos internamente pelo sistema ótico do aparelho (demodular cada novo ciclo para remover termo linear V_c , ajustar a função retificada para termo residual linear mais termo oscilante) determina-se a mobilidade eletroforética média e finalmente, o potencial Zeta é calculado.

O potencial Zeta é útil na determinação de:

- cargas sobre partículas
- mudança da carga sobre as partículas com o tempo
- medida do ponto isoelétrico e estabilidade
- efeito de força iônica e pH em líquidos polares, etc.

1.8.3 Espalhamento de luz

Quando a radiação eletromagnética atinge uma partícula, o vetor campo elétrico da onda de luz interage com os átomos nela contido, retirando os elétrons da posição de equilíbrio, e induzindo à formação de um dipolo momentâneo, de magnitude determinada pela polarizabilidade α do material. A polarizabilidade de uma esfera, de índice de refração n e raio a é proporcional ao seu volume, sendo dada por:

$$\alpha = 4 \pi \epsilon_0 a^3 (n^2 - 1) / (n^2 + 1) \quad (1.39)$$

Uma vez que a partícula é pequena, comparada ao comprimento da onda de luz, pode-se considerar que, em qualquer instante, toda a extensão da partícula está sujeita ao mesmo campo elétrico. O vetor elétrico da onda luminosa flutua em magnitude com uma frequência ν , e devido a isto, o dipolo também irá flutuar, com a mesma frequência ν , embora não necessariamente em fase. Um dipolo flutuante emite energia continuamente, na forma de radiação eletromagnética de frequência ν , e assim ocorre o espalhamento de luz.

1.8.3.1 Espalhamento de Rayleigh

A teoria de Rayleigh sobre o espalhamento se aplica a partículas esféricas de dimensão muito menor que o comprimento de onda da luz incidente.

Quando uma onda eletromagnética de intensidade I_0 e comprimento de onda λ incidir sobre uma pequena partícula ($R \approx \lambda/20$) de polarizabilidade α , dipolos oscilantes são induzidos na partícula, como vimos anteriormente. Esta partícula então, atuará como uma fonte secundária para a emissão de radiação espalhada de mesmo λ que a luz incidente.

Para um feixe de luz não polarizado, a intensidade I_0 em uma distância r da fonte espalhadora de luz, em um ângulo θ em relação à direção do feixe incidente, de intensidade I_0 , é dada por:

$$I_\theta / I_0 = 8 \pi^4 \alpha^2 (1 + \cos^2 \theta) / (4\pi\epsilon_0)^2 \lambda^4 r^2 \quad (1.40)$$

Onde I_0 é a intensidade da radiação incidente não polarizada, de comprimento de onda λ , que incide sobre a partícula, e α é a polarizabilidade do material que forma a partícula. O ângulo θ é aquele formado entre o feixe de radiação espalhado, sendo que a intensidade I é medida a uma distância r da partícula, conforme ilustra a figura 1.16

Figura 1-17 Arranjo experimental básico utilizado em experimentos de espalhamento de luz

A intensidade de luz espalhada em um ângulo θ por um número de partículas por unidade de volume, N_p , é dada por:

$$I_\theta / I_0 = 9 \pi^2 (n_1^2 - n_0^2)^2 v^2 N_p (1 + \cos^2 \theta) / 2 \lambda^4 r^2 (n_1^2 + 2 n_0^2)^2 \quad (1.41)$$

Onde v é o volume de uma partícula. Nesta equação, os termos 1 e $\cos^2 \theta$ referem-se, respectivamente, às componentes polarizadas vertical e horizontal de luz espalhada. Desta forma, quando $\theta = 90^\circ$, apenas a luz polarizada verticalmente é visível,

conforme a figura 1-17. A equação (1.41), também demonstra que o espalhamento é fortemente dependente do tamanho da partícula, do comprimento de onda da luz incidente e do ângulo de detecção.

Figura 1-18 Intensidade (I_0) de luz espalhada por uma partícula esférica pequena ($a \ll \lambda$) localizada na origem O, em função do ângulo de espalhamento (teoria de Rayleigh). As distâncias da origem às linhas i, ii e iii representam as intensidades relativas da componente polarizada verticalmente, horizontalmente, e a luz espalhada total, respectivamente.

1.8.3.2 Medidas de tamanho médio de partículas, através de espalhamento dinâmico de luz.

Espectroscopia de correlação de fótons (PCS) é uma técnica de espalhamento dinâmico quase-elástico de luz, comumente usada para caracterizar partículas coloidais de tamanhos na faixa de submícrons a nanômetros. Radiação laser em partículas coloidais em movimento Browniano produz flutuações desordenadas no sinal de intensidade de luz espalhada, com um procedimento temporal dependente do tamanho e forma da partícula. A dependência temporal das flutuações pode ser determinada por autocorrelação do sinal de intensidade espalhada. Para partículas esféricas, a função de autocorrelação decai exponencialmente com uma constante de decaimento Γ proporcional ao coeficiente Browniano médio de difusão, D_0 , das partículas, que por sua vez está relacionado com o seu tamanho (raio hidrodinâmico). No limite de baixa concentração de partículas, interações hidrodinâmicas podem ser desprezadas, e o diâmetro médio da partícula, d , pode ser calculado, usando a equação de Stokes-Einstein [Hanus; Ploehn, 1999]:

$$D_0 = k_b T / 6 \pi \eta(t) d \quad (1.42)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann (1.38054×10^{-16} ergs/deg), T é a temperatura em ° K, $\eta(t)$ (em centésimos de poise) é a viscosidade do solvente.

As partículas, fontes secundárias de luz espalhada, estão em movimento Browniano, assim a distância percorrida pelas ondas espalhadas até o detector varia com o tempo. As ondas eletromagnéticas podem interferir construtivamente ou destrutivamente, dependendo da distância ao detector. O resultado é uma intensidade média de espalhamento com flutuações superpostas, conforme mostra a figura 1-18 abaixo.

Figura 1-19. Flutuações de luz espalhada

O tempo de decaimento das flutuações está relacionado com o coeficiente de difusão, D_0 , das partículas, que por sua vez depende do raio hidrodinâmico. As partículas pequenas com coeficiente de difusão maior produzem flutuações com decaimentos mais rápidos que as partículas maiores, que se movem mais devagar.

No espalhamento quase-elástico de luz, o tempo de decaimento dessas flutuações é medido, usando um correlator, cuja função de autocorrelação é formada pela média dos produtos das intensidades espalhadas medidas em pequenos intervalos de tempo (delay time), comparados com o tempo necessário para a flutuação voltar (decair) ao valor médio de intensidade espalhada. Quando t aumenta a correlação é perdida, e a função aproxima-se de um valor médio B . Para tempos pequenos a correlação é alta.

Para uma suspensão monodispersa de partículas esféricas, globulares, rígidas, a função de autocorrelação é dada por:

$$C(t) = A e^{-2\Gamma t} + B \quad (1.43),$$

Onde A é uma constante ótica, determinada pelo aparelho e Γ é relacionada ao tempo de relaxação das flutuações por: $\Gamma = D_0 q^2$, (1.44)

Com D_0 = coeficiente de difusão das partículas; $\mathbf{q}$ vetor de onda da luz espalhada, dado por: $|\mathbf{q}| = 4 \pi n / \lambda_0 \sin \theta / 2$.

A partir de medidas da função de autocorrelação, determina-se Γ através do ajuste da função à $C(t)$. Com isso, calcula-se o coeficiente de difusão, D_0 , a partir de λ_0 , n e θ dados.

Finalmente, obtêm-se o diâmetro da partícula, usando a relação de Stokes-Einstein:

$$D_0 = k_b T / 6 \pi \eta(t) d \quad (1.45)$$

O software MAS OPTION (Manual de Instrução – Potencial Zeta, Brookhaven, 1999), instalado no Zeta Potencial Analyzer (instrumento de medidas de potencial Zeta e diâmetros de partículas, descrito na secção 2-9), faz as medidas das intensidades espalhadas nos pequenos intervalos de tempo, ajusta a função $C(t)$, calcula D_0 e d automaticamente.

A função de autocorrelação é mais complexa que a apresentada na equação (1.43), a qual é adotada para sistemas monodispersos de partículas rígidas esféricas. Quando a amostra é constituída de esferas de tamanhos variáveis, um sistema polidisperso, a função $C(t)$ da equação 1.43 é modificada. Cada tamanho de partícula contribui com sua própria exponencial, de tal forma que para a amostra temos a seguinte função:

$$g(t) = \int G(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (1.46)$$

A solução desta equação, Equação da Transformada de Laplace, não é trivial. Vários métodos têm sido desenvolvidos para obtenção da solução de $g(t)$, utilizando diversos modelos para as distribuições de partículas. Entre elas podemos citar: Ajuste para uma distribuição conhecida, Análise de cumulantes, Transformada inversa de Laplace, entre outras. O Zeta Plus, através do software MAS OPTION, utiliza para seus cálculos da função de autocorrelação o método mais geral, Análise de cumulantes, [Berne e Pecora, 1976; Instruction Manual, Brookhaven, 1997]. Neste método nenhuma hipótese é feita acerca da forma da função de distribuição. A exponencial da equação

1.46 é expandida em uma série de Taylor em torno do valor médio. A série resultante é integrada para dar um resultado mais geral, o qual mostra que o logaritmo da função de autocorrelação pode ser expresso como um polinômio no tempo (delay time). Os coeficientes das potências de t são chamados de cumulantes da distribuição, os quais durante uma medida com o MAS OPTION, geram os resultados cumulantes que são: diâmetro efetivo e índice de polidispersidade, que por sua vez são usados para calcular os dois parâmetros da distribuição Lognormal, escolhida pelo programa para representar a distribuição por peso dos diâmetros das partículas.

Grabowski e Morrison [Grabowski e Morrison, 1983] formularam uma aproximação mais complexa para $g(t)$, denominado algoritmo de mínimos quadráticos não negativos (NNLS), aplicada à análise de distribuições multimodais de tamanho (MSD), a qual encontra-se como opção para determinação de tamanho no MAS OPTION [Instruction Manual, Brookhaven, 1997] .

Abaixo, estão representados dois resultados de tamanhos de partículas poliméricas revestidas de lipídios, usando os dois métodos citados acima que são: (A)- Distribuição Lognormal- Análise de cumulantes e (B)- Distribuição multimodal de tamanhos (MSD)- mínimos quadráticos não-negativos (NNLS).

A

DODAB 0.04 mM + PSS-100 nm 2 (Combined)

Effective Diameter: 124.9 nm
Polydispersity: 0.063
Avg. Count Rate: 942.2 kcps
Sample Quality: 9.7
Elapsed Time: 00:05:00

Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Sample Quality
1	126.1	34.8	0.076	7.8
2	125.5	35.2	0.079	8.0
3	124.8	34.2	0.075	7.9
4	124.2	29.5	0.057	9.0
5	126.6	12.2	0.009	6.8
6	122.9	26.4	0.046	6.3
7	123.5	44.8	0.132	9.7
8	124.9	30.3	0.059	8.2
9	123.7	32.6	0.070	9.7
10	122.6	49.0	0.159	6.7
Mean	124.5	32.9	0.076	8.0
Std. Error	0.4	3.2	0.013	0.4
Combined	124.9	31.4	0.063	9.7

B

Figura 1-20 (A) Representação gráfica de Distribuição Log-normal de diâmetros de partículas. (B) Distribuição multimodal de diâmetros (MSD), seguida de uma tabela com os tamanhos e os respectivos pesos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e Materiais

- **L- α Fosfatidilcolina** : solução etanólica (mãe) 100 mg/ml, produzida pela Sigma Chemical Co.
- **DHP – Dihexadecilfosfato de sódio** – obtido da Sigma e utilizado sem purificação prévia.
- **DODAB – Sal de brometo de dioctadecildimetilamônio** obtido da Sigma e utilizado sem purificação prévia.
- **DODAC – Sal de cloreto de dioctadecildimetilamônio** obtido por troca iônica a partir de DODAB em resina Amberlyst. A-26 (Rohm and Haas Company. Philadelphia , Pa), na forma de cloreto e recristalizado em mistura 1:1 de éter e acetona para retirada de impurezas.
- **DODAAc – Sal de acetato de dioctadecildimetilamônio** obtido por troca iônica a partir de DODAB em resina Amberlyst. A-26, na forma de acetato e recristalizado em mistura 1:1 de éter e acetona.
- **Microesferas de poliestireno** – Microesferas carregadas de poliestireno em solução aquosa, foram obtidas da Interfacial Dynamics Corp.(Portland; Or) (IDC), e assim utilizadas. Estas microesferas são estabilizadas eletrostaticamente por grupos funcionais carregados positivamente e negativamente (seção 1.7). Neste trabalho utilizamos microesferas estabilizadas por sulfato (**PSS**), carregado negativamente e amidina (**PSA**), carregado positivamente. Na tabela 2 apresentamos suas propriedades.
- **Lâminas de Silício** - fornecidas pela Crystec (Berlin, Germany) recobertas com uma natural camada de óxido, de espessura aproximada de 2 nm.
- **Água Mili-Q** - foi utilizada no preparo de todas as soluções bem como nos experimentos de adsorção.
- **TMCS** - Trimetilclorosilano produzido pela Fluka (Suíça).
- **NaCl, Etanol e Tolueno Pa**, obtidos da Merck (Alemanha).
- **Ácido Perclórico** concentrado; Soluções de **molibdato de amônio 1,25 %**
- **Ácido ascórbico 5%** (conservado congelado); Solução padrão de **NaH₂PO₄** (mantido congelado), obtidos da Merck (Alemanha).

Látex	Mean diameter (nm)	Particle number density (cm ⁻³)	Area per charge group (nm ²)	Specific surface área (cm ² g ⁻¹)
PSA	193	2.03 x 10 ¹³	3.74	294673
PSS	100	1.55 x 10 ¹⁴	17.6	571048
PSS	711	4.52 x 10 ¹¹	2.26	79989
PSA*	190	1.1 x 10 ¹³	3.80	300000

Tabela 2 Propriedades de microesferas de poliestireno sulfato (PSS) e poliestireno amidina (PSA) em água antes de serem usadas no preparo de filmes poliméricos. Partículas de PSA usadas para obter isoterma de adsorção para DHP são indicadas por (*).

2.2 Equipamentos

Elipsômetro, é um instrumento ótico que mede as mudanças no estado de polarização da luz devido à reflexão.

Medidas elipsométricas de espessura foram realizadas usando um elipsômetro vertical de modelo DRE-EL02 Ellipsometer (Ratzeburg, Germany). O instrumento é automatizado por motores de passo controlados por computador, acoplados aos polarizadores, conforme figura 2-1. Um laser He-Ne ($\lambda = 632.8$ nm) foi usado como fonte de luz e o ângulo de incidência foi fixado em 70.0 °, que corresponde a uma melhor sensibilidade do aparelho.

A condição de elipsometria nula é obtida, usando no início do percurso ótico um polarizador automatizado por computador que transforma a luz laser em luz elípticamente polarizada. Com a reflexão do substrato, sob uma determinada condição de ângulo de incidência (ângulo de Brewster), a luz passa a ser linearmente polarizada. A intensidade da luz refletida é então minimizada por um segundo polarizador (analisador), o qual é automaticamente ajustado via computador, até um mínimo de luz alcançar a fotomultiplicadora. O ajuste nulo para o polarizador define o ângulo elipsométrico Δ ($\Delta = 2P + 90^\circ$) e para o analisador o ângulo elipsométrico Ψ ($\Psi = A$), os quais contêm informações a cerca da variação relativa de fase e atenuação das amplitudes das componentes p e s das ondas incidente e refletida. Os ângulos elipsométricos experimentais Δ e Ψ , obtidos em temperatura controlada (22 - 23 ° C) foram medidos e registrados em intervalos de 4 s. Para a interpretação desses ângulos foi usado um modelo de multicamadas composto pelo substrato, uma camada

desconhecida e o meio ambiente. A partir da caracterização do meio ambiente e do substrato é possível determinar a espessura d_f e índice de refração n_f do filme utilizando os ângulos Δ e Ψ na equação fundamental da elipsometria (1.5.2.5) e os cálculos iterativos com as matrizes de Jones [Azzam e Bashara, 1987].

Figura 2-1 Representação esquemática de um Elipsômetro Automatizado

Dynamometer (BYK - Labotron, Germany). Projetado para ser utilizado como tensiômetro, balança de sedimentação, densímetro. Neste trabalho, o equipamento foi utilizado para medidas de tensão superficial. O Dynamometer mede uma certa força nas duas direções de ação, levantando ou abaixando uma plataforma onde é colocado o recipiente com o líquido cuja propriedade se quer determinar.

Figura 2-2 Dinamômetro

Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corp. Holtsville, NY), é um instrumento automático designado para uso com suspensões de partículas de tamanhos variando de 10 nm a 30 μ m. O software usado para controle do instrumento e análise de dados foi escrito para uso no Microsoft Windows ainda que uma versão DOS seja também disponível [Manual de instrução, Brookhaven, 1997]. A técnica empregada de espalhamento eletroforético de luz, é baseada na análise das diferenças de fase da luz espalhada (PALS).

Especificações:

Faixa de potencial Zeta:	-150 a + 150 mV
Faixa de tamanhos:	10 nm a 30 μ m (dependendo da densidade partícula)
Precisão:	$\pm 2\%$
Reprodutibilidade:	$\pm 2\%$
Fonte de luz:	laser de 30 mW , estado sólido, de $\lambda = 532$ nm
Controle de temperatura:	6 °C a 74°C em passos de 0.1°C
Volume da amostra:	1.5 mL
Tempo de medida:	tipicamente de 1 a 2 minutos.
Resultados:	valores modais para potencial Zeta e mobilidade eletroforética e distribuições de potencial Zeta

O Zeta Plus Analyzer apresenta a opção de medida de tamanho médio de partículas, para isso utiliza o software MAS Option, para medir diâmetros de partículas na faixa de 2 nm a 3 μ m. Ele é escrito para uso no M. Windows, apesar de uma versão DOS estar também disponível.

A técnica empregada – Espectroscopia de correlação de fótons de espalhamento quase-elástico de luz dinâmico é baseada na correlação das flutuações de intensidade de luz laser espalhada pela amostra, em torno de um valor médio de intensidade.

Especificações:

Faixa de tamanhos medidos:	2 nm a 3 μ m
Controle de temperatura:	5 °C a 75 °C
Volume da amostra:	0.5 a 3 mL
Resultados:	Diâmetros médio e desvio médio são calculados para a distribuição de tamanho por peso, assumindo uma distribuição lognormal. Análise de distribuição multimodal de tamanho (MSD) é opcional.

Espectrofotômetro- Hitachi modelo U-2000 de feixe duplo. O equipamento é acoplado a um registrador gráfico para registro contínuo de medidas de absorbância em função do tempo ou do comprimento de onda.

Especificações:

Fonte de luz:	Na faixa de UV-VIS (190-1100 nm) com precisão de ± 0.4 nm
Precisão na absorbância:	Na escala de 0.0 a 0.5 ± 0.002 Na escala de 0.5 a 1.0 ± 0.004
Reprodutibilidade:	0.001 de absorbância na escala de 0 a 0.5 0.002 de absorbância na escala de 0 a 1.0

Sonicador-Lab-Line Ultra Tip, utilizado no preparo de vesículas pequenas de DODAB, DODAC, DODAAc e DHP.

Centrífuga refrigerada - modelo Himac SCR 20B da Hitachi, com velocidade de rotação entre 0 a 2000 rpm e temperatura entre -10 e 40 °C.

Microcentrífuga – Eppendorf - modelo 540, refrigerada, com velocidade de rotação entre 1000 e 14000 rpm e temperatura entre -9 e 40 °C.

Spin-Coater – Spinner Headway PWM 32-PS-R790 (Garland, USA), aparelho usado para revestimento rotacional de filmes planos.

Câmera fotográfica digital Cássio QV10 - usada para medida de ângulo de contato pelo método da gota sésil.

2.3 Métodos Experimentais:

2.3.1 Preparação dos filmes poliméricos

Lâminas de silício, usadas como suporte para os filmes poliméricos, foram obtidas da Crystec (Berlin, Germany) com uma camada óxida natural de ~2 nm de espessura. Parte dessas lâminas foram funcionalizadas com gotas de trimetilclorosilano, TMCS, e incubadas a 70 °C por uma hora. Depois de uma hora, as amostras foram lavadas três vezes em tolueno puro e secas sob um feixe de N₂. A espessura da camada de silano, medida por elipsometria, variou de 0.5 a 0.9 nm. O restante das lâminas foi lavado com água Mili-Q antes de ser utilizado.

Para obtenção dos filmes poliméricos foram utilizadas dispersões aquosas de partículas de látex, PSS e PSA, com diâmetros de 100, 711 e 193 nm respectivamente. As dispersões foram secas em vácuo até atingirem peso constante. Em seguida, foram dissolvidas em tolueno a uma concentração final de 8mg/ml e depositadas, por revestimento rotacional ("spin coating"), sobre as lâminas de silício, a uma velocidade de 3000 rpm durante 30 segundos. As espessuras médias, obtidas por elipsometria ex situ, variaram de 15 a 20 nm.

2.3.2 Preparação de dispersões Fosfolipídicas e Sintéticas

Dispersões fosfolipídicas - vesículas pequenas unilamelares de fosfatidilcolina, PC, cuja fórmula estrutural se encontra na figura 2.3, foram preparadas por injeção etanólica [Batzri e Korn, 1973; Kremer et al., 1977] em água, seguida por 4 horas de diálise em água pura para eliminar o etanol. O diâmetro médio obtido foi de 62 nm [Carmona-Ribeiro e Herrington, 1993].

Figura 2-3 Estrutura molecular da fosfatidilcolina, PC.

Dispersões sintéticas – As vesículas e/ou pequenos fragmentos de dihexadecilfosfato de sódio(DHP), brometo de dioctadecildimetilamônio(DODAB), cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC) e acetato de dioctadecildimetilamônio (DODAAc), cujas fórmulas estruturais se encontram nas figuras 2-4, foram preparadas de uma maneira geral, calculando-se a massa necessária para a concentração final desejada, utilizando um balão volumétrico para a pesagem e completando com água Mili-Q para obter o volume pré-estabelecido. Em seguida, a mistura é colocada no ultrassom, em um béquer de 10 mL, apropriado para o encaixe da sonda (tip) de titânio [Mortara et al., 1978; Kano et al 1979] a uma temperatura entre 60 e 80 °C durante 15 minutos, em uma potência média nominal de 80 watts. Para precipitação do titânio ejetado da sonda e possíveis vesículas multilamelares produzidas durante a sonicação, procedeu-se a uma centrifugação em 15800 g por 1 hora a 25° C.

Figura 2-4 Estrutura molecular de DODAX e DHP.

Diâmetros médios para DODAB e DHP foram de 84 e 89 nm, respectivamente. Para os pequenos fragmentos de DODAX 0.2 mM os diâmetros médios obtidos foram: 88, 73 e 89 para DODAB, DODAC e DODAAc, respectivamente.

Vesículas grandes de DODAX (X= Br⁻, Cl⁻, Ac⁻) foram obtidas pelo método de Snippe [Katz et al., 1995D], de aquecimento. Os sais foram pesados analiticamente e transferidos para um frasco, onde foi adicionada quantidade suficiente de água Mili-Q para a concentração desejada. A dispersão dos lípides se deu por aquecimento em banho,

durante 30 minutos, a uma temperatura média de 50 °C, valor acima da temperatura de transição de fase dos sais.

2.4 Métodos analíticos para determinação das concentrações de PC, DHP, DODAX

2.4.1 Determinação da concentração de PC e DHP por dosagem de fósforo inorgânico

O método da dosagem de fósforo inorgânico [Houser et al., 1970] se aplica tanto ao PC quanto ao DHP. Neste método alíquotas da solução problema (50, 75, 100 µL) e da solução padrão (0,10,30,50,70,90,100 µL) são colocados em tubos de ensaio reservados para dosagem de fosfato e então secos em estufa (~100°C). Em seguida, são adicionados 0.3 mL de ácido perclórico concentrado aos tubos secos, sendo então colocados em um banho na capela, a 180°C por 4 horas, com os tubos tampados.

Depois disso, espera-se esfriar e adiciona-se 1 mL de água pura e 0.4 mL de molibdato de amônio, agitando-se em seguida. Após isso, adiciona-se em cada tubo 0.4 mL de ácido ascórbico e agita-se novamente. Em seguida, os tubos são colocados em banho de água fervente, fechados, por 5 minutos, e depois disso a absorbância é lida a 795-797 nm contra o ponto zero da curva padrão.

A partir dos valores obtidos de absorbância é feito um ajuste linear no qual é possível se determinar o valor de concentração da solução analisada.

2.4.2 Determinação da concentração de DODAB e DODAC por microtitulação

Este método é empregado quando as dispersões estão em água, e consiste em uma microtitulação da solução em estudo com o titulante nitrato de mercúrio [Hg(NO₃)₂] 10 mM utilizando-se como indicador a difenilcarbazana [Schales; Schales, 1941], tendo-se o cuidado de adicionar etanol absoluto à dispersão para garantir o rompimento .

2.4.3 Determinação da concentração de DODAAc

A concentração de DODAAC foi determinada via método Brij [Stelmo et al., 1987], que se baseia na formação de complexos estáveis entre o corante Orange G e íons de dioctadecildimetilamônio que podem ser solubilizados em soluções aquosas contendo micelas neutras de Brij 35. A variação da absorbância devida à migração do complexo para a micela é comparada com a de uma curva padrão de DODAC ou DODAB, por exemplo.

2.5 Determinação de isotermas de adsorção

A interação entre pequenas vesículas unilamelares e/ou fragmentos de bicamada de DHP e partículas de PSA foi induzida adicionando a dispersão de DHP às partículas e vortexando em seguida por no mínimo 2 minutos os tubos fechados. A densidade numérica final de partículas em cada tubo de mistura (1 mL) foi fixada em 4.4×10^{10} partículas / mL e a concentração final de DHP variou de 0.1 - 1.0 mM de DHP em cada mistura. Os tubos fechados contendo as misturas foram mantidos em temperatura de 25 °C durante 72 horas. Após isso, foram centrifugadas em 15,800 g por uma hora a 15 °C, para separar partículas das vesículas. O sobrenadante, assim como as preparações de DHP foram usadas para determinar a concentração de DHP, fazendo análise de fósforo inorgânico, Pi. Para isso foram preparadas 3 alíquotas de cada amostra de forma que cada ponto da isoterma é um valor médio e as barras de erro são os respectivos desvios padrão. A adsorção foi expressa como o número de moléculas de DHP adsorvidas por metro quadrado de poliestireno e plotadas contra a concentração de DHP livre no sobrenadante.

2.6 Determinação de espessura de camada adsorvida, por elipsometria ex situ e in situ

Vários filmes poliméricos preparados como descrito acima foram imersos nas dispersões aquosas dos lipídios: PC,DHP e DODAB, numa faixa de concentração de 0.02-1.2 mM por um período de 16 horas em uma sala condicionada com a temperatura entre 22° e 23° C. Depois disso, os substratos foram retirados da solução, cuidadosamente lavados e secos à vácuo em temperatura ambiente. As medidas elipsométricas ex situ (em ar), de espessura dos filmes adsorvidos foram realizadas usando um elipsômetro automático controlado por computador de modelo DRE-EL02 Ellipsometer (Ratzeburg, Germany), descrito na secção 2. Para a interpretação dos ângulos elipsométricos experimentais, Δ e Ψ , um modelo de multicamadas foi usado, adotando os seguintes valores para os índices de refração, para o silício, por ser um meio não transparente $n = 3.858 - 0.018i$, (46), para SiO₂ $n = 1.462$ devido ser muito fino(19), para TMCS $n = 1.383$, para o filme polimérico $n = 1.565$ e para a camada lipídica $n = 1.500$. Se a camada lipídica adsorvida é considerada como um filme homogêneo, a espessura pode ser calculada por cálculos iterativos usando matrizes de Jones[Azzam e Bashara,1987; Motschmann et al., 1991]

A partir dos ângulos elipsométricos experimentais Δ e Ψ , do modelo multicamada usado para representar o sistema em estudo, o qual foi composto por um substrato(chapa de silício + SiO₂ + TMCS), uma camada desconhecida(polímero e/ou lípide), a solução (ver figura 2.5), e os cálculos iterativos[Azzam e Bashara,1987; Fujimoto e Petri, 2001; Motschmann et al., 1991], é possível determinar a espessura média da camada superposta do lípide, d , estaticamente e dinamicamente. Note-se que cada camada é caracterizada sequencialmente considerando determinações elipsométricas independentes de espessura e índice de refração. A quantidade adsorvida é determinada segundo a equação de Feiters por:

$$\Gamma = d (n_{\text{DODAB}} - n_0) / dn/dc$$

Onde, n_{DODAB} é o índice de refração da camada de DODAB fixado para 1.500, n_0 é o índice de refração da solução aquosa com valor 1.33, medido com o refratômetro Abbé e dn/dc , acréscimo no índice de refração, medido com um refratômetro diferencial com valor de 0.16 mL/g. Note-se que $(n_{\text{DODAB}} - n_0) / dn/dc$ é muito próximo de 1, de modo que a quantidade Γ em mg/cm² é praticamente igual aos valores para d em nm. Além disso, a elipsometria possibilita a determinação independente de n e d somente se o contraste ótico no sistema for grande ou se a espessura da camada for bem

espessa. Porém, quando o sistema não preenche essas condições, escolhe-se um valor para o índice de refração, no nosso caso $n = 1.500$ que é o valor para uma camada hidrocarbônica, possibilitando com isso a determinação da espessura.

Figura 2-5 Representação esquemática de um sistema de multicamadas, com propriedades óticas previamente determinadas para obtenção de espessura média em ar da camada de DODAB.

Na elipsometria *in situ*, a adsorção dinâmica da solução lipídica sobre o filme de poliestireno foi acompanhada com a ajuda de uma cela trapezoidal de polytetrafluorotileno (teflon), com duas janelas de quartzo, uma para o feixe incidente e outra para o feixe refletido inclinadas de 70° [Fujimoto e Petri, 2001]. Inicialmente, foram determinadas as espessuras dos filmes de poliestireno através de elipsometria *in situ*, em seguida os filmes foram imersos na cela do elipsômetro preenchida com dispersão aquosa de lipídios.

A cinética de adsorção de DODAB sobre filmes de PSS foi estudada através de medidas de elipsometria *in situ*. Considerando que nos estágios iniciais a adsorção é controlada pela difusão de lípidos da solução para o substrato (filme sem lipídio), o coeficiente de difusão D pode ser calculado a partir da equação abaixo [Motschmann et al.; Siqueira et al. 1996]:

$$\Gamma(t) = (2/\sqrt{\pi}) c_{\text{bulk}} (\sqrt{Dt})$$

Onde c_{bulk} é a concentração de DODAB na solução.

2.7 Medidas de Ângulo de Contato

Medidas de ângulo de contato usando o método da gota Sessão, foram feitas usando um equipamento “doméstico” (Lab. Profª. Denise S. Petri) onde uma gota é colocada sobre a superfície em estudo e o ângulo que ela forma com a superfície durante o avanço e recesso é medido através de sua projeção em um anteparo, onde é digitalmente fotografada. Através de um software adequado (Corel Draw), são medidos os respectivos ângulos. Gotas de 4 e 2 μL de água pura depositadas sobre substrato seco (filme) por uma microseringa, foram usadas para determinação do ângulo de avanço (θ_A) e ângulo de recesso (θ_R), respectivamente. As medidas foram realizadas com gotas de água sobre o substrato, antes e depois da adsorção lipídica.

2.8 Medidas de Tensão Superficial

Durante a interação das dispersões lipídicas e os filmes poliméricos em água, surgiu a necessidade de saber o que seria energeticamente mais favorável para as dispersões, se a interface ar-água ou filme-água. Para isso, procedeu-se com as medidas de tensão superficial, a qual foi determinada através do método do anel de Du Noüy [Hiemenz, 1986] utilizando-se o Dynometer (seção 2-2). Neste método mede-se a força necessária para desprender um anel de platina da superfície do líquido, suspendendo-se o anel pendurado a um braço conectado a uma balança [Salay, 1997]. Para a realização das medidas escolheu-se um béquero de teflon, entre outros dois de vidro e acrílico, por ser mais hidrofóbico, com área interna de 625 mm^2 . As medidas foram feitas numa temperatura de 25 °C, em uma concentração final de anfifílico de 0.2 mM em água, considerada apropriada para o aparelho trabalhar no regime de sal, na faixa de 0 a 50 mM. As primeiras medidas foram feitas após 10 minutos de interação com o sal adicionado, seguidas por intervalos de 10 minutos durante uma hora, e, por intervalos de 20 minutos por 2 horas. Finalmente, após 24 horas foi observada a estabilização do sistema.

2.9 Determinação de tamanho e potencial-zeta das partículas

As medidas de tamanho, D_z , e potencial-zeta, ζ , foram feitas com um -Zeta Potencial Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY), equipado com um laser estado sólido de 532 nm e ângulo de detecção de 90°.

Para as medidas de tamanho, foram usados tubos eppendorfs de 3 mL onde foram colocadas para interagir durante 24 horas as dispersões de DODAX numa faixa de 0.05 -1.0 mM e as soluções aquosas de PSS numa concentração final de 2×10^{11} p/mL, considerada adequada para medidas de tamanho no aparelho. Posteriormente, escolheu-se algumas concentrações (0.05, 0.2 e 0.8 mM) de lipídios para estudar o efeito de sal no tamanho e potencial. A mistura das dispersões de DODAX e partículas interagiram por 24 horas sendo em seguida adicionado o sal NaCl nas concentrações de 0.05, 0.5 e 5.0 mM.

As medidas de ζ foram obtidas usando tubos eppendorfs de quartzo de 3 mL com volume de solução suficiente (2.0 mL) para interagir com o eletrodo.

Finalmente, utilizou-se uma concentração de 0.04 mM DODAX, correspondente à concentração na qual a área superficial de bicamadas adicionada é igual à área superficial de partículas ($R = A_b / A_p = 1$), incluindo uma possível adsorção nas paredes do tubo de 3 mL.

O cálculo da relação R entre áreas superficiais a partir de concentrações de DODAX e partículas de PSS é feito com base nas expressões 2.1 e 2.2 abaixo:

$$A_{\text{total de bicamadas}} = \frac{C_b \times V \times N^{\circ} \text{ de Avogadro} \times 0.6 \text{ nm}^2}{2} \quad (2.1)$$

$$A_{\text{total de partículas}} = C_p \times V \times (31.4 \times 10^3 \text{ nm}^2) \quad (2.2)$$

onde C_b é a concentração de DODAX em molar, C_p concentração de PSS em N° de partículas /mL, V é o volume da solução em litros, $31.4 \times 10^3 \text{ nm}^2$ é a área de uma partícula esférica de PSS e 0.6 nm^2 é o valor da base circular de um cilindro

equivalente a uma molécula de DODAX em bicamada, em nm^2 (área da cabeça polar do lipídio a 25°C).

A razão R das duas áreas é:

$$R = \frac{A_{\text{total de bicamadas}}}{A_{\text{total de partículas}}} = \frac{C_b \times N^\circ \text{ de Avogadro} \times 0.6}{2 C_{\text{pss}} \times (31.4 \times 10^3)} \quad (2.3)$$

3 Resultados e Discussão

3.1 Adsorção de lipídios sintéticos e fosfolipídios em filmes poliméricos e interface ar-água.

Na Figura 3-1 apresentamos um modelo de multicamadas com propriedades óticas como, índice de refração e espessura média, para cada camada. Modelos desse tipo são usados por elipsometria *ex situ* (2.2), para determinação de espessuras em ar.

Figura 3-1 Representação esquemática de um sistema de multicamadas formado por: chapa de silício-polímero- lipídio, com propriedades óticas previamente determinadas para obtenção de espessura média em ar (*ex situ*) da camada de DODAB

3.1.1 Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)

Na figura 3-2 mostramos o gráfico da espessura, d , obtida por elipsometria *ex situ*, da camada adsorvida de DODAB sobre filmes de poliestireno sulfato, como função da concentração de DODAB em água. Como vemos, não existe dependência da espessura da camada com a concentração, na faixa mostrada. O valor médio da espessura $d = 2.5 \pm 0.5 \text{ nm}$ corresponde ao valor médio teórico esperado para uma monocamada de DODAB. Portanto, em ar uma monocamada de DODAB permanece adsorvida à superfície do filme de PSS.

Figura 3-2 Espessura d da camada adsorvida de DODAB sobre filmes de PSS em ar, em função da concentração de DODAB. Em (a) temos o filme de PSS revestido rotacionalmente sobre chapas de SiO_2/Si . Em (b) o filme é revestido sobre chapas de silício silanizadas (TMCS). A linha tracejada representa o valor da espessura teórica para deposição de uma monocamada de DODAB. Do lado direito representamos o esquema de multicamadas

Na tabela 3 apresentamos os resultados de medidas de ângulos de contato, obtidos através do método da gota Sessil, descrito em 2-7, os quais servirão para avaliar a molhabilidade dos filmes. Filmes puros de PSS preparados por revestimento rotacional (spin coating) são hidrofóbicos e planos, como revelados pelo ângulo médio de avanço, θ_A , de $71^\circ \pm 4^\circ$ e uma histerese $\Delta\theta$, de 5° . Com a adsorção de DODAB a superfície torna-se mais hidrofóbica com um θ_A de 84° . Este efeito é devido à orientação das cadeias hidrocarbônicas para o ar. A histerese, $\Delta\theta$, aumenta de 2° para 26° , indicando que a camada adsorvida é mais rugosa que o filme polimérico.

Para induzir a orientação das cadeias hidrofóbicas de PSS para o substrato, foi feita uma reação de silanização sobre TMCS com parte das chapas de silício. Esta reação tornou as chapas mais hidrofóbicas, mas a rugosidade também aumentou. Filmes

de PSS sobre as chapas silanizadas são também hidrofóbicas, o ângulo médio de avanço, θ_A , sendo igual a $79^\circ \pm 6^\circ$. Este resultado mostra que a silanização não tem efeito sobre as cadeias do polímero. Aumento na histerese, $\Delta\theta$, para 9° indica uma baixa rugosidade (tabela 2). A adesão de DODAB ao filme de PSS não tem efeito sobre a hidrofobicidade da superfície. A variação no valor médio de θ_A para 82° não chega a detectar um aumento, já que este valor está dentro do erro experimental. A quantidade adsorvida de DODAB tem uma espessura média d , de $2,5 \pm 0,2$ nm (fig. 3-2), a qual coincide com a espessura média de DODAB adsorvida sobre PSS sem silano e com a espessura teórica calculada para uma monocamada de DODAB.

A figura 3-3 mostra ângulos de contato de avanço e recesso, para filmes de PSS recobertos com DODAB medidos, após terem sido lavados cuidadosamente e secos a vácuo por meia hora, usando o método da gota Sessão, descrito em 2-7. Em ar, a superfície do filme de PSS é menos hidrofóbica do que o substrato recoberto com DODAB em uma certa faixa de concentração. Isto concorda com nossa hipótese anterior para explicar os resultados elipsométricos ex situ segundo o modelo da figura 3.1. Em ar, a camada de vesículas aderidas de DODAB sobre o filme polimérico se romperia expondo regiões hidrocarbônicas da bicamada para o ar, justificando assim o aumento no ângulo de contato na faixa de concentração testada e, conseqüentemente uma baixa molhabilidade.

Infelizmente, determinações de molhabilidade não discriminam deposição de bicamada em água de mera adesão de vesícula, desde que em ar ambas situações produzem baixa molhabilidade. No mínimo, seus valores confirmam significantes mudanças sobre a superfície polimérica devido à adsorção de DODAB.

Figura 3-3 Efeito de concentração de vesículas (DODAB) sobre a molhabilidade do filme de PSS a partir de medidas de ângulo de contato de avanço e recesso.

3.1.2 Dihexadecilfosfato de sódio (DHP)

A interação entre DHP e filmes de PSA produz filmes estáveis em ar com uma espessura média, d , de 2.3 ± 0.7 nm sobre a faixa de concentração de lipídio testada (fig.3-4). Este valor corresponde à espessura teórica calculada para uma monocamada de DHP. A força que dirige a adesão de DHP, carregado negativamente, para a superfície de PSA, positivamente carregada, é de caráter eletrostática, em ar.

Figura 3-4 A espessura d , da camada adsorvida de DHP sobre filmes de PSA, em ar como função da concentração de DHP. Em (a), o filme de PSA é revestido sobre chapas de SiO_2/Si . Em (b) a chapa de silício é silanizada (TMCS). A linha tracejada representa o valor teórico da espessura de uma monocamada de DHP. Ao lado está representado o esquema de multicamadas, d , de $2,5 \pm 0,2$ nm (fig. 3.1.3), a qual coincide com a espessura média de DODAB adsorvida sobre PSS sem silano e com a espessura teórica calculada para uma monocamada de DODAB.

Nenhum efeito do filme de DHP sobre a molhabilidade de PSA foi observado, apenas um aumento na rugosidade revelado pela mudança de $\Delta\theta$ de 2° para 11° (tabela 2). Isto significa que a deposição de uma monocamada de DHP sobre o filme de PSA, em ar, gerou uma superfície que é tão hidrofóbica quanto à própria superfície de poliestireno. De fato, bicamadas de DHP em água apresentam uma temperatura de transição de fase do estado gel para o estado líquido-cristalino muito alta [Carmona-Ribeiro, 1992; Carmona-Ribeiro et al., 1991; Carmona-Ribeiro; Hix, 1991], a qual é típica de bicamadas altamente empacotadas em temperatura ambiente, capaz de produzir uma alta hidrofobicidade, como uma monocamada adsorvida em ar.

A camada silano não tem influência sobre a adesão de DHP sobre PSA. A hidrofobicidade permanece alta antes e após a deposição sobre o filme polimérico. A

única mudança observada é o aumento na rugosidade após a adsorção. O filme adsorvido de DHP tem uma espessura média de 2.0 ± 0.3 nm (fig.3-4(a)), o qual é semelhante ao valor em 3-4(b). Nesse caso, também não foi observada dependência da espessura do filme sobre a concentração.

A adesão para DHP sobre partículas de PSA foi medida a partir de determinação da isoterma de adsorção apresentada na figura 3-5. Observa-se que, para concentrações de DHP no sobrenadante abaixo de 2.5 mM., a adsorção cresce continuamente com a concentração de DHP no sobrenadante. Entre 0.25 mM e 0.5 mM parece alcançar um patamar com a quantidade adsorvida correspondente à deposição de uma bicamada de DHP sobre o látex. Para concentrações maiores que 0.5 mM a quantidade adsorvida cresce até um segundo patamar. Carmona-Ribeiro e Midmore [Carmona-Ribeiro et al., 1992] mostrou em um trabalho anterior que devido às restrições de empacotamento, as moléculas de DHP preferem adsorver sobre superfícies planas ou, no mínimo sobre superfícies com grandes raios de curvatura.

Quando o substrato é esférico, a deposição de DHP sobre partículas, tende a ser em várias bicamadas, de forma que a deposição é facilitada pelo maior raio de curvatura da ultima bicamada depositada [Carmona-Ribeiro et al., 1992].

Figura 3-5 Isotermas para adsorção de DHP de pequenas vesículas (sonicadas) de DHP (95 nm de diâmetro) sobre microesferas de PSA (diâmetro médio de 190 nm) em água a 25 ° C. A linha tracejada representa o valor teórico de espessura para uma única bicamada. Ao lado está representado o esquema da partícula recoberta

3.1.3 Fosfatidilcolina (PC)

A espessura da camada adsorvida de PC sobre filmes de PSA, determinada através de medidas elipsométricas em ar, como uma função da concentração de PC é apresentada na figura 3-6. Observa-se que a espessura de camada independe da concentração na faixa testada. O valor médio de espessura, d , para o PC é de 2.5 ± 0.5 nm, a qual corresponde à espessura teórica de uma monocamada de PC. A força que dirige a interação de PC com PSA é a formação do complexo entre a fosfatidilcolina e o grupo amidina. Conseqüentemente, a interação hidrofóbica entre as cadeias hidrocarbônicas lipídicas e a superfície hidrofóbica do poliestireno dirige a deposição de monocamada do lipídio com cabeças polares para cima e voltadas para a água. A interação de van der Waals entre a monocamada lipídica e vesículas livres em dispersão é então responsável pela deposição de outra bicamada [Carmona-Ribeiro et al., 1993].

Figura 3-6 A espessura d , da camada adsorvida de PC sobre filmes de PSA em ar, em função da concentração do lipídio. Em (a) o filme é revestido sobre chapas de SiO₂/Si. Em (b), a chapa de silício está silanizada. Em (a), a linha tracejada representa o valor teórico da espessura de uma monocamada de PC. Em (b) a linha tracejada representa a mudança do valor de espessura teórica de uma bicamada a uma monocamada de PC. Ao lado está o esquema de multicamadas

Na tabela 3, temos o efeito do PC adsorvido sobre a molhabilidade do filme de PSA. Filmes puros de PSA, preparados por revestimento rotacional, são hidrofóbicos e planos, como revelados pelo valor médio do ângulo de avanço, θ_a , de $86^\circ \pm 5^\circ$ e uma histerese, $\Delta\theta$, de 2° . Após interação com PC, as superfícies tornam-se menos hidrofóbicas com um θ_a médio de $75^\circ \pm 3^\circ$. Este efeito é provavelmente devido à orientação de alguns grupos fosfatidilcolinas para o ar. A histerese, $\Delta\theta$, aumenta de 2° para 8° , indicando que a quantidade de PC adsorvida é levemente mais rugosa que o filme puro de PSA.

Os resultados do ângulo médio de avanço sobre as chapas de silício silanizadas mostram novamente que a silanização não tem efeito sobre a orientação das cadeias poliméricas. Contudo, a adsorção de PC sobre PSA exerce um significativo efeito sobre a hidrofobicidade da superfície.

A espessura, d , da camada de PC sobre filmes planos de PSA, obtida por elipsometria *ex situ*, como função da concentração de PC é apresentada na figura 3-6. A espessura aumenta com a concentração de PC até alcançar um patamar de 5.5 nm em aproximadamente 0.1mM de PC. Este valor corresponde à espessura teórica de duas monocamadas de PC. Neste caso, a maioria das cadeias hidrofóbicas tende a se orientar para o ar, produzindo um valor médio de θ_A , de $76^\circ \pm 5^\circ$. Para concentrações maiores que 0.5 mM a espessura média cai para aproximadamente 3 nm, indicando a presença de uma monocamada de PC sobre o substrato. As monocamadas teriam mais grupos fosfatidilcolinas (hidrofílicos) orientados para o ar, causando uma diminuição no valor médio, θ_A para $64^\circ \pm 1^\circ$.

A adsorção de PC sobre partículas de PSA é apresentada na figura 3-7, a qual foi obtida a partir de dados anteriores [Carmona-Ribeiro et al., 1993].

A quantidade adsorvida aumenta com a concentração até a cobertura superficial ficar completa em 5×10^{-5} mM. Em dispersões aquosas, o valor do patamar da isoterma corresponde a uma cobertura de partículas de PSA com uma monocamada de PC mais uma bicamada. A formação de uma bicamada sobre a monocamada é dirigida pela atração de van der Waals entre a monocamada depositada e vesículas livres na dispersão. Estes resultados aproximam-se com o primeiro patamar da figura anterior (3-6). Naquele caso, quando o substrato é removido da solução para o ar (elipsometria *ex situ*), duas camadas permanecem sobre o substrato, onde a última monocamada é removida.

Figura 3-7 Isotermas de adsorção de fosfatidilcolina (PC) a partir de vesículas (diâmetro médio de 62 nm) sobre microesferas de PSA (diâmetro médio de 76 nm) em água, a 25°C, como previamente publicado por Carmona-Ribeiro and Herrington, 1993. O patamar alcançado é consistente com a deposição em máxima adsorção de 3 monocamadas de PC. Ao lado está a representação esquemática da partícula de PSA recoberta com 3 monocamadas, isto é, 1 monocamada mais 1 bicamada.

Solid substrate	Lipid type and concentration (mM)	θ_a (°)	θ_r (°)	$\Delta\theta$ (°)
PSA/SiO ₂	0	86±5	84±4	2
lipid/PSA/SiO ₂	PC/0.22 mM	75±3	67±3	8
PSA/TMCS/SiO ₂	0	85±5	76±7	9
lipid/PSA/TMCS/SiO ₂	PC/0.22 mM	76±5	63±5	13
lipid/PSA/TMCS/SiO ₂	PC/0.56 mM	64±1	53±2	11
PSS/SiO ₂	0	71±4	66±4	5
lipid/PSS/SiO ₂	DODAB/0.14 mM	84±3	58±2	26
PSS/TMCS/SiO ₂	0	79±6	70±5	9
lipid/PSS/TMCS/SiO ₂	DODAB/0.97 mM	82±1	65±4	17
PSA/SiO ₂	0	86±5	84±4	2
lipid/PSA/SiO ₂	DHP/0.22 mM	89±3	78±2	11
PSA/TMCS/SiO ₂	0	85±5	76±7	9
lipid/PSA/TMCS/SiO ₂	DHP/0.22 mM	85±8	61±6	24

Tabela 3 Efeito de lipídios sobre a molhabilidade de filmes poliméricos, os quais foram obtidos por revestimento rotacional de polímeros (PSS e PSA) solubilizados em tolueno a uma concentração final de 8 mg/ml sobre chapas de silício com e sem TMCS.

3.1.4 Efeito de sal sobre cinéticas de adsorção de DODAB sobre filmes poliméricos por elipsometria in-situ.

A espessura dinâmica, d , de vesículas de DODAB sobre filmes de PSS, foi obtida a partir de medidas de elipsometria *in situ*, (descrita na secção 2-6), conforme figura 3-9. Como controle, foi determinada a espessura *ex situ* em função do tempo do filme de PSS imerso em água pura. O resultado desta "cinética seca" está na figura 3-8, onde observamos um crescimento da espessura. Possivelmente, isto acontece devido à interação do filme com a água e a sua retirada para o ar. Como o filme polimérico é altamente hidrofóbico ao interagir com a água suas superfícies hidrofóbicas tendem a se esconder levando à formação de regiões rugosas. Com a adição de DODAB e sal nas diversas concentrações (figura 3-8 B,C,D) essa espessura continua a crescer. Visto isso, concluímos que as espessuras *ex situ*, d , obtidas para as vesículas de DODAB, PC e DHP inicialmente, poderiam estar comprometidas. Através da figura 3-8 A observa-se que a estabilidade do filme polimérico em água foi atingida em torno de 2 horas então, foi esperado esse tempo para que os parâmetros Ψ e Δ do filme polimérico estabilizassem e a partir daí dar início à cinética de DODAB.

Figura 3-8 Resultados de espessura A em mg/m^2 equivalente a d em nm, obtidos da cinética *ex situ* do filme de poliestireno em água pura e em 3 diferentes concentrações de NaCl após adicionar vesículas de DODAB a uma concentração final de 0.2 mM. (A) filme puro de PSS em água, em (B), (C) e (D), filme de poliestireno em contato com dispersões de DODAB e NaCl.

Quando a adsorção ocorreu, a deposição limite de DODAB foi alcançada em termos de uma espessura média de 1.6-1.7 nm em água ou em 0.1mM de sal (fig. 3-9 (A), (B)), a qual é fracamente consistente com a deposição de monocamada, que teoricamente está na faixa de 2,2-2,5 nm. Possivelmente, vesículas inteiras aderiram esparsamente sobre o filme plano, sem sofrerem rompimento e fusão com a superfície. Contudo, sob adição de NaCl a uma concentração final de 50 mM, a adsorção de DODAB foi muito rápida no estágio inicial, alcançando no final uma camada de DODAB de espessura média de 6.0 nm (figura 3-9 (C)), em boa aproximação com os 5 nm esperado para deposição de bicamada de DODAB sobre superfície de PSS. Este resultado foi consistente com a fusão da vesícula com a superfície, induzida por sal. Além disso, vesículas de DODAB foram também relatadas por apresentarem um grau máximo de fusão intervesicular sob adição de NaCl em concentração final de 50 mM

[Carmona-Ribeiro et al., 1986; Carmona-Ribeiro et al., 1993].

Figura 3-9 Medidas elipsométricas in situ de espessura d em função do tempo para filmes de PSS, após adicionar vesículas de DODAB 0.18 mM em água (A), 0.1 mM NaCl (B), ou 50 mM NaCl (C).

Sabendo que, nos estágios iniciais da cinética de adsorção o processo é controlado por difusão das vesículas ou fragmentos de bicamadas lipídicas para o substrato puro, e que este transporte pode ser considerado como uma difusão Fickiniana (secção 2-6) onde o coeficiente de difusão, D , é igual ao coeficiente angular da curva de espessura, $d(t)$, versus raiz quadrada do tempo, pudemos constatar que a partir da figura 3-9(A) (B), nos estágios iniciais, em água pura ou em baixa concentração de sal monovalente a adsorção de DODAB seguiu uma dependência linear com a raiz quadrada do tempo(figura 3-10 (A)(B,)) respectivamente, com um coeficiente de difusão para a espécie adsorvida igual à aproximadamente $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, o qual foi precisamente o coeficiente previamente encontrado para vesículas com tamanhos semelhantes [Jackson et al., 1986]. Além disso, este resultado reforçou a idéia de um mecanismo para adsorção de DODAB via deposição de vesículas inteiras, ao invés de transferência de monômeros e concordou com resultados anteriores da literatura sugerindo este mesmo mecanismo para adsorção de fosfolipídio sobre vidro [Jackson et al., 1986] ou para anfífilicos sintéticos sobre partículas de poliestireno [Carmona-Ribeiro et al., 1992]. Para concentrações mais altas de sal monovalente (50 mM), vemos que o processo de difusão não existe (fig 3-10 (C)), isto é, a deposição da bicamada é instantânea, dentro da resposta em tempo do aparelho.

Figura 3-10 Medidas elipsométricas in situ da espessura d como uma função da raiz quadrada do tempo para filmes de PSS, após adição de vesículas de DODAB em água (A), de 0.1 mM NaCl nas dispersões de DODAB (B), ou 50 mM NaCl adicionados (C). As linhas sólidas nos estágios iniciais, indicam a dependência linear com raiz de t , onde o coeficiente angular representa o coeficiente D de difusão, em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$.

3.1.5 Efeito de sal e do método de dispersão de DODAB sobre cinéticas de decaimento de tensão superficial na interface ar-água.

A tensão superficial na interface ar-água foi medida em 25°C como uma função do tempo após adição de NaCl em diversas concentrações, à dispersão aquosa de DODAB 0.2 mM, usando o método do anel de Du Noüy, descrito em 2.8.

Através da figura 3-11, onde mostramos o efeito de sal na tensão superficial da dispersão de DODAB em água pura, vemos que para as dispersões de DODAB sem sal, a tensão superficial é igual à tensão da água pura, o que não ocorre em seguida a adição de sal, onde vemos uma rápida queda na tensão, atingindo um valor mínimo em 50mM de sal.

Figura 3-11 Tensão superficial na interface ar-água como função do tempo, de diluições 0.2 mM de DODAB em água a soluções de NaCl em concentrações finais iguais a 0 (■), 7 (●), 25 (▲) e 50 mM de NaCl (▼).

O efeito na tensão superficial na interface ar-água de uma solução aquosa causado pela presença de um anfífilo sintético ou de um fosfolípido, depende da capacidade deste surfactante de migrar do agregado em solução aquosa para a interface ar-água. A energia de superfície e portanto a tensão superficial, λ , pode ser diminuída pela segregação de vários componentes na direção ou em direção contrária da superfície num comportamento anteriormente definido como adsorção.

Segundo a figura acima, para DODAB em água pura, a tensão não muda com o tempo, ficando em torno de 73 mN/m que é o valor da tensão superficial da água. Isto se deve a alta estabilidade das vesículas e a baixa solubilidade em água deste tipo de anfífilo que apresenta um comprimento de 18 carbonos em suas duplas cadeias, o que dificulta sua migração para a superfície [Evans e Wenerström, 1994]. À medida que se adiciona sal em crescente força iônica, observa-se que a tensão diminui, o que significa um aumento de solubilidade das vesículas, possivelmente devido ao surgimento de defeitos hidrofóbicos na bicamada causados pelo sal, levando à fusão com a interface ar-água. O máximo decréscimo na tensão ocorreu em 50 mM de sal, em boa aproximação com dados obtidos com elipsometria in situ, sugerindo na ocasião um importante papel para interação hidrofóbica em 50 mM de sal, para induzir fusão de vesícula com a interface polímero-água.

A figura 3-12 apresenta um quadro geral de 3 possibilidades geradas por defeitos hidrofóbicos causados pela adição de sal, para explicar a deposição de bicamada sobre superfícies hidrofóbicas.

Fusão de vesículas devido a defeitos hidrofóbicos na bicamada pode acontecer em alguma interface hidrofóbica ou região. Existem 3 exemplos: fusão intervesicular, fusão com a superfície polimérica e fusão com a interface ar-água. Em água pura, existe uma diferença fundamental entre a interface ar-água e a superfície polimérica: A superfície PSS é carregada negativamente e as vesículas catiônicas são atraídas eletrostaticamente para ela, onde para a superfície ar-água não existe força que dirija para si as vesículas não defeituosas. Dependendo da intensidade da atração eletrostática, pode acontecer deposição de bicamada ou simples adesão de vesículas. Para uma pequena força de atração eletrostática é possível a ocorrência de uma simples adesão de vesícula, como parece ser o caso na figura 3-9(A), onde uma fina camada de DODAB de somente 1.7 nm de espessura média ocorreu no limite da adsorção. Realmente, interação hidrofóbica apareceu como uma potente força de interação para produzir uma estável cobertura de bicamada de DODAB na superfície polimérica hidrofóbica.

A difusão de membranas de bicamadas fosfolipídicas e as condições para formação de bicamadas contínuas sobre superfícies hidrofílicas rugosas (vidro) ou lisas (mica) foram previamente estudadas por Radler et al., 1995. Para superfícies planas carregadas e hidrofóbicas, as quais são também rugosas, como no caso dos filmes de PSS, difusão de uma bicamada contínua seria facilitada por uma grande densidade superficial de carga sobre o polímero e/ou sobre a bicamada da vesícula, gerando uma grande atração eletrostática ou por uma grande atração hidrofóbica entre regiões defeituosas na bicamada e a superfície dos filmes PSS, complementada por interações laterais hidrofóbicas entre bicamadas adjacentes.

Figura 3-12 Modelo representando a hipótese dos defeitos hidrofóbicos. Com o sal NaCl adicionado às vesículas de DODAB, apareceriam na bicamada defeitos hidrofóbicos causando efeitos de fusão, como (1) fusão intervesicular, (2) fusão de vesícula com a interface ar-água, e (3) fusão com a superfície polimérica

3.2 Adsorção de sais de dioctadecildimetilamonio (DODAX) sobre partículas de poliestireno sulfato e sobre a interface ar-água.

Nesta parte do trabalho foi investigada a interação de lipídios catiônicos, representados por sais de DODA com os contra-íons: brometo, cloreto e acetato e partículas de poliestireno sulfato de carga oposta. A estratégia consistiu em medidas de tamanho de um número pré-determinado de partículas de látex recobertas, utilizando espalhamento dinâmico de luz, da determinação do potencial- zeta, através de medidas de mobilidade eletroforética e medidas de tensão superficial na interface ar-água, das dispersões de DODAX. O efeito de NaCl em baixa concentração também foi observado

3.2.1 Efeitos de [DODAX] e [NaCl] sobre tamanho, D_z , de partículas de PSS

Na figura 3-13 mostramos o efeito da concentração de dispersões de DODAX (Br^- , Cl^- , Ac^-) sobre o tamanho, D_z , de partículas de PSS em 2×10^{11} partículas/mL, em função do tempo (secção 2-9). Observa-se que há um crescimento das partículas em relação ao seu tamanho original (115* nm) em função do tempo. Após 24 horas vê-se que, os tamanhos estabilizaram em patamares de: 155-170 nm; 125-145 nm e 125-155

nm, para DODAB, DODAC e DODAAc, respectivamente. Certamente, esses valores de diâmetros não correspondem à deposição de uma bicamada (115 + 10) nm) em toda a faixa de concentração testada. Considerando as dispersões lipídicas constituídas por fragmentos de bicamada [Vieira et al., 2003] poderíamos explicar este fato pela interação hidrofóbica entre as bordas dos fragmentos, BF, e a superfície hidrofóbica das partículas, levando a uma adsorção de fragmentos posicionados verticalmente, conforme mostrado no esquema 1 (Figura 3.15).

Figura 3-13 Efeito de concentração de vesículas e/ou fragmentos de sais de DODA sobre tamanho de partículas, $D(z)$, em função do tempo, após adicionar 0.05 ($\square$), 0.1 ($\circ$), 0.2 ($\triangle$), 0.4 (∇), 0.6 ($\diamond$), 0.8 ($\triangleleft$) e 1.0 mM ($\triangleright$) de lipídios em 2×10^{11} partículas de PSS / mL .

Na figura 3-14 mostramos o efeito da adição de NaCl nas concentrações 0.05, 0.5 e 5.0 mM, sobre a mistura de fragmentos de DODAX, em concentrações de 0.05, 0.2 e 0.8 mM, e 2×10^{11} partículas de PSS/mL, após 24 horas de interação, conforme descrito na secção 2.9.

Figura 3-14 Efeito de sal NaCl sobre tamanho (Dz) como uma função de tempo, após 24 horas de interação das partículas com dispersões de DODAX obtidas por sonicação, seguida da adição de 0.05 ($\square$), 0.5($\circ$) e 5.0 mM NaCl ($\triangle$) em misturas DODAX/PSS nas concentrações: (A) 0.2 mM DODAB, (B) 0.8mM DODAB; (C) 0.2 mM DODAC, (D) 0.8 mM DODAC; (E) 0.05 mM DODAAc e (F) 0.8 mM DODAAc

Observa-se que a adição de sal reverteu o aumento de tamanho do particulado anteriormente obtido para as misturas DODA/ partícula. Possivelmente, o sal em baixa concentração desestabilizou fragmentos de bicamada adsorvidos perpendicularmente à superfície além de promover retirada desses fragmentos por outros fragmentos livres em solução talvez por fusão fragmento livre-fragmento adsorvido, (ver Figura 3-15). Esta possibilidade foi reforçada por determinações de potencial –zeta antes e após adicionar 0.5 mM de NaCl às misturas DODAX/partículas como mostrada na tabela 4. Apesar da desorção de DODAX, retratada por diminuição de potenciais-zeta, as partículas

revestidas ainda apresentam valores positivos de potencial, indicando a presença de fragmentos, porém com um valor de potencial-zeta menor do que aquele esperado para bicamadas catiônicas depositadas de forma contínua sobre o látex. Assim, poderia estar havendo recobrimento não contínuo com fragmentos de bicamada sobre a partícula.

O esquema ilustra possíveis arranjos de fragmentos de DODAX sobre partículas em ausência e presença de pequenas concentrações de sal, respectivamente.

Figura 3-15 Esquema de fragmentos de DODAX sobre partículas.em água e após adição de sal.

DODAX	[DODAX] (mM)	D (nm)	ζ (mV)	D (nm) 0.05 mM NaCl	ζ (mV) 0.05 mM NaCl	D (nm) 0.5 mM NaCl	ζ (mV) 0.5 mM NaCl	D (nm) 5.0 mM NaCl
DODAB	0.0	115±1* * 100±5*	-31±4	115±1	-31±4	112±1	-31±4	111±1
	0.05	170±1	41±2					
	0.10	171±1	31±1					
	0.20	167±1	39±1	118±1	38±5	109±1	30±3	112±1
	0.40	165±1	43±2					
	0.60	164±1	36±1					

	0.80	163±1	34±1	121.0 ±0.0	21±4	108.0±0.0	26±5	108.0±0.0
	1.00	157±1	30±1					
DODAC	0.05	131±1	58±1					
	0.10	131±1	60.0± 0.0					
	0.20	132±1	-	118±1	31±6	109±1	28±3	112±1
	0.40	128±1	47±2					
	0.60	144±1	57±3					
	0.80	147±1	47±1	113±1	38±8	103±1	32±2	109±1
	1.00	134±1	45±6					
DODAAc	0.05	148±1	54±2			114.0±0.0	34 ± 2	117±1
	0.10	155±1	58±3					
	0.20	145±1	63±2					
	0.40	135±1	60±1					
	0.60	135±1	58±2					
	0.80	128±1	58±1	122±1		116±1		115.1±0.7
	1.00	129±1	53±2					

Tabela 4 **Diâmetro médio (Dz) em nm e potencial-zeta (ζ) em mV para partículas de poliestireno sulfato em presença de fragmentos de bicamada de DODAX em diferentes concentrações de NaCl e de DODAX. Cada mistura contém 2x10¹¹ partículas/mL de poliestireno sulfato (PSS). O tempo de interação entre bicamadas e partículas foi de 24 horas. * T.E.M. significa microscopia eletrônica de transmissão ** SL significa espalhamento de luz.**

Nos resultados de adsorção de lipídios sobre as partículas de PSS (figura 3-13), a relação entre áreas superficiais está acima da esperada para o recobrimento de uma única bicamada. Com isso, resolveu-se estudar a interação e o efeito de sal entre partículas e lipídios na condição de equivalência entre áreas superficiais totais de partículas e bicamada (estequiometria de áreas, $R = \frac{A_{\text{total de bicamadas}}}{A_{\text{total de partículas}}} = 1$). Isto foi feito

considerando que 1 mL de 0.04 mM de DODAX produziria 0.009 m² sobre cada lado de fragmentos de DODAX e 1 mL de 2 x 10¹¹ partículas / mL, cada uma com diâmetro médio de 100 nm, produziria 0.006 m² sobre partículas. Devido a cubeta de poliestireno usada no espalhamento de luz ter uma área de cerca de 0.001 m², então a quantidade de DODAX estava ligeiramente acima da área total necessária para recobrir superfícies de cubetas mais partículas. A figura 3-16 através da distribuição de tamanhos, D_z, para os três contra-íons representados por brometo de DODA(A,A') cloreto(B,B') e acetato(C,C') confirmou a diminuição de tamanho sob adição de baixa concentração de sal como mostrado na figura 3-14.

Figura 3-16 Distribuição de tamanho para misturas DODAX BF / PSS em 0.04 mM DODAX e 2.10 11 partículas PSS / ml, após 24 de interação de interação, antes(A,B,C) e após adição de 5 mM de NaCl (A',B',C'). X representa os contra-íons empregados os quais foram brometo (A), cloreto(B) e acetato(C).

Na tabela 5 estão os resultados dos diâmetros médios e potenciais -zeta, para partículas PSS e misturas de 0,04 mM de DODAX BF. É interessante observar que para os três contra-íons os potenciais-zeta foram maiores para as misturas antes de adicionar 0.5 mM de NaCl . Ao contrário, após adição de sal, os potenciais diminuíram substancialmente para os 3 contra-íons, reforçando a hipótese que adsorção eletrostática de fragmentos planos BF foi favorecida sobre adsorção hidrofóbica de bordas BF sobre partículas na presença de sal.

Os cálculos para o potencial-zeta estão sendo providenciados no intuito de demonstrar que a diminuição de potencial em baixas concentrações de sal(tabela 5) se deve a mudanças estruturais dos arranjos lipídicos adsorvidos e não a diminuição de κ .

DODAX	D (nm) (PSS+DODAX)	ζ (mv) (PSS+DODAX)	D (nm) (PSS+DODAX+Sal)	ζ (mv) (PSS+DODAX+Sal)
DODAB	124.5 $\pm$ 0.4	58 $\pm$ 2	112.8 $\pm$ 0.7	26 $\pm$ 1
DODAC	117.1 $\pm$ 0.6	67 $\pm$ 2	114.7 $\pm$ 0.9	35 $\pm$ 1
DODAAc	125.7 $\pm$ 0.7	50 $\pm$ 8	110.2 $\pm$ 0.5	34 $\pm$ 1

Tabela 5 Diâmetros médios e potenciais-zeta de partículas de PSS em presença de fragmentos de bicamadas de DODAX em condições de estequiometria de áreas (0.04 mM DODAX e 2x 10¹¹ partículas/ml).As partículas e vesículas interagiram por 24 horas e após isso foi adicionado sal 0.5 mM

3.2.2 Efeito de método de dispersão de DODAX, [DODAX] e [NaCl] sobre a tensão superficial na interface ar-água.

Como vimos anteriormente, a tensão superficial de dispersões de DODAB em água pura na interface ar-água não muda com o tempo e é praticamente igual à tensão da água pura. A partir disso, se resolveu medir sistematicamente o efeito de sal sobre a tensão superficial de dispersões de DODAX 0.2 mM utilizando NaCl em diversas concentrações. O efeito está mostrado na figura 3-17, onde em água a tensão γ para dispersões de bicamada foi igual à γ da água, 72.3 mN/m. A adição de sal causou uma pronunciada diminuição na tensão superficial sendo que a cinética de decaimento foi mais rápida com o aumento da concentração de NaCl.A fusão de fragmentos de bicamada na interface ar-água somente aconteceu com o aumento da polaridade do meio aquoso.Outros efeitos desestabilizantes de NaCl sobre dispersões de bicamadas em solução aquosa como fusão inter-vesícula foram previamente descritos[Carmona-Ribeiro, 1993]. Pode-se tomar vantagem desse efeito desestabilizante para obter fusão de bicamada em interfaces.

Figura 3-17– Efeito do sal sobre a cinética de tensão superficial para dispersões de DODAX0.2 mM: DODAB (A), DODAC (B), DODAAc (C). As concentrações de sal foram: 0 (■), 1.0 (○), 2 (▲), 10 (▼), 20 (△) e 50 mM (◁)

Na figura 3-18A mostramos a cinética de tensão superficial para vesículas grandes de DODAB (LV), preparadas em água conforme descrição feita na secção 2.3.2, e fragmentos de bicamada de DODAB (BF), ambos a 0.2 mM, após adição de 2.0 mM de sal. Observa-se que a diminuição da tensão γ é mais lenta para as grandes vesículas do que para os fragmentos. Estes têm uma maior frequência de defeitos hidrofóbicos sobre sua estrutura de bicamada devido à natureza fragmentada de suas bicamadas abertas com bordas hidrofóbicas, como visualizado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) ou de criofratura por outros autores. De fato, inúmeras evidências se acumularam na literatura a favor da existência desses fragmentos por dispersão ultrasônica do pó de DODAB em água: ausência de responsividade osmótica dessas dispersões a gradientes osmóticos gerados por solutos impermeantes através da

bicamada, visualização dos fragmentos por diversas técnicas avançadas de microscopia eletrônica e de força atômica, etc [Carmona-Ribeiro et al., 1991; Jass et al., 2000; Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001; Vieira et al., 2003]. Assim, fragmentos fundem-se realmente mais rápido com a interface ar-água do que vesículas inteiras já que expõem regiões hidrofóbicas de suas bordas enquanto que vesículas inteiras e fechadas apresentam frequência menor de defeitos e/ou regiões hidrofóbicas.

Figura 3-18 A: Efeito do método de preparação de bicamada sobre tensão superficial γ na interface ar-água em função do tempo, após adicionar 2.0 mM de NaCl em 0.2 mM de fragmentos de DODAB, BF, ($\blacktriangle$) e vesículas grandes, LV, ($\square$). **B:** Efeito de sal sobre a cinética de γ para 0.2 mM de fragmentos de DODAB (vesículas sonicadas), em uma faixa de concentração de NaCl: 0 ($\blacksquare$), 1.0 ($\circ$), 2 ($\triangle$), 10 (∇), 20 ($\diamond$) e 50 mM ($\triangleleft$)

A competição entre partículas e interface ar-água pela adsorção de vesículas grandes e inteiras de DODAX está mostrada na próxima figura onde se observa que, em presença de partículas o decréscimo total de tensão superficial diminui. Esse resultado foi comum aos três diferentes contra-íons de DODAX testados.

Figura 3-19 Cinéticas de tensão superficial na interface ar-água para vesículas inteiras (vortexadas) de DODAX 0.2 mM preparadas em água, após adição de 50 mM de NaCl, em presença de partículas(○) 2×10^{11} part./ml e na ausência delas (□).

4 Conclusões

Associação de lipídios catiônicos, aniônicos ou neutros, formando bicamadas em filmes poliméricos de carga oposta leva a diferentes arranjos dependendo da concentração de sal adicionada às vesículas. Foi mostrado que o sal em certas concentrações induz fusão intervesículas, favorece também fusão de vesículas com a interface ar-água e interface polímero-água. Em ausência de sal (água pura), forças eletrostáticas não foram suficientes para produzir arranjo de bicamadas desses lipídios sobre filmes de PSS ou PSA. Esta situação contrastou com um resultado previamente obtido para vesículas carregadas e microesferas de poliestireno de carga oposta, onde aconteceu deposição de bicamadas em água pura, isto é, adsorção sendo dirigida por formação de pares iônicos entre cabeças polares carregadas do lipídio e grupos funcionais de carga oposta sobre a superfície das microesferas [Carmona-Ribeiro et al., 1992; Carmona-Ribeiro et al.; 1999; Tsuruta, Carmona-Ribeiro, 1995]. Para suportes esféricos mais hidrofílicos, como a sílica, resultados também anteriormente obtidos de vesículas de DODAB, sugerem partículas de sílica recobertas com bicamadas do lipídio, em água e em 10 mM de força iônica [Esumi et al.; 1992; Rapuano, Carmona-Ribeiro, 2000; Moura, Carmona-Ribeiro, 2003]. O mesmo ocorreu para folhas planas de mica, as quais apresentam uma grande densidade de carga negativa [Pashley et al.; 1986] .

No caso dos nossos filmes, foi observado um aumento de rugosidade quando, como controle, se determinou a espessura *ex situ* em função do tempo do filme puro de poliestireno (vide figura 3-8(A)). O procedimento neste caso incluiu a imersão do filme em água seguido de uma rápida secagem. Possivelmente, isto acontece devido à interação do filme com a água e a sua retirada para o ar. Como o filme polimérico é altamente hidrofóbico ao interagir com a água suas superfícies hidrofóbicas tendem a se esconder levando à formação de rugosidades. Já, os filmes secos de poliestireno que não foram submetidos a processo de imersão em água e posterior secagem, apresentam uma superfície razoavelmente lisa (comunicação pessoal, Dra D.F.S. Petri, dados ainda não publicados). Além disso, os resultados *in situ* de elipsometria não demonstraram este problema, embora se tenha que esperar um tempo de cerca de duas horas para estabilizar as medidas dos ângulos elipsométricos, ψ e Δ , e só então adicionar a dispersão lipídica para começarem as medidas de espessura .

Além da rugosidade, é possível que os filmes poliméricos revestidos não apresentem uma densidade de carga suficiente para, através de interação eletrostática induzirem deposição da bicamada catiônica. Também, a densidade de carga superficial sobre vesículas de DODAB não é alta [Lessa, Carmona-Ribeiro, 1996] e a adsorção demonstrou ser controlada por difusão de vesícula, outra clara indicação que a atração eletrostática entre filme de PSS e vesículas de DODAB em água e em baixa força iônica, não acelera a adsorção. Por outro lado, induzindo defeitos hidrofóbicos na bicamada da vesícula a partir de 50 mM de NaCl, definitivamente se acelerou a adsorção de DODAB com velocidades acima daquelas controladas por difusão (Figura 3-10(C)). Outra vantagem tornou-se aparente da deposição de vesícula induzida por defeitos hidrofóbicos: vesículas adjacentes aderidas na superfície do polímero estão prontas para fundir com cada outra porque apresentarão defeitos hidrofóbicos após ligarem-se à superfície. A cinética *in situ* para adsorção de DODAB em PSS em 50 mM NaCl demonstrou claramente a eficiência dos "defeitos hidrofóbicos" para produzir uma cobertura plana e estável de bicamada sobre superfície polimérica.

Com os fragmentos, BF, ou vesículas fechadas (LV), de DODAX, a pequena concentração de sal induziu fusão desses com a interface ar-água (Figura 3-18 A) e mudou o arranjo de BF sobre as partículas hidrofóbicas (Figura 3-18 B). A idéia de BFs adsorvendo sobre partículas como segmentos verticais (Figura 3-15) seriam justificados pela interação hidrofóbica entre as bordas dos fragmentos e a superfície hidrofóbica das partículas de poliestireno sulfato. Experimentalmente, este tipo de adsorção foi revelado por tamanhos médio de partícula para misturas BF/partículas em água pura, em uma faixa de diâmetros de: 155-170; 125-145 e 125-155 nm para DODAB, DODAC e DODAAC, respectivamente, e por potenciais-zeta que diminuíram substancialmente quando a interação hidrofóbica que mantinha a adsorção de BFs foi desestabilizada por um pequeno aumento de concentração de sal e polaridade do meio (tabela 4 e 5).

A diminuição em tamanho e potenciais-zeta sob adição de baixa concentração de sal foi confirmada para os três contra-íons sob condições de equivalência de áreas superficial total para BF e partículas (figura 3-16). Nota-se primeiramente que, para haver adsorção plana de BF sobre as partículas ao invés de adsorção vertical(protuberante) de BF, a condição necessária seria possivelmente haver área superficial suficiente de partículas para que os segmentos verticais BF pudessem "deitar" , dirigidos pela atração eletrostática com as partículas, logo após a desestabilização provocada pela adição de pouco sal na interação bordas hidrofóbica

/superfície de partícula. Portanto, foram necessários cálculos precisos da equivalência superficial de áreas de BF e partículas. Para condições de concentração acima da equivalência de áreas os BF adsorveriam como uma multidão desordenada, onde poderiam ser encontradas em ambas as situações, tanto como BFs horizontais como BFs verticais. A adição de pouco sal não conseguiria desestabilizar as interações hidrofóbicas de formas a oferecer área superficial suficiente para acomodar BFs verticais (protuberantes) transformados em BFs horizontais (interação eletrostática). Isto foi ilustrado na Figura 3-15. Sob a condição de exata equivalência de áreas e variando a força iônica de zero a um pequeno valor, seria também de se esperar que os BFs adsorvidos verticalmente poderiam “deitar” como BFs planos sobre as partículas. De fato, a adsorção vertical estaria intrinsicamente relacionada ao fato que superfície adsorvente e bordas de fragmentos (adsorbatos) são hidrofóbicas. Para partículas hidrofílicas como a sílica, BF adsorvidos produziram elevada estabilidade coloidal para partículas de sílica a partir da equivalência superficial de áreas [Moura, Carmona-Ribeiro, 2003]. Acima da equivalência de áreas para superfícies hidrofóbicas (partículas poliméricas), em água pura, isotermas de adsorção para os fragmentos mostraram que a deposição excedeu os valores correspondentes a uma bicamada [Tsuruta et al., 1995; Tsuruta, Carmona-Ribeiro., 1996]. Assim, abaixo e acima da equivalência, em água pura, houve baixa estabilidade coloidal para as partículas poliméricas em presença dos BF de carga oposta.

Em conclusão, para que adsorção plana de BF sobre partículas de látex possa ocorrer as seguintes condições devem ser preenchidas: 1) equivalência superficial de áreas para partículas e BF; 2) pequenas concentrações de NaCl adicionadas à mistura BF/partículas em situação de equivalência superficial total de áreas.

5 Referências Bibliográficas

AZZAM, R.M.A.; BASHARA, N.M. **Ellipsometry and polarized light**. 1 ed., Netherlands, North Holland Personal Library, 1987.

BANGHAM, A D.; DE GIER, J.; GREVILLE, G. D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. **Chem. Phys. Lipids**, v.1, p.146-225, 1967.

BASSEREAU, P.; PINCET, F. Quantitative analysis of holes in supported bilayers providing the adsorption energy of surfactants on solid substrate. **Langmuir**. v.13 n.26, p.7003-7007, 1997.

BATAILLARD, P.; GARDIES, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COLIN, B.; MANDRAND, B. Direct detection of immunospecies by capacitancies measurements. **Anal. Chem.**, v.60, n.21, p.2374-2379, 1988.

BATZRI, S.; KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.298, p.1015-1019, 1973.

BAYERL, T.M.; BLOOM, M. Physical-properties of single phospholipid-bilayers adsorbed to micro glass-beads – a new vesicular model system studied by H-2 nuclear magnetic-ressonance. **Biophys. J.**, v.58, p.357-362, 1990.

BEHR, J.P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles : prospect for gene therapy. **Bioconjugate Chem.** v.5, p.382-389, 1994.

BENNETT, T.C.; CREETH, J. E.; JONES. M.N. Solid supported vesicles for bactericide delivery. **J. Liposome Res.** v.10, n.4, p.303-320, 2000.

BERNE, B.; PECORA, R. Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. EVERETT, D.H.; 1988

BLANDAMER, M. J.; BRIGGS, B.; CULLIS, P.M.; ENGBERTS, J.B.F.N.; KACPERSKA, A. Vesicle-surfactant interactions: Effects of added surfactants on the gel to liquid-crystal transition for two vesicular systems **J. Chem. Faraday Trans.**, v 91, n.23, p. 4275-4278, 1995.

BOVEY, F. A.; KOLTHOFF, I. M. Mechanism of emulsion polymerizations .4. Kinetics of polymerization of styrene in water and detergent solutions. **J. POLYM. SCI.** v.5, n.4, p.487-504, 1950.

BRATT, P.; KANG, Y. S.; KEVAN, L.; NAKAMURA, H.; MATSUO, T. Photoionization of neutral and positively charged alkylphenothiazines in positive charged vesicles: Effects of the alkyl chain length. **J. Phys. Chem.**, v.95, n.17, p.6399-6402, 1991.

CARMONA, A. M.; YOSHIDA, L. S.; SESSO, A.; CHAIMOVICH, H. Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.100, n.2, p.433-443, 1984.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer vesicles and liposomes as interface agents. **Chem. Soc. Rev.** v.30 n.4, p.241-247, 2001

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CASTUMA, C. E.; SESSO, A.; SCHREIER, S. Bilayer structure and stability in dihexadecylphosphate dispersions. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.5361-5366, 1991.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v.773, p.172-179, 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; HERRINGTON, T. M. Phospholipid adsorption onto polystyrene microspheres. **J. Colloid Interface Sci.** v.156, p.19-23, 1993.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; MIDMORE, B. R. **Synthetic bilayer adsorption onto polystyrene microspheres.** *Langmuir*, v.8, p.801-806, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; S, Hix. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.1812-1817, 1991

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; Synthetic amphiphile vesicles. **Chem. Soc. Reviews**, v.21, n.3, p.209-214, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; Theoretical and experimental stabilities of synthetic amphiphile vesicles. **J. Phys. Chem.**, v.93, p.2630-2634, 1989.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; YOSHIDA, L. S.; CHAIMOVICHI, H. Salt effects on the stability of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecylphosphate vesicles. **J. Phys. Chem.**, v.89, p.2928, 1985.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; Interactions between bilayer vesicles, biomolecules and interfaces, p. 129-158, Ch. 4, Vol. 5, **Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials** ed. H. S. Nalwa, San Diego, Academic Press, USA, ISBN 01-2513-910-1, 2001.

CHARITAT, T.; BELLET-AMALRIC, E.; FRAGNETO, G.; GRANER, F. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. **Eur. Phys. J.B**, v.8, n.4, p.583-593, 1999.

CLARENCE N, A. M.; NEOGI, P. **Interfacial Phenomena-Surfactant Science Series**, 1.ed., Marcel Dekker, Inc., 1985.

CORNELL, B.A.; BRAACH-MAKSVYTIS, V.L.B.; KING, L.G.; OSMAN, P.D.J.; RAGUSE, B.; WIECZOREK, L.; PACE, R.J. A biosensor that uses ion-channel switches. **Nature**, v.387, p.580-583, 1997.

CREMER, P.S.; GROVES, J.T.; KUNG, L.A.; BOXER, S.G. Writing and erasing barriers to lateral mobility into fluid phospholipid bilayers. **Langmuir**, v.15, n.11, p.3893-3896, 1999.

CUCOVIA, I.M.; KAWAMURO, M.K.; KRUTMAN, M.A.K.; CHAIMOVICHI, H. Control of reaction rates in vesicular systems. **J. Am. Chem. Soc.**, v.111, p.365-366, 1989.

EIBL, H.; BLUME, A. The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, n.553, p.476-488, 1979.

EVANS, D. F.; WENNERSTRÖM, H. **The Colloidal Domain-Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet.**, 1 ed., VCH Publishers. Inc., 1994.

FAIRHURST, D.; McFADYEN, P.; WEINER, B.B; TSCHARNUTER, W.W. **Brookhaven Instruments Corporation**, Holtsville, New York 11742, USA.

FELGNER, P.L.; HOLM, M. Cationic liposome-mediated transfection. **Focus**, v.11, n.2, p.21-25, 1989.

FENDLER, J.H. **Membrane Mimetic Chemistry**, 1 Ed. New York, Wiley-Interscience, 1982

FENDLER, J.H. Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization. **Acc. Chem. Res.**, v.17, p.7-13, 1980.

FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S.. Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces. **Langmuir**. v.17, n.1, p.56-60, 2001.

GENNIS, R. B. **Biomembranes: Molecular Structure and Function**. 1 ed., New York, Springer Verlag, Inc, 1989.

GUGLIOTTI, M.; POLITI, M.J.; CHAIMOVICHI, H. Phase transition temperature of vesicles determined by surface tension measurements: A fast method. **J. Colloid Interface Sci.**, 198,1(1998)

GOOD, R.J. Contact angle, wetting and adhesion: a critical review. In: MITTAL, K.L. **Contact Angle Wettability and Adhesion**. Utrecht, VSP, p.3-36, 1993.

GOODWIN, J.W.; OTTEWILL, R.H.; PELTON, R. Studies on the preparation and characterization of monodisperse polystyrene lattices. **Colloid & Polymer Sci.** 257, p.65-69, 1979

GRABOWSKI, E. F.; MORRISON, I. D. Particle Size Distribution from Analysis of Quasi-Elastic Light Scattering Data. In *Measurements of Suspended Particles by Quasi-Elastic Light Scattering*; Dahneke, B., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1983; Chapter 7

GREGORY, J. The calculation of Hamaker constants. **Adv. Colloid Interface Sci.** v.2, n.4, p.396-417, 1970.

HIEMENZ, P. C. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 2 Ed. New York, Marcel, 1986.

HIGUSHI, W. I.; OKADA, R.; STELTER, G. A.; LEMBERGER, A. P. Kinetics of rapid aggregation in suspensions - comparison of experiments with Smoluchowski theory. **J. Pharm. Sci.**, v.52, n.1, p.49-&, 1963.

HONG, F. Molecular electronics: Science and technology for the future. **IEEE-Engineering in medicine and biology**, v.13, p.25-32, 1994.

INSTRUCTION MANUAL for ZETA-POTENTIAL ANALIZER. Brookhaven Instruments Corporation, 750, Blue Point Road – Holtsville, NY 11742.

ISRAELACHIVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 2 ed. London, Academic Press, 1992

ISRAELACHIVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v.470, n.2, p.185-201, 1977.

JACKSON, S.; REBOIRAS, M. D.; LYLE, I. G.; JONES, M. N. Adsorption of phospholipid vesicles on solid surfaces. **Faraday Discuss. Chem. Soc.**, v.81, p. 291-301, 1986.

JASS, J.; TJÄRNHAGE, T.; PUU, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. **Biophys. J.**, v. 79, p.3153-3163, 2000.

JOHNSON, R. E.; DETTRE, R. H.; BRANDRETH, D. A. Dynamic contact angles and contact angle hysteresis. **J. Colloid Interface Sci.**, v.62, n.2, p.205-212, 1997.

KALB, E.; FREY, S.; TAMM, L. K. Formation of supported planar bilayer by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. **Biochim. Biophys. Acta**, n.1103, p.307-316, 1992.

KANO, K.; ROMERO, A.; DJERMOUNI, B.; ACHE, H.; FENDLER, J. H. Characterization of surfactant vesicle as a membrane mimetic agent.2 temperature-dependent changes of turbidity, viscosity, fluorescence polarization of 2-methylantracene, and positron annihilation in sonicated dioctadecyldimethylammonium chloride. **J. Am. Chem. Soc.** V.101, p.4030, 1979.

KASBAUER, M.; BAYERL, T. M. Formation of domains of cationic or anionic lipids in binary lipid mixtures increases the electrostatic coupling strength of water-soluble proteins to supported bilayers. **Biochemistry**, v.38, n.46, p.15258-15263, 1999.

KATZ, D.; KRAAIJEVELD, C. A.; SNIPPE, H.. Synthetic lipid compound as antigen-specific immunostimulators for improving the efficacy of killed-virus vaccines. In: **Theory and practical application of adjuvants**. Chichester: Stewart-Tull, D.E.S., Ed. John Willey & sons, 1995.

KREMER, J. M. H.; ESKES, M. W. J. V. D.; PATHMAMANOCHARAN, C.; WIERSEMA, P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. **Biochemistry**, v.16, p.3932-3935, 1977.

KRIKA, L. J. Molecular and ionic recognition by biological systems. In: EDMONDS, T.E **Chemical Sensors**. London, Blackie and Son Ltd., p.3-14, 1988.

KUNITAKE, T. Chemistry of self-assembling bilayers and related molecular layers. **Materials Research Society (MRS) Bulletin**, v.20, n.6, p.22-25, 1995.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y.; TAMAKI, K.; KUMAMARU, F.; TAKAYANAGI, M. Formation of the bilayer membrane from a series of quaternary ammonium salts. **Chem. Lett.**, n.4, p.387-390, 1977.

LARSSON, K. **Lipids-Molecular organization, physical functions and technical applications**, 1 ed. Glasgow, The Oily Press LTDA, 1994.

LESSA, M. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer wetting on polymer surfaces. **J. Colloid Interface Sci.** v.182, p.166-171, 1996.

LI, B.; RUCKEINSTEIN, E. Adsorption of ionic surfactants on charged solid surfaces from aqueous solutions. **Langmuir**, v.12, p.5052-5063, 1996.

MARMUR, A. Equilibrium contact angle: theory and measurement. **Colloid & Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.116, p.55-61, 1996.

MARRA, J.; ISRAELACHVILI, J. N. Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous-electrolyte solutions. **Biochemistry**, v.24, n.17, p.4608-4618, 1985.

MARZOOCO, A.; TORRES, B. B.; **Bioquímica Básica**, 2^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1999.

MIDMORE, B. R.; HUNTER, R. J.. The effect of electrolyte concentration and cation type on the ξ -potential of polystyrene lattices. **J. Colloid Interf. Sci.** v.122, N.2, p. 521-529, 1988.

MORTARA, R. A.; QUINA, F. H.; CHAIMOVICHI, H. Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester. Preparation and some properties of vesicles of dihexadecyl phosphate. **Biochem. Biophys. Research Commun.**, v.81, n.4, p.1080-1086, 1978.

MOTSCHMANN, H. STAMM, M.; TOPRAKCIOGLU, C. Adsorption-kinetics of block copolymers from a good solvent - a 2-stage process. **Macromolecules**, v.24, n.12, p.3681-3688, 1991.

MOU, J. X.; CZAJKOWSKI, D. M.; SHAO, Z. F. Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers. **Biochemistry**, v.35, n.10, p.3222-3226, 1996.

MOURA, S. P.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic Bilayer on Sílica at Low Ionic Strength: Competitive Adsorption and Colloid Stability. **Langmuir**, v.19, p.6664-6667, 2003.

NEW, R. R. C. **Liposomes- A Practical Approach.**, 1 Ed. New York, IRL Press, 1994.

OBERBEEK, J. TH. G. Recent developments in the understanding of colloid stability. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.58, N.2, p. 408- 422, 1977.

OTTEWILL, R. H.; SHAW, J. N. Kolloid Z. U. Z. **Polymere** 215, 161, 1967

PANSU, R. B.; ARRIO, B.; RONCIN, J.; Faure, J. Vesicles versus membrane fragments in DODAC suspensions. **J. Phys. Chem.**, v.94, p.796-801, 1990.

PARK, J. G.; RAGHAVAN, S. Dynamic wetting behavior of silicon wafers in alkaline solutions of interest to semiconductor processing. In: MITTAL, K. L. **Contact Angle and Adhesion**. Utrecht, VSP, p.421-435, 1993

PETERMANN, L .B.; BAROUX, B.; FONTAINE, M N. B. The influence of metallic surface wetability on bacterial adhesion. In: Mittal, K.L. Cotact Angle Wettability and Adhesion. Utrecht, VSP, p.839-848, 1993.

PLANT, A.; BRIGHAMBURKE, M.; PETRELLA, E. C.; O'SHANESSY, D. J. phospholipid alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface-plasmon resonance. **Anal. Biochem.** V.226, n.2, p.342-348, 1995.

PUU, G.; GUSTAFSON, I.; ARTURSSON, E.; OHLSSON, P.A. Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on solid support. **Biosensors & Bioelectronics**, v.10, p.463-476, 1995.

RAPUANO. R.; CARMONA-RIBEIRO, A .M. Physical adsorption of bilayer membranes on silica. J. Colloid Interf. Sci., v.193, n.1 p.104-111, 1997.

REERINK, N. H. G.; OVERBEEK, J. TH. G. The rate of coagulation as a measure of the stability of silver iodide sols. **Discuss. Faraday Soc.** V.18, p.74-84, 1954.

ROUSER, G.; FLEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. 2 dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analisys spots. **Lipids**, v.5, n.5, p.494-496, 1970.

RUPERT, L. A. M. **Vesicle from simple synthetic amphiphiles as membranes mimetic-systems-fusogenic and polymorphic behavior.** Groningen, 1987. Tese(doutorado)- Rijksuniversiteit te Groningen.

SACKMANN, E. Supported membranes: scientific and pratical applications. **Science**, v.271, p.43-48, 1996.

SALAY, L. C. Efeito de vesículas sintéticas ou fosfolipídicas sobre a molhabilidade de superfícies planares de óxido de silício. Dissertação de Mestrado – EPUSP - 1997.

SCHALES, O.; SCHALES, S. S. A simple and accurate method for determination of chloride in biological fluids. **J. Biol. Chem.**, v.140, p.879-884, 1941.

SHARMA, B. G.; BASU, S.; SHARMA, M. M. Characterization of adsorbed ionic surfactants on a mica substrate. **Langmuir**, v.12, p.6506-6512, 1996.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 2 ed. Editora Edgard Blücher Ltd., 1975

SHEAR, J. B.; FISHMAN, H. A.; ALLBRITTON, N. L.; GARIGAN, D.; ZARE, R. N.; SCHELLER, R. H. Single cells as biosensors for chemical separations. **Science**, v.267, p.74-77, 1995.

SICCHIEROLLI, S. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Biomolecular recognition at phospholipid-covered polystyrene microspheres. **J. Phys. Chem. B**, v.100, p.16771-16775, 1996.

SICCHIEROLLI, S. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Incorporation of the cholera-toxin receptor in phospholipid-covered polystyrene microspheres. **Colloids Surf. B**, v.5, n.1-2, p.57-61, 1995.

SIQUEIRA, D. F.; REITER, J.; BREINER, U.; STADLER, R.; STAMM, M. Competitive Adsorption of Functionalized Polymers. **Langmuir**, v.12, p. 972-979, 1996.

STEINEM, C.; JANSHOFF, A.; ULRICH, W. P.; SIEBER, M.; GALLA, H. J. Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques. **Biochim. Biophys. Acta**, n.1279, p.169-180, 1996.

STELMO, M.; CHAIMOVICHI, H.; CUCCOVIA, I. M. Quantitative-determination of alkylammonium amphiphiles using neutral detergents. **J. Colloid Interface Sci.**, v.117, p.200-204, 1987.

STELZLE, M.; WEISSMÜLLER, G.; SACKMANN, E. On the application to supported lipid bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection. **J. Phys. Chem.**, v.97, p.2974-2981, 1993.

TAKAYASU, M. M.; GALEMBECK, F. Polystyrene latex coagulation - a study using centrifugation in density gradients. **J. Colloid Interf. Sci.** v.155, n.1, p.16-22, 1993.

TAMM, L. K.; McCONNELL, H. M. supported phospholipid-bilayers. **Biophys. J.**, v.47, n.1, p.105, 1985.

TAPIAS, G. N.; SICCHIEROLLI, S. M.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; Interaction between cationic vesicles and *Escherichia coli*. **Langmuir**, v.10, p.3461-3465, 1994.

THOMAS, M.; KAUFMAN, F.B.; KIRLEIS, J. T.; BELSKY, R. A. Wettability of polished silicon oxide surfaces. **J. Electrochem. Soc.**, v.143, n.1, p.643-648, 1996.

THOMPSON, M.; DORN, W. H. Selective chemical transduction based on chemoreceptive control of membrane ion permeability. In: EDMONDS, T. E. **Chemical Sensors**. London, Blackie and Son Ltd., p.168-190, 1988.

TSURUTA, L. R.; QUINTILIO, W.; COSTA, M. H. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Interactions between cationic liposomes and an antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. **J. Lipid Res.** V.38, p.20-28, 1997.

UTO, M.; ARAKI, M.; TANAGUCHI, T.; HOSHI, S.; INOUE, S. Stability of an agar-supported bilayer lipid membrane and its application to a chemical sensor. **Analytical Sciences**, v.10, p.943-947, 1994.

VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.244 n.2, p.427-431, 2001.

VIEIRA, D. B.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; PETRI, D. F. S.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.. Competitive adsorption of cationic bilayers and chitosan on latex: Optimal biocidal action. **Langmuir**, v.19, n.3, p.924-932, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2^a ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1995.

VOLD, M. J. The effect of absorption on the van der Waals interaction of spherical colloidal particles. **J. Colloid Sci**, v.16, n.1, p.1-&, 1961.

WÄNGNERUD, P.; JÖNSSON, B. Adsorption of ionic amphiphiles as bilayers on charged surfaces. **Langmuir**, v.10, p.3268-33278, 1994.

Assemblies of Cationic Lipids on Polymeric Films

EDLA MORAES ABREU PEREIRA,
DENISE FREITAS SIQUEIRA PETRI and
ANA MARIA CARMONA-RIBEIRO*

*Instituto de Química, Universidade de São Paulo,
CP 26077, 05513-970 São Paulo SP, Brazil, mcrbeir@iq.usp.br*

The interaction between lipid vesicles and hydrophobic surfaces (air-water and polymer-water) is evaluated from surface tension measurements, contact angles in air and ellipsometry *in situ* for determining thickness of deposited molecular films in water. At 50 mM NaCl and 0.2 mM of the cationic dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) lipid, DODAB adsorption as a function of time yielded an adsorbed layer of 6.0 nm at maximal adsorption onto the polymeric film. The hydrophobic character of the adsorbed DODAB film in air was depicted from advancing contact angles equal to 84 ± 3 degrees, which were higher than those for the bare polystyrene sulfate film, 71 ± 4 . At 50 mM NaCl, 0.2 mM DODAB induced a large decrease of surface tension (from 72 up to 40 mN/m) suggesting NaCl-induced vesicle fusion with the hydrophobic air-water interface. Possibly, NaCl-induced hydrophobic defects in the bilayer vesicle originated vesicle fusion both with the air-water interface (showed by the decreasing in the surface tension) and the hydrophobic polymer-water surface (seen from ellipsometric detection of a deposited molecular film on the polymer surface). NaCl seems to be inducing hydrophobic defects at the DODAB bilayer that are responsible for extensive vesicle fusion with both air-water and polymer-water interfaces.

Keywords: vesicles; polystyrene films; air-water interface; surface tension; contact angles; ellipsometry.

INTRODUCTION

The understanding of interactions between bilayer and polymeric films is important not only from a cognitive ^[1, 2] but also from an applied research point of view, e. g. design of antigen-antibody kits and biosensors ^[3, 4]. Low cost and easy processing are the advantages of polystyrene, while DODAB vesicles, besides its low cost, have also high affinity for biomolecules, drugs and polymers ^[4, 5]. We have previously characterized the interactions between lipid vesicles and polystyrene microspheres ^[6] but their interaction with flat polystyrene surfaces was not previously explored. On the other hand, one of us described the adsorption behavior of polymeric films on silicon wafers using the advantages of ellipsometry *in situ* to obtain a dynamic characterization of thickness and refractive index of polymers at the silicon surface ^[7, 8]. In this work, we join our efforts to characterize molecular films of dioctadecyldimethylammonium (DODAB) from vesicles in aqueous medium adsorbing from solution onto spin-coated, sulfate-terminated polystyrene films casted on silicon wafers. Surface tension, ellipsometry *in situ* and contact angle measurements were obtained at an experimental condition that favored DODAB vesicle fusion, i.e., addition of 50 mM NaCl to vesicles prepared in water ^[9]. The determination of the adsorption kinetics ^[7, 8] is specially important for the development of biotechnological devices where the response time is a decisive parameter. The adsorption kinetics of DODAB from vesicles onto flat polystyrene films was determined at 50 mM NaCl by means of *in situ* ellipsometry plotting the adsorbed amount as a function of time.

At 50 mM NaCl and 0.2 mM DODAB, *in situ* DODAB adsorption as a function of time instantaneously yielded an adsorbed layer of 6.0 nm at maximal adsorption onto the polymeric film that remained as such as a function of time. The hydrophobic character of the adsorbed DODAB film in air was depicted from advancing contact angles equal to 84 ± 3 degrees, which were higher than those for the bare polystyrene sulfate film, 71 ± 4 . At 50 mM NaCl, 0.2 mM DODAB induced a large decrease of surface tension (from 72 up to 40 mN/m) suggesting NaCl -induced vesicle fusion with hydrophobic air-water interface.

The addition of 50 mM NaCl induced hydrophobic defects in the bilayer vesicles leading to vesicle fusion with both polymer-water and air-water interfaces.

EXPERIMENTAL SECTION

DODAB was purchased from Sigma. DODAB concentration was determined by microtitration^[10]. The aqueous dispersion of PSS latex particles described as ultraclean by the supplier was obtained from Interfacial Dynamics Corp. (Portland, OR) and used as supplied. All other reagents were analytical grade and used without further purification. Water was Milli-Q quality. DODAB vesicles, 86 nm mean diameter, were prepared by sonication in water followed by centrifugation (0.5 h/ 15.800 g / 15°C) to eliminate titanium ejected from the tip^[5]. Silicon wafers were purchased from Crystec (Berlin, Germany) with a native oxide layer approximately 2 nm thick and carefully rinsed following a standard procedure before being used to prepare the polymer films^[7]. Aqueous dispersions of polystyrene latex particles purchased from Interfacial Dynamics Corporation (Portland, USA), 711 nm mean diameter, were dried under vacuum at room temperature until constant weight and dissolved in toluene to a final concentration of 8 mg/ml. The polymeric solutions were spin-coated on the Si wafers (3000 rpm /30s) yielding films 15 -20 nm thick.. The ellipsometer was a vertical one set to yield an incidence angle of 70.0° for the polarized 632.8 nm laser beam; the null setting for the polarizers yielding the two ellipsometric angles related to the relative phase shift and attenuation of the component waves perpendicular and parallel to the plane of incidence, respectively. These two angles were measured and recorded in periods of 4 s. Data were interpreted in accordance with a multilayer model^[7, 8] to obtain thickness and amount of the adsorbed DODAB layer assuming 1.500 as its refractive index. The experimental set up and equations used for calculations are in^[8]. Surface tension was determined as a function of time using a Du Nouy ring at regular periods of 10 minutes after adding NaCl 50 mM to obtain a final DODAB concentration of 0.2 mM. As a control, the same was done adding pure water. Contact angles were determined using the sessile drop method for 4 and 2 µL water droplets corresponding to advancing and receding angles, respectively, which were placed with a microsyringe on the rinsed and dried polymer film that previously interacted for 2 h with the 0.2 mM DODAB vesicle dispersion.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows amount of adsorbed DODAB (A) as a function of time after salt addition; mean DODAB thickness almost instantaneously reaching 6.0 ± 0.5 nm, i.e. the theoretical thickness of a DODAB bilayer plus one 1.0 nm water layer.

FIGURE 1 Amount of DODAB adsorbed (mg/m^2) or layer thickness (nm) as a function of time, after NaCl addition.

Figure 2 shows the effect of time on the surface tension of a 0.2 mM DODAB dispersion after adding 50 mM NaCl. There is a decrease of surface tension in 50 mM salt that is not observed in pure water. This means that the bilayer vesicles in pure water do not adsorb at the air-water interface but do so in the presence of 50 mM salt, possibly because of salt-induced hydrophobic defects at the bilayer surface^[9]. The same defects that cause vesicle-vesicle fusion induce vesicle fusion with the air-water interface and decrease of surface tension.

The effect of DODAB adsorption on wettability of the PSS film is in TABLE 1. The bare PSS film is hydrophobic ($\theta_a = 71^\circ$) but DODAB adsorption turns it even more more hydrophobic ($\theta_a = 84^\circ$). After drying, DODAB hydrocarbon chains become oriented towards the air increasing hydrophobicity.

FIGURE 2 The effect of time on surface tension of a 0.2 mM DODAB dispersion prepared in water and added of water or 50 mM NaCl.

TABLE 1 The effect of DODAB 0.2 mM on wettability of polystyrene sulfate films. The wafers were gently rinsed three times in pure water, dried under vacuum for 0.5 hour and used for determining contact angles.

Surf	Θ	Θ	Δ
PSS/	7	6	5
SiO ₂	1	6	
	$\pm$	$\pm$	
	4	4	
Lipi	8	8	3

CONCLUSIONS

At 50 mM NaCl, the eletrostatic repulsion between adjacent polar heads in the DODAB bilayer vesicle is screened and hydrophobic defects may appear leading either to fusion of bilayer vesicles among themselves or to their fusion to hydrophobic interfaces such as the polymer-water or the air-water interface.

Vesicle fusion to the hydrophobic interface is an essential step to obtain deposition of a continuous bilayer onto the flat hydrophobic surface.

ACKNOWLEDGMENTS

FAPESP AND CNPq are acknowledged for research grants.

REFERENCES

- [1] A. M. Carmona-Ribeiro Chem. Soc. Rev. **21**, 209 (1992)
- [2] A. M. Carmona-Ribeiro Chem. Soc. Rev. **30** (4), 241 -247 (2001).
- [3] B. Eggins Biosensors and Introduction (1997) , Wiley & Sons, New York, NY.
- [4] A. M. Carmona-Ribeiro, Interactions between bilayer vesicles, biomolecules and interfaces Chapter 4, Volume 5, Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials, edited by Hari Singh Nalwa, San Diego, Academic Press, USA, ISBN 0125139101.
- [5] A. M. Carmona-Ribeiro An. Acad. Bras. Ci. **72** (1), 39 (2000).
- [6] A. M. Carmona-Ribeiro, M. M. Lessa Colloid Surf. B **153**, 355 (1999).
- [7] D. F. Siqueira, J. Reiter, U. Breiner, R. Stadler, M. Stamm Langmuir **12**, 972 (1996).
- [8] J. Fujimoto, D. F. S. Petri Langmuir **17**, 56 (2001).
- [9] A. M. Carmona-Ribeiro, H. Chaimovich, Biophys. J. **50**, 621 (1986).
- [10] O. Schales, S. S. Schales J. Biol. Chem. **140**, 879 (1941).

Synthetic Vesicles at Hydrophobic Surfaces

Edla M. A. Pereira, Denise F. S. Petri, and Ana M. Carmona-Ribeiro*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo SP, Brazil

Received: March 18, 2002

Determinations of surface tension (γ) at the air–water interface, contact angles (θ), and in and ex situ ellipsometric mean thickness (d) were used to study the interaction between dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) small vesicles and spin-coated polystyrene sulfate (PSS) films on silicon wafers. Upon the addition of NaCl (50 mM final concentration) to a 0.2 mM DODAB dispersion, adsorption from vesicles on PSS films immediately yielded a DODAB layer 6.0 nm thick which remained stable as a function of time. However, in water, in situ DODAB adsorption monotonically increased reaching at most 1.6–1.8 nm as a function of time (from 15 min of interaction), which were not values consistent with bilayer deposition. At early stages in pure water, DODAB adsorption linearly increased with the square root of time, indicating a vesicle diffusion controlled process with ca. $1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ as the vesicle diffusion coefficient (D) in nice agreement with reported D for similar vesicles. In contrast, adding 50 mM salt, resulted in a very fast adsorption kinetics determined by the hydrophobic attraction between salt-induced defects on the bilayer and the film surface. Ex situ measurements of DODAB adsorption were difficult because wetting/drying cycles of the PSS film increased its mean thickness. From 0.1 up to 1.0 mM DODAB, the adsorbed DODAB film in air was more hydrophobic (advancing contact angle, $\theta_a = 84 \pm 3^\circ$) than the bare PSS film ($\theta_a = 71 \pm 4^\circ$). Air–water surface tension for a DODAB dispersion in pure water rapidly decreased upon salt addition (7–50 mM NaCl), suggesting salt-induced vesicle fusion with the air–water interface occurred, in nice agreement with salt-induced vesicle fusion at the hydrophobic polymer–water surface.

Introduction

Supported bilayers have been recognized as models for biological membranes where the structure and function of membrane peptides, proteins, and receptors can be conveniently isolated and reconstituted.^{1–9} Several surfaces have been used as supports to deposit the bilayer or adhered bilayer vesicles, e.g., glass coverslips for spectroscopic studies,¹⁰ mica sheets for the surface force apparatus,^{11–13} polymer-coated surfaces with one or more polymer layers,^{14–18} bacteria,¹⁹ yeasts²⁰ or mammalian²¹ cell surfaces, mineral particles such as silica,^{22–26} glass beads,²⁷ or titanium dioxide²⁸ and polymeric particles, such as latex.^{29–31}

The easiest method for preparing high quality phospholipid bilayers on a flat hydrophilic surface is the direct fusion of small unilamellar vesicles,^{32,33} a method devised to make unilamellar membranes on glass coverslips for spectroscopic studies.^{34,35} Phospholipid vesicle fusion could be induced at the hydrophilic surface with traces of divalent cations. The other method for preparing supported membranes was the controlled transfer of monolayers to the surface using the Langmuir trough.³⁶ Content in each monolayer is easily controlled, and the transfer pressure can be at a desirable value.^{37,38} The vesicle fusion method is simple and allows a natural lateral pressure in the bilayer.

A major question regarding interactions between lipid vesicles and surfaces is the definition of factors which determine bilayer deposition, simple adhesion of entire vesicles and/or monolayer coverage on the surface.

On the other hand, charged synthetic bilayer vesicles of dioctadecyldimethylammonium chloride (DODAC) or bromide (DODAB) or sodium dihexadecyl phosphate (DHP) have found a myriad of new uses.^{7,9} They are highly charged in water, in the gel state at room temperature and have a much smoother surface charge distribution than other colloids.³⁹ Because of these properties, they have been used to test theories for colloids^{9,14,20,31} despite their polydispersity. In contrast, polystyrene microspheres are homodisperse so that bilayer deposition produced homodisperse bilayer-covered microspheres.²⁹ However, the physicochemical factors and interaction forces determining bilayer deposition on spherical or flat polymeric surfaces are not completely understood.^{7,9,15–18}

In this work interactions between spin-coated polystyrene sulfate (PSS) films and dioctadecyldimethylammonium (DODAB) vesicles are further characterized using in situ ellipsometry,^{40–44} determinations of surface tension at the air–water interface and wettability of the PSS film before and after interaction with DODAB vesicles. A dynamic characterization of average thickness for DODAB assemblies on PSS films is obtained from in situ ellipsometry. Addition of 50 mM NaCl to DODAB vesicles prepared in water was previously shown to induce intervesicle fusion.^{45,46} Here we show that addition of NaCl, 50 mM final concentration, to the vesicle dispersion prepared in water originates vesicle fusion both with the air–water, depicted from a large decrease in surface tension, and the polymer–water interface, depicted from in situ ellipsometry. The results are explained from salt-induced hydrophobic defects in the bilayer leading both to intervesicle and vesicle–surface fusion.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 55 11 3091 3810 EXT237. Fax: 55 11 3815 5579. E-mail: mcricbeir@iq.usp.br.

Materials and Methods

DODAB 99.9% pure was purchased from Sigma. DODAB concentration was determined by microtitration.⁴⁷ Polystyrene sulfate microspheres described as ultraclean by the supplier were obtained from Interfacial Dynamics Corp. (Portland, OR) and used as supplied. These uniform polystyrene microspheres were stabilized by negative sulfate charges (PSS). The main characteristics of the microspheres as specified by the supplier are 711 nm mean diameter, 2.26 nm² as the area per charge group, and 79989 cm² g⁻¹ as the specific surface area. Mean diameters were obtained by the supplier using an electron microscope. All other reagents were analytical grade and used without further purification. Water was Milli-Q quality.

Silicon (100) wafers were purchased from Crystec (Berlin, Germany) with a native oxide layer approximately 2 nm thick and rinsed in accordance with previously described protocols.^{48,49}

The aqueous dispersions of PSS latex particles with mean diameters of 711 nm was dried under vacuum at room temperature until constant weight. Dried PSS was dissolved in toluene to a concentration of 8 mg/mL. The polymeric solutions were spin-coated (Spinner Headway PWM32-PS-R790, Garland, TX) on the Si wafers at 3000 rpm for 30 s. The mean film thickness varied from 15 to 30 nm, as determined by ellipsometry.

DODAB vesicles were prepared by sonication in water followed by 1 h centrifugation at 15,800 g and 15 °C to eliminate titanium ejected from the tip.³⁹ Mean diameter for DODAB vesicles thus prepared was 84 nm²⁹ being relevant to recall that the DODAB bilayer is in the rigid gel state at room temperature, in contrast to the liquid like physical state of most single chained surfactants.⁵³

Several films prepared as described above were immersed in the vesicles dispersions in water with lipids in the concentration range of 0.02–1.2 mM for a period of 16 h in a conditioned room, where the temperature ranged from 22 to 23 °C. After this, the substrates were removed from the solutions, gently washed three times in deionized water, and dried under vacuum at room temperature. This was the procedure for ellipsometric measurements *ex situ*, which are not presented in this work but are already in press elsewhere to include a survey of *ex situ* measurements for different lipids and films. As controls, PSS films immersed in pure water or NaCl solution had their thickness determined *ex situ* as a function of time. For the *in situ* procedure, the films were first immersed in the ellipsometer trapezoidal cell, which contained pure water or NaCl solution only and the PSS thickness was measured until attaining a stable value. The behavior of the PSS film supported by the wafer upon its immersion in aqueous solution was expected due to low compatibility between the silicon dioxide layer or the bulk water and the hydrophobic polystyrene film. There was an increase of the PSS film thickness measured *ex situ* as a function of time. Since the PSS thickness attained a plateau after 1–2 h of its immersion in water, for obtaining the *in situ* ellipsometric data with DODAB as a function of time after adding DODAB, we waited the required time for a stable *in situ* PSS thickness before adding DODAB and starting the kinetics record. It was very reassuring to have met diffusion coefficients calculated from the kinetics that were very consistent with those previously obtained for diffusion of similar vesicles using other techniques (see the Results section).

Ellipsometric measurements were performed *ex situ* (in air) or *in situ* (in water solution) using a vertical computer-controlled DRE-EL02 Ellipsometer (Ratzburg, Germany). The angle of

Figure 1. Schematic representation of a wafer–polymer–lipid multilayer with quoted optical properties previously determined in order to obtain directly an average thickness under air (*ex situ*) for the uppermost DODAB layer.

incidence was set to 70.0° and the wavelength of the laser was 632.8 nm with an incidence area of 3 mm². Adsorption from the solution was monitored *in situ* with a trapezoidal poly-(tetrafluoroethylene) cell described elsewhere.⁴⁴ At a controlled temperature (22–23° C), ellipsometric angles Δ and Ψ were measured and recorded at intervals of 4 s. For the interpretation of the ellipsometric angles Δ and Ψ a multilayer model was used, assuming refractive index n for Si, 3.858–0.018 i; for SiO₂, 1.462; for polymeric film, 1.565; for the lipid layer, 1.500. If the adsorbed lipid layer is regarded as a homogeneous film, the thickness can be calculated by iterative calculations with Jones' matrixes.^{40,41,44,48,49} As reviewed previously,⁴¹ despite the low optical contrast for adsorbed surfactant layers relative to the aqueous bulk solution, ellipsometry has been successfully applied for *in situ* determinations of properties of thin adsorbed surfactant films other than the adsorbed amount by accurately determining the optical properties of the multilayer substrate, like the surfactant/SiO₂/Si layers, in different ambient media (air and water).

From the ellipsometric angles Δ and Ψ , a multilayer model composed of Si, SiO₂, polystyrene film, DODAB layer, and the bulk solution (see Figure 1 for a schematic representation), and the iterative calculations,^{40–44,48} it is possible to determine the average thickness of the uppermost DODAB layer, d both statically and dynamically. One should notice that each layer is usually characterized sequentially regarding independent ellipsometric determinations of thickness and refractive index.^{40,41,44,48,49} The adsorbed amount Γ is determined from the Feiters equation:

$$\Gamma = \frac{d(n_{\text{DODAB}} - n_0)}{dn/dc} \quad (1)$$

where n_{DODAB} is the refractive index of the DODAB layer set to 1.500, n_0 is the index of refraction of the bulk solution (measured as 1.333, using an Abbé refractometer), and dn/dc is the increment of refractive index determined with a differential refractometer as 0.16 mL g⁻¹ at 23 °C. One should notice that $(n_{\text{DODAB}} - n_0)/(dn/dc)$ is very close to 1, so that figures for Γ (in mg/cm²) are practically equal to values for d (in nm). In addition, one should also notice that ellipsometry enables the independent determination of n and d , only if the optical contrast in the system is large enough or if the layer thickness is thick enough. When λ is 632.8 nm and $d \gg 30$ nm, it is possible to obtain n and d for the uppermost layer independently. However,

in the present system, $d \ll 30$ nm for the uppermost lipid layer, so that n must be assumed as $n = 1.500$, the usual value for an hydrocarbon layer, and d calculated from ellipsometric angles and the multilayer model plus independent determinations of thicknesses and refractive indices for each layer.

The adsorption kinetics of DODAB onto PS films was studied in situ by means of ellipsometry. Considering that at the initial stages the adsorption is controlled by the diffusion of lipids from the bulk solution to the bare substrate, the diffusion coefficient D can be calculated from the equation below:^{48,49}

$$\Gamma(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} c_{\text{bulk}} \sqrt{Dt} \quad (2)$$

where c_{bulk} is the DODAB concentration in the bulk.

Contact angle measurements were performed in a home-built⁵⁰ apparatus equipped with a Casio QV-10 digital camera, which was connected to a computer. Sessile water drops of 4 and 2 μL were used for the advancing (θ_A) and the receding contact angle (θ_R), respectively. The image digitization helps to determine more accurately the respective angles. The measurements were performed with water drops on the substrates before and after lipid adsorption.

Surface tension at the air–water interface was measured at 25° C as a function of time after adding NaCl to a 0.2 mM DODAB vesicles dispersion prepared in pure water were determined with a Du Nouy ring as previously described.^{51,55}

Results and Discussion

Figure 1 shows an example of a multilayer model with optical properties such as refractive index and average mean thickness for each layer. The medium ex situ is air whereas the medium in situ is the water solution.

DODAB adsorption from vesicles onto PSS films was followed from ellipsometry in situ (Figure 2). At early stages, the adsorption kinetics in pure water or at very low monovalent salt (Figure 2A,B, respectively) followed a linear dependence on the square root of time (Figure 3 A,B, respectively). This allowed calculation of a diffusion coefficient for the adsorbed species equal to ca. $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, which was precisely the diffusion coefficient reported previously for vesicles of similar sizes.²⁷ Furthermore, this directly supported a mechanism for DODAB adsorption via entire vesicle deposition instead of monomer transfer and agreed with previous data from the literature suggesting this same mechanism for phospholipid adsorption onto glass²⁷ or for synthetic amphiphiles from vesicles adsorbing onto polystyrene sulfate microspheres.²⁹

As adsorption proceeded, the limiting DODAB deposition was attained at mean thicknesses of 1.6–1.7 nm in water or in 0.1 mM NaCl (Figure 2A,B), figures barely consistent with deposition of a DODAB monolayer, which should be theoretically equal to 2.2–2.5 nm. Possibly, entire vesicles became sparsely adhered to the flat polymer film without further vesicle disruption and fusion with the surface. However, upon addition of NaCl to a final concentration of 50 mM, DODAB adsorption was very rapid at early stages and ended up with a 6.0 nm DODAB layer thickness (Figure 2C), in good agreement with the 5.0 nm expected for DODAB bilayer deposition on the PSS surface. This result was consistent with salt-induced DODAB vesicle fusion to the surface. Furthermore, DODAB vesicles were also reported to present a maximal extent of intervesicle fusion upon addition of NaCl at a final concentration of 50 mM.^{45,46} In summary, the hydrophobic attraction between the

Figure 2. In situ ellipsometric measurements of d (nm) as a function of time for PSS films spin-coated on silicon wafers after adding DODAB vesicles in water (A), 0.1 mM NaCl (B), or 50 mM NaCl (C).

PSS film and the defective bilayer represented a powerful interaction which determined a stable deposition of a DODAB bilayer onto the flat polymer film.

Figure 4 shows the effect of salt on the surface tension of a 0.2 mM DODAB dispersion in water. There was a rapid decrease of surface tension induced by salt that did not occur in pure water. The maximal decrease of surface tension occurred at 50 mM NaCl, in good agreement with data from in situ ellipsometry that suggested a major role for the hydrophobic attraction at 50 mM NaCl to induce vesicle fusion with the polymer–water interface. Salt-induced hydrophobic defects on the bilayer vesicle led to vesicle fusion with the air–water interface and the observed decrease in the surface tension. Consistently, intervesicle fusion was extensive at 50 mM NaCl,^{45,46} whereas only sparse vesicle adhesion on the PSS film without vesicle fusion was suggested by ellipsometry in situ (Figure 2C).

Figure 5 shows advance and receding contact angles as a function of DODAB concentration for a wafer spin-coated with a PSS film. In air, the PSS film surface is less hydrophobic than the DODAB-coated substrate over a range of DODAB concentrations. This agrees with our previous hypothesis for explaining the ex situ ellipsometric data from Figure 1.

In air, the layer of adhered DODAB vesicles on the polymeric film would become disrupted generating exposure of hydrocarbon regions of the bilayer to the air and low wettability.

Figure 3. In situ ellipsometric measurements of d (nm) as a function of square rooted time for PSS films spin coated on silicon wafers after adding DODAB vesicles in water (A), 0.1 mM NaCl (B), or 50 mM NaCl (C). Solid lines indicate the approximate initial slopes, from which the diffusion coefficients D , in $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ are estimated.

Unfortunately, wettability determinations cannot discriminate bilayer deposition under water from mere vesicle adhesion, since under air, both situations would yield low wettability. At least, wettability data confirm the significant changes on the polymeric surface due to DODAB adsorption.

Figure 6 summarizes a general picture that explains bilayer deposition onto hydrophobic surfaces. Vesicle fusion due to hydrophobic defects in the bilayer can take place at any hydrophobic interface or region. There are three examples: intervesicle fusion, vesicle fusion to the hydrophobic polymer film, and vesicle fusion with the hydrophobic air–water interface. In pure water, there is a fundamental difference between the air–water interface and the polymeric surface: the PSS surface is charged and the cationic vesicles are electrostatically driven to it whereas there is no driving force to direct the nondefective vesicle to the air–water interface. Depending on the magnitude of the electrostatic attraction, bilayer deposition or simple vesicle adhesion may take place. For a small attractive electrostatic attraction it is probable the occurrence of simple vesicle adhesion, as it seems to be the case in Figure 2A where a thin adsorbed DODAB layer of only 1.7 nm mean thickness occurred at limiting adsorption. Indeed, the hydrophobic attrac-

Figure 4. Surface tension at the air–water interface as a function of time after adding 0.2 mM DODAB vesicles prepared in pure water to NaCl solutions at final concentrations equal to 0 (■), 7 (●), 25 (▲), or 50 mM NaCl (▼).

Figure 5. The effect of 0.2 mM DODAB on wettability of polystyrene sulfate films from contact angle determination using the sessile drop method. Before determining contact angles, the DODAB/PSS coated -wafers were gently rinsed three times in pure water and dried under vacuum for 0.5 h.

tion appeared as a powerful interaction force in order to produce a stable DODAB bilayer coating at the hydrophobic polymer surface.

The spreading of phospholipid bilayer membranes and the conditions for the formation of continuous bilayers on rough (glass) or smooth (mica) hydrophilic surfaces was previously shown to result in separated lipid patches with intermediate uncovered spots and continuous substrate-supported bilayers, respectively.⁵⁴ For charged and hydrophobic flat surfaces, which are also rough, e.g., our PSS film, spreading of a continuous bilayer might be facilitated either by a large surface charge density on the polymer and/or on the bilayer vesicle generating a large electrostatic attraction or by a large hydrophobic attraction between defective regions in the bilayer vesicle and the PSS surface complemented by lateral hydrophobic interactions between adjacent vesicles.

Figure 6. The hydrophobic defects hypothesis. Due to NaCl on the outside of DODAB vesicles, hydrophobic defects would appear in the DODAB bilayer causing fusion events, such as (1) intervesicular fusion, (2) vesicle fusion with the air–water interface, and (3) fusion with the polymer film surface.

Conclusions

Self-assembly of a bilayer-forming cationic lipid at oppositely charged polymeric films led to different assemblies depending on concentration of NaCl added to the vesicles. Salt concentrations previously shown to induce intervesicle fusion favored also vesicle fusion to the air–water and to the flat polymer–water interface. However, in absence of salt (pure water), electrostatics was not enough to produce bilayer-assembly of DODAB on the PSS films. This situation contrasted singularly with the one previously described for charged vesicles and oppositely charged polystyrene microspheres, bilayer deposition taking place in pure water: adsorption being driven by ion-pairing between charged polar heads of the lipid and oppositely charged functional groups on the microspheres.^{29–31,52} For more hydrophilic spherical supports, such as silica, DODAB from vesicles was also reported to produce bilayer-covered particles both in pure water and at 10 mM ionic strength.^{22,24,25} The same occurred for flat mica sheets, which bear a large negative charge density.¹³ It is possible that our PSS film spin-coated on the wafer did not present a charge density large enough to induce flattening and deposition of the cationic bilayer. Also, the surface charge density on the DODAB bilayer vesicle is not very large⁵³ and the adsorption was shown to be controlled by vesicle diffusion, another clear indication that the electrostatic attraction between PSS film and DODAB vesicle was not accelerating adsorption in pure water or at very low salt (0.1 mM NaCl). On the other hand, inducing hydrophobic defects on the vesicle bilayer upon 50 mM NaCl addition, definitely accelerated DODAB adsorption to rates above those controlled by vesicle diffusion (Figure 2C). Another advantage became apparent from the vesicle deposition induced by hydrophobic defects: adjacent vesicles adhered at the polymer surface are prone to fuse with each other because they still bear hydrophobic defects after attachment to the surface. The in situ kinetics for DODAB adsorption upon addition of 50 mM NaCl onto the PSS film clearly demonstrated the efficiency of the “hydrophobic defects” method to produce a flat and stable bilayer coverage on the polymer surface.

Acknowledgment. FAPESP and CNPq are gratefully acknowledged.

References and Notes

- (1) Wagner, M. L.; Tamm, L. K. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 266–275.
- (2) Shao, Z. F.; Yang, J. *Q. Rev. Biophys.* **1995**, *28*, 195–251.
- (3) Salafsky, J.; Groves, J. T.; Boxer, S. G. *Biochemistry* **1996**, *35*, 14773–14781.
- (4) Sicchierolli, S. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16771–16775.
- (5) Steinem, C.; Janshoff, A.; Ulrich, W. P.; Sieber, M.; Galla, H. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1279*, 169–180.
- (6) Glazier, S. A.; Vanderah, D. J.; Plant, A. L.; Bayley, H.; Valincius, G.; Kasianowicz, J. J. *Langmuir* **2000**, *16*, 10428–10435.
- (7) Carmona-Ribeiro, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 241–247.
- (8) Puu, G.; Artursson, E.; Gustafson, I.; Lundstrom, M.; Jass, J. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 31–41.
- (9) Carmona-Ribeiro, A. M. In *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*; Nalwa, H. S., Ed.; Academic Press: San Diego, 2001; Vol. 5, Chapter 4.
- (10) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. *Biophys. J.* **1985**, *47*, 105–113.
- (11) Horn, R. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *778*, 224–228.
- (12) Marra, J.; Israelachvili, J. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4608–4618.
- (13) Pashley, R. M.; McGuigan, P. M.; Ninham, B. W.; Brady, J.; Evans, D. F. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 1637–1642.
- (14) Sackmann, E. *Science* **1996**, *271*, 43–48.
- (15) Moya, S.; Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Auch, M.; Baumler, H.; Lichtenfeld, H.; Mohwald, H. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4538–4544.
- (16) Petri, D. F. S.; Carneiro, B. J.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, *221* (U432-U432, Part 2, Apr 1).
- (17) Seitz, M.; Park, C. K.; Wong, J. Y.; Israelachvili, J. N. *Langmuir* **2001**, *17*, 4616–4626.
- (18) Wong, J. Y.; Majewski, J.; Seitz, M.; Park, C. K.; Israelachvili, J. N.; Smith, G. S. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1445–1457.
- (19) Martins, L. M. S.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **1997**, *13*, 5583–5587.
- (20) Campanha, M. T. N.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8230.
- (21) Carmona-Ribeiro, A. M.; Ortis, F.; Schumacher, R. I.; Armelin, M. C. S. *Langmuir* **1997**, *13*, 2215–2218.
- (22) Esumi, K.; Sugimura, A.; Yamada, T.; Meguro, K. *Colloids Surf.* **1992**, *62*, 249–254.
- (23) Bayerl, T. M.; Bloom, M. *Biophys. J.* **1990**, *58*, 357–362.
- (24) Rapuano R.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 104–111.
- (25) Rapuano R.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *226*, 299–307.
- (26) Scott, M. J.; Jones, M. N. *Colloid Surf. A* **2001**, *182*, 247–256.
- (27) Jackson, S.; Reboiras, M. D.; Lyle, I. G.; Jones, M. N. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *85*, 291–301.
- (28) Bennett, T. C.; Creeth, J. E.; Jones, M. N. *J. Liposome Res.* **2000**, *10*, 303–320.
- (29) Carmona-Ribeiro, A. M.; Midmore, B. R. *Langmuir* **1992**, *8*, 801–806.
- (30) Tsuruta, L. R.; Lessa, M. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *175*, 470–475.
- (31) Carmona-Ribeiro, A. M.; Lessa, M. D. *Colloid Surf. A* **1999**, *153*, 355–361.
- (32) Mou, J.; Yang, J.; Shao, Z. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4439–4443.
- (33) Mou, J.; Yang, J.; Huang, C.; Shao, Z. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9981–9985.
- (34) Brian, A. A.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 6159–6163.
- (35) Pearce, K. H.; Hiskey, R. G.; Thompson, N. L. *Biochemistry* **1992**, *31*, 5983–5995.
- (36) G. Roberts, *Langmuir–Blodgett Films*; Plenum Press: New York, 1990.
- (37) Tamm, L. K. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1450–1457.
- (38) Yang, J.; Tamm, L. K.; Somlyo, A. P.; Shao, Z. *J. Microsc.* **1993**, *171*, 183–198.
- (39) Carmona-Ribeiro, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 209–214.
- (40) Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M. *Ellipsometry and Polarized Light*, 1987, North-Holland, Amsterdam.
- (41) Tiberg, F.; Landgren, M. *Langmuir* **1993**, *9*, 927–932.
- (42) Tiberg, F.; Jonsson, B.; Lindman, B. *Langmuir* **1994**, *10*, 3714–3722.
- (43) Tiberg, F.; Jonsson, B.; Tang, J.; Lindman, B. *Langmuir* **1994**, *10*, 2294–2300.
- (44) Fujimoto, J.; Petri, D. F. S. *Langmuir* **2001**, *17*, 56–60.
- (45) Carmona-Ribeiro, A. M.; Chaimovich, H. *Biophys. J.* **1986**, *50*, 621–628.
- (46) Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11843–11846.
- (47) Schales, O.; Schales, S. S. *J. Biol. Chem.* **1941**, *140*, 879–884.
- (48) Motschmann, H.; Stamm, M.; Toprakcioglu, C. *Macromolecules* **1991**, *24*, 3681–3688.
- (49) Siqueira, D. F.; Reiter, J.; Breiner, U.; Stadler, R.; Stamm, M. *Langmuir* **1996**, *12*, 972–979.

- (50) Adamson, A. *Physical Chemistry of Surfaces*; John Wiley & Sons: New York, 1982.
- (51) Salay, L. C.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4011–4015.
- (52) Tsuruta, L. R.; Lessa, M. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **1995**, *11*, 2938–2943.

- (53) Nascimento, D. B.; Rapuano, R.; Lessa, M. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **1998**, *14*, 7387–7391.
- (54) Radler, J.; Strey, H.; Sackmann, E. *Langmuir* **1995**, *11*, 4539–4548.
- (55) Lessa, M. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *182*, 166–171.

Wettability and adhesion of bilayer-forming lipids onto polymeric films

D.F.S. PETRI, E.M.A. PEREIRA and A.M. CARMONA-RIBEIRO*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo SP, Brazil

Abstract—The interaction between lipid bilayer vesicles and polymeric surfaces is evaluated from contact angles and ellipsometric determinations of thickness for deposited molecular films in air. Polymeric films of polystyrene sulfate (PPS) or amidine (PSA) latices on silicon wafers were prepared by spin-coating from toluene solution and drying under vacuum. Small unilamellar vesicles composed of phosphatidylcholine (PC), dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) or sodium dihexadecylphosphate (DHP) over a range of concentrations (0–1.2 mM) interacted in pure water in approximately 16 hours with the polymeric films. After rinsing and drying, the lipidic films on polymer coated-silicon wafers had thickness values in air equivalent to one monolayer of each lipid (ca. 2.2–2.5 nm), with the exception of PC films over a certain range of PC concentrations (0–0.5 mM), which were 5.5–6.5 nm thick. In all cases, the molecular lipid films in air yielded hydrophobic coverage with advancing contact angles equal to 75, 82 and 89° for PC, DODAB and DHP, respectively. The data in air fairly agreed with previously and presently reported adsorption isotherms for these lipids onto latex particles in pure water.

Keywords: Latex; polystyrene sulfate or amidine; polymeric films; bilayer vesicles; phosphatidylcholine; bilayer-forming synthetic amphiphiles; ellipsometry; molecular assembly; polymeric surfaces.

1. INTRODUCTION

The physical and chemical factors, which determine the deposition of bilayer vesicles from aqueous media onto solid surfaces, are still poorly understood. Vesicle deposition onto a solid surface would be determined initially by the classical combination of the repulsive force arising from the interaction of the electrical double layers associated with the vesicle and the solid surface and the attractive dispersion force between the vesicle and the solid. Vesicles are not, however, permanent rigid structures, and depending on their size and chemical composition and that of the aqueous medium they can distort, aggregate, disrupt and fuse with

*To whom all correspondence should be addressed. Phone: 55 11 3818 3810 EXT237,
Fax: 55 11 3815 5579, E-mail: mcricbeir@iq.usp.br

each other. Deposition of vesicles onto a solid surface could give rise to any particular one or a combination of these processes.

Unilamellar phosphatidylcholine (PC) vesicles were reported to break open and adhere to a mica surface to form a bilayer coating, in spite of the indirect evidence obtained from the measured separation between two surfaces when pushed together [1]. Further compression of the closely apposed bilayers can result in fusion into a single bilayer.

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and phosphatidylinositol (PI) adsorb from vesicles onto negatively charged ballottini glass beads as a monolayer with their head groups outermost [2]. Phospholipid monolayers with lipid haptens inserted are supported by hydrophobic glass and are useful for specific adhesion of macrophages and cell surface recognition studies, but cannot serve as hosts for transmembrane proteins [3].

The easiest method for preparing high quality phospholipid bilayers on a flat hydrophilic surface is the direct fusion of small unilamellar vesicles [4, 5], a method devised to make unilamellar membranes on glass coverslips for spectroscopic studies [6, 7]. Phospholipid fusion can be induced at the hydrophilic surface with traces of divalent cations. The other method for preparing supported membranes is the controlled transfer of monolayers to the surface using the Langmuir trough [8]. Content in each monolayer is easily controlled, and the transfer pressure can be at a desirable value [9-13]. Vesicle fusion method is simple and allows a natural lateral pressure in the bilayer.

Charged synthetic vesicles of dioctadecyldimethylammonium chloride (DODAC) or bromide (DODAB) or sodium dihexadecylphosphate (DHP) have found a myriad of new uses [14, 15-31]. They are highly charged in water, in the gel state at room temperature and have a much smoother surface charge distribution than other colloids [15, 16, 32, 33]. Because of these properties, they have been used to test theories for colloids [14, 17-21, 34-36] despite their polydispersity. Homodisperse polystyrene latices, on the other hand, may have hairy, rough or conducting surfaces. In 1992, bilayer-covered polystyrene microspheres were produced [22]. Small and large vesicles prepared from DHP and DODAC or DODAB interact with oppositely charged polystyrene microspheres forming bilayer covered latices [22]. Small unilamellar phospholipid vesicles and polystyrene microspheres also interact in an aqueous solution to form homodisperse and stable phospholipid covered latices [37]. In a first step, the vesicle breaks open and the bilayer attaches to the latex; in a second step the hydrophobic attraction between the phospholipid bilayer and the hydrophobic polystyrene surface induces coverage with one phospholipid monolayer with polar heads outermost. Thereafter, the van der Waals attraction between the phospholipid layer and free vesicles in the dispersion drives the deposition of one or more phospholipid bilayers onto the monolayer covered latex [37]. Also for DPPC and distearoylphosphatidylcholine (DSPC) bilayers, this time adsorbed at the hydrophilic silicon/water interface, single and double bilayers have been prepared with neutron reflectivity measurements allowing precise and non-destructive characterization

of the structure, hydration and roughness of the layers: 2 to 3 nm as the distance between two deposited bilayers, the second one being highly hydrated [38].

In this work, lipidic molecular assemblies at solid polymeric surfaces are investigated from a comparison between lipid adsorption from vesicles onto spherical polymer particles with the lipidic adhesion onto flat polymeric films prepared from the latex particles, which were previously obtained by spin-coating. The strategy consists in ellipsometric measurements of the thickness for dried lipidic films after 15 h interaction of films with vesicles in water at room temperature for 3 different lipids, PC, DODAB and DHP from 0 up to 1.0 mM lipid. Also, contact angles determined from the sessile drop method corroborate the structural interpretation given for each lipid/polymer film pair. In air, PC forms a molecular coating one or two monolayer(s) thick, whereas the charged lipids, DHP and DODAB, always form a coating with one monolayer thickness when they interact with oppositely charged polymeric films. In all cases, lipid deposition generated hydrophobic coatings in air with advancing contact angles larger than 76 degrees. The results for dried lipid coatings on polymer films as measured *in air* are perfectly consistent with previously [22, 37] and presently obtained adsorption isotherms data for analogous systems *in water*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Egg PC (type XIII-E), DODAB and DHP of the highest purity available were purchased from Sigma. PC or DHP concentrations were determined by inorganic phosphorus (PI) analysis [39]. DODAB concentration was determined by microtitration [40]. Charged polystyrene microspheres described as ultraclean by the supplier were obtained from Interfacial Dynamics Corp. (Portland, OR) and used as supplied. These uniform polystyrene microspheres were stabilized either by negative sulfate charges (PSS) or by positive amidine functional groups (PSA). The main characteristics of the microspheres as specified by the supplier are given in Table 1. Mean diameters were obtained by the supplier using an electron microscope. All other reagents were analytical grade and used without further purification. Water was Milli-Q quality.

2.2. Vesicles preparation

PC small unilamellar vesicles (SUV) were prepared by ethanolic injection [41, 42] in water followed by 4 h dialysis against pure water to eliminate ethanol. Mean diameter for PC vesicles thus obtained was 62 nm [37]. DODAB or DHP SUVs were prepared by sonication in water followed by 1 h centrifugation at 15,800 g and 15°C to eliminate titanium ejected from the tip [14]. Mean diameters for DODAB or DHP vesicles thus prepared were 84 and 89 nm, respectively [22].

Table 1.

Properties of the polystyrene sulfate (PSS) and polystyrene amidine (PSA) microspheres in water before being used to prepare the flat polymeric films. PSA particles used to obtain the adsorption isotherm for DHP are indicated by (*)

Latex	Mean diameter (nm)	Particle number density (cm ⁻³)	Area per charge group (nm ²)	Specific surface area (cm ² g ⁻¹)
PSA	193	2.03×10^{13}	3.74	294673
PSS	711	4.55×10^{11}	2.26	79989
PSA*	190	1.1×10^{13}	3.80	300000

2.3. Determination of adsorption isotherm for DHP from DHP SUV onto PSA microspheres

Interaction between DHP SUV and PSA microspheres was induced by adding SUV to the particles and vortexing the mixtures for at least 2 minutes in closed tubes. Final particle number density in each interaction mixture (1 mL) was fixed at 4.4×10^{10} particles/mL and the final DHP concentration ranged from 0.1 to 1.0 mM DHP in each mixture. Mixtures were thermostated at 25°C for 72 h. Thereafter, they were centrifuged at 15,800 g for 1 h at 15°C to separate particles from SUV. The supernatant was used to determine DHP concentration from PI analysis in the supernatant and in the SUV preparation. Three aliquots of the same supernatant sample were submitted for inorganic phosphorus analysis so that each point presented in the isotherms is a mean value and error bars are mean standard deviations. The sensitivity of the PI analysis is 0.01 µM. Adsorption was expressed as the number of DHP molecules adsorbed per square meter polystyrene and plotted against free DHP concentration in the supernatant.

2.4. Preparation of the polymeric films on silicon wafers

Silicon (100) wafers purchased from Crystec (Berlin, Germany) with a native oxide layer approximately 2 nm thick were rinsed [43, 44]. Parts of the silicon wafers were functionalized. The surfaces were covered with drops of trimethylchlorosilane, TMCS, (Fluka, Switzerland) and incubated at 70°C for one hour. After this period, the samples were washed three times in pure toluene and dried under a stream of N₂. The thickness of silane layer varied from 0.5 to 0.9 nm, as measured by ellipsometry.

The aqueous dispersions of PSS or PSA latex particles with mean diameters of 711 and 193 nm, respectively, were dried under vacuum at room temperature until constant weight. Dried PSA or PSS was dissolved in toluene to a concentration of 8 mg/mL. The polymeric solutions were spin-coated (Spinner Headway PWM32-PS-R790, Garland, TX, USA) on the Si wafers at 3000 rpm for 30 s. The mean film thickness varied from 15 to 20 nm, as determined by ellipsometry.

2.5. Determination of PC, DHP or DODAB adsorption onto polymeric films from ex-situ ellipsometry measurements

Several films prepared as above were immersed in the vesicles dispersions in water with lipids in the concentration range of 0.02-1.2 mM for a period of 16 hours in a conditioned room, where the temperature ranged from 22°C to 23°C. After this, the substrates were removed from the solutions, gently washed three times in deionized water and dried under vacuum at room temperature.

Contact angle measurements were performed in a home-built [45] apparatus equipped with a Casio QV-10 digital camera, which is connected to a computer. Sessile water drops of 4 μL and 2 μL were used for the advancing (θ_A) and the receding contact angle (θ_R), respectively. The image digitization helps to determine more accurately the respective angles. The measurements were performed with water drops on the substrates before and after lipid adsorption.

Ellipsometric measurements were performed ex-situ (in air) using a vertical computer-controlled DRE-EL02 Ellipsometer (Ratzeburg, Germany). The angle of incidence was set to 70.0° and the wavelength of the laser was 632.8 nm. For the interpretation of the ellipsometric angles Δ and Ψ a multilayer model was used, assuming refractive indices n for Si of 3.858-0.018 i [46], for SiO_2 of 1.462, for TMCS of 1.383, for polymeric film of 1.565 and for the lipid layer of 1.500. If the adsorbed lipid layer is regarded as a homogeneous film, the thickness can be calculated by iterative calculations with Jones' matrices [43, 48].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Dioctadecyldimethylammonium bromide deposition as a monolayer in air or as a bilayer in water onto polystyrene sulfate surfaces

In air, the thickness d of the adsorbed DODAB layer onto PSS films as a function of the DODAB concentration in water is shown in Fig. 1a. There is no dependence of the layer thickness on the DODAB concentration over the range of concentration tested. The mean DODAB thickness amounts to 2.5 ± 0.5 nm, which corresponds to the expected theoretical thickness of a DODAB monolayer. Therefore a DODAB monolayer remains adhered to the PSS film surface under air.

In water, Figure 2 shows the adsorption isotherm measured for DODAB on PSS particles. The adsorbed amount increases up to an adsorption limit of 33×10^{17} molecules/ m^2 , which is consistent with bilayer deposition on the particle surface [20]. It means that in the aqueous medium the formation of a DODAB bilayer on PSS is favored both for spherical and flat substrates. What is the correlation between DODAB adhesion to flat PSS films in the air and DODAB adsorption onto PSS microspheres in water? In the case of PSS on Si wafers, the DODAB was adsorbed as a bilayer while the wafers were in the liquid. Upon withdrawing from the liquid, the bilayers were destroyed, remaining only as a monolayer attached to the surface due to the strong electrostatic interaction between the negatively charged polymeric film and the cationic polar heads of the lipid layer.

Figure 1. Thickness d for adsorbed DODAB layer on PSS films as a function of DODAB concentration. PSS was spin-coated on (a) Si wafer and (b) silanized (TMCS) Si wafers. The dotted line represents the theoretical thickness value for deposition of DODAB as a single monolayer. On the right side, a scheme for the flat multilayer is given.

The effect of DODAB adsorption on wettability of the PSS film is shown in Table 2. Pure PSS films prepared by spin-coating are hydrophobic and flat, as revealed by the mean advancing angle θ_a of $71^\circ \pm 4^\circ$ and a hysteresis, $\Delta\theta$, of 5° . Upon DODAB adsorption, the surfaces become more hydrophobic with a mean θ_a of $84^\circ \pm 3^\circ$. This effect is due to the orientation of the hydrocarbon chains towards the air. The hysteresis, $\Delta\theta$, increases from 2° to 26° , indicating that the adsorbed DODAB layer is rougher than the polymer film.

In order to induce the orientation of the hydrophobic PS chains towards the substrate, the silanization reaction with TMCS was performed on parts of the Si wafers. This reaction renders Si wafers hydrophobic, but increases the roughness. PSS films spin-coated onto silanized wafers are also hydrophobic, the mean advancing angle θ_a amounts to $79^\circ \pm 6^\circ$. This result shows that the silane layer has no effect on the polymer chains orientation. The increase in the hysteresis, $\Delta\theta$, to 9°

Figure 2. Isotherm for the adsorption of DODAB bilayers from large DODAC unilamellar vesicles (256 nm mean diameter) onto PSS microspheres (285 nm mean diameter) in 0.1 mM NaCl aqueous solution at 25°C as previously published by Carmona-Ribeiro and Midmore in 1992 [22]. The plateau at 33×10^{17} molecules per m^2 polystyrene is in very good agreement with adsorbed amount expected for deposition of one bilayer on the surface. On the right side, a scheme for the bilayer-covered particle is given.

Table 2.

The effect of lipids on the wettability of polymeric films. The films were obtained by spin-coating a 8 mg/mL toluene solution of the polymer on a silicon wafer or on a silanized silicon wafer. Films and lipidic small unilamellar vesicles composed of phosphatidylcholine (PC), dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) or sodium dihexadecylphosphate (DHP) were left in water, overnight (ca. 15 h), at room temperature. Thereafter, the wafers were rinsed three times in pure water, dried under vacuum for 0.5 h and tested for determination of advancing (θ_a) or receding (θ_r) contact angles. PSA is polystyrene amidine, PSS is polystyrene sulfate and TMCS is trimethylchlorosilane

Solid substrate	Lipid type and concentration (mM)	θ_a (°)	θ_r (°)	$\Delta\theta$ (°)
PSA/SiO ₂	0	86±5	84±4	2
lipid/PSA/SiO ₂	PC/0.22 mM	75±3	67±3	8
PSA/TMCS/SiO ₂	0	85±5	76±7	9
lipid/PSA/TMCS/SiO ₂	PC/0.22 mM	76±5	63±5	13
lipid/PSA/TMCS/SiO ₂	PC/0.56 mM	64±1	53±2	11
PSS/SiO ₂	0	71±4	66±4	5
lipid/PSS/SiO ₂	DODAB/0.14 mM	84±3	58±2	26
PSS/TMCS/SiO ₂	0	79±6	70±5	9
lipid/PSS/TMCS/SiO ₂	DODAB/0.97 mM	82±1	65±4	17
PSA/SiO ₂	0	86±5	84±4	2
lipid/PSA/SiO ₂	DHP/0.22 mM	89±3	78±2	11
PSA/TMCS/SiO ₂	0	85±5	76±7	9
lipid/PSA/TMCS/SiO ₂	DHP/0.22 mM	85±8	61±6	24

indicates a low roughness (Table 2). The adhesion of DODAB to PSS has no effect on the surface hydrophobicity. The increase in the mean θ_a value to 82° is not significant because it is within the experimental error. The adsorbed DODAB layer has a mean thickness of 2.5 ± 0.2 nm (Fig. 1b), which coincides with the mean thickness of DODAB adsorbed onto PSS without silane and with the theoretical thickness calculated for a DODAB monolayer.

3.2. Sodium dihexadecylphosphate deposition as a monolayer in air or as a bilayer in water on the polystyrene amidine surfaces

The interaction between DHP and PSA films yields stable films in air with a mean thickness of 2.3 ± 0.7 nm over all range of lipid concentrations tested (Fig. 3a). This value corresponds to the theoretical thickness calculated for a DHP

Figure 3. The thickness d of the adsorbed DHP layer on PSA films under air as a function of DHP concentration for the vesicle/film interaction in water. PSA was spin-coated on (a) Si wafer and (b) silanized (TMCS) Si wafers. The dotted line represents the theoretical thickness value for one DHP monolayer. On the right side, a scheme for the flat multilayer is given.

monolayer. The driving force for the adhesion of negatively charged DHP to the positively charged PSA surfaces is electrostatic in nature. No effect of DHP film on the wettability of PSA could be observed, just a increase of roughness revealed by the change of $\Delta\theta$ from 2° to 11° (Table 2). This means that deposition of a DHP monolayer onto the PSA film in air generated a surface that is as hydrophobic as the polystyrene surface itself. In fact, DHP bilayers in water have a very high gel-to-liquid-crystalline phase transition temperature [14, 18, 19], which is typical of tightly packed bilayers at room temperature capable of yielding a very high hydrophobicity as an adsorbed monolayer in air.

The silane layer has no influence on the adhesion of DHP to PSA. The hydrophobicity remains high both before and after the lipid deposition on the polymeric film. The only observable change is the increase in roughness after the adsorption. The adsorbed DHP film has a mean thickness of 2.0 ± 0.3 nm (Fig. 3b), which is similar to the value in (Fig. 3a.) Here also, no dependence of the film thickness on the concentration was observed. The adhesion of DHP to PSA particles was measured from determination of the adsorption isotherm presented in Fig. 4. Below 0.25 mM DHP in the supernatant, adsorption increases continuously with DHP concentration in the supernatant. Between 0.25 mM and 0.5 mM it seems to reach a plateau with the adsorbed amount corresponding to deposition of a DHP bilayer onto the latex. For concentrations higher than 0.5 mM, the adsorbed amount increases until a second plateau is reached. Carmona-Ribeiro and Midmore [22] showed in a previous work that due to packing restrictions DHP molecules preferred to adsorb on flat surfaces or, at least, on surfaces with large curvature radius. When the substrate is spherical, the deposition of DHP on particles tend to be in several bilayers, so that deposition is facilitated by the larger curva-

Figure 4. Isotherm for the adsorption of DHP from DHP SUV vesicles (95 nm mean diameter) onto PSA microspheres (190 nm) in water at 25°C . The dotted line represents the theoretical amount required for adsorption of one single bilayer. On the right side, a schematic representation of the bilayer-covered particle is given.

ture radius of the outer deposited bilayers. In solution, the multibilayer is stable, but when the substrate is removed from the aqueous medium, the structure is destroyed and under air only a monolayer remains, as depicted from Fig. 4.

3.3. PC deposition as one or two monolayer(s) in air or, as bilayer in water, on the polystyrene amidine surfaces

The adhesion to PC to PSA films is determined from ellipsometric measurements in air. The thickness of the adsorbed PC layer on PSA films as a function of the PC concentration is shown in Fig. 5a. No dependence of the layer thickness on the concentration could be observed. The mean PC thickness amounts to 2.5 ± 0.5 nm, which corresponds to the theoretical thickness of a PC monolayer. The driving force for the adhesion of PC to PSA is the complex formation between the

Figure 5. The thickness d of the adsorbed PC layer on PSA films as a function of the concentration. PSA was spin-coated on (a) Si wafer and (b) silanized (TMCS) Si wafers. In (a) the dotted line represents the theoretical thickness value of a PC monolayer, in (b) the dotted line represents the change from the theoretical thickness value of a PC bilayer to a PC monolayer. On the right side, a schematic representation of the multilayer is given.

phosphatidylcholine and the amidine groups. Thereafter, the hydrophobic interaction between the lipid hydrocarbon chains and the hydrophobic polystyrene surface drives monolayer deposition of the lipid with polar heads outermost and turned towards the water. The van der Waals interaction between the deposited monolayer and free vesicles in dispersion is then responsible for deposition of another bilayer [37].

The effect of the adsorbed PC on the wettability is shown in Table 2. Pure PSA films prepared by spin-coating are hydrophobic and flat, as revealed by the mean advancing angle θ_a of $86^\circ \pm 5^\circ$ and a hysteresis, $\Delta\theta$, of 2° . After interaction with PC, the surfaces turn less hydrophobic with a mean θ_a of $75^\circ \pm 3^\circ$. This effect is due to the orientation of some of phosphatidylcholine groups towards the air. The hysteresis, $\Delta\theta$, increases from 2° to 8° , indicating that adsorbed PC layer is slightly rougher than pure PSA films.

PSA films spin-coated onto silanized wafers are also hydrophobic, the mean advancing angle θ_a amounts to $85^\circ \pm 5^\circ$. This result shows again that the silanization has no effect on the polymer chains orientation. The increase in the hysteresis, $\Delta\theta$, to 9° indicates a low roughness (Table 2). However, the adsorption of PC onto PSA exerts a significant effect on the surface hydrophobicity. At low concentrations (< 0.22 mM) the mean θ_a value decreases by 9° , whereas at higher concentrations (> 0.56 mM) it decreases by 21° . The dependence of wettability on the concentration will be discussed below.

The thickness of the adsorbed PC layer onto PSA substrate as a function of PC concentration is shown in Fig. 5a. The thickness increases with PC concentration until a plateau at 5.5 nm is reached at approximately 0.1 mM. This value corresponds to the theoretical thickness of two monolayers of PC. In this case, most hydrophobic lipid chains tend to be oriented towards the air, yielding a mean θ_a value of $76^\circ \pm 5^\circ$. For concentrations higher than 0.5 mM the mean thickness drops to approximately 3 nm, indicating the presence of a PC monolayer on the substrate. The monolayers might have more phosphatidylcholine (hydrophilic) groups oriented towards the air, causing a decrease in the mean θ_a value to $64^\circ \pm 1^\circ$.

The adsorption of PC onto PSA particles is presented in Fig. 6 [37]. The adsorbed amount increases with the concentration until the surface coverage is complete at 5×10^{-5} M. In aqueous dispersions, the plateau value of the adsorption isotherm corresponds to a coverage of PSA particles with a PC monolayer plus one bilayer. The formation of a bilayer over the monolayer is driven by the van der Waals attraction between the deposited monolayer and free vesicles in the dispersion. These results agree with the first plateau in Fig. 5b. In that case, when the substrate is removed from the aqueous solution to the air, just two monolayers remain on the substrate, while the outer monolayer is removed.

For PC concentrations in the supernatant larger than 0.5 mM, in air, only one monolayer remains adsorbed as shown from the second plateau in Fig. 5b. There seems to be a competition between free vesicles in the dispersion and the ad-

Figure 6. Isotherm for the adsorption of PC lipids from PC SUV (62 nm mean diameter) onto PSA microspheres (76 nm mean diameter) in water at 25°C as previously published by Carmona-Ribeiro and Herrington in 1993 [37]. The plateau is consistent with deposition at maximal adsorption of 3 PC monolayers. On the right side, a schematic representation of the PSA particle covered with the 3 monolayers, i.e. one PC monolayer plus one PC bilayer, is given.

sorbed PC monolayer on the flat polymer surface towards PC adsorption from free vesicles. Van der Waals interaction occurs both as vesicle-vesicle and vesicle-adsorbed layer attractive forces. PC is a neutral lipid that may easily form several closed and concentric bilayers (multibilayered vesicles) from single closed bilayers (vesicles) in aqueous dispersions via the van der Waals attraction. When the single bilayered vesicle concentration in dispersion increases, formation of free multilayered vesicles in dispersion predominates over further lipid deposition onto the flat substrate.

4. CONCLUSIONS

Self-assembly of bilayer-forming neutral or charged lipids at polymeric films in water leads to lipid monolayer deposition in air for 3 different lipids. Ellipsometry ex-situ and wettability measurements (in air) are convenient approaches to investigate the nature of lipid assemblies at polymer surfaces in water. Whenever bilayers deposit on the polymer films in water, upon withdrawing the system from the aqueous medium at least one lipid monolayer remains attached to the surface. High values for advancing contact angles (sessile droplet method) are consistent with an orientation of the lipids hydrocarbon chains towards the air.

The electrostatic interaction between charged vesicles and oppositely charged polymer surfaces governs the adhesion. Adsorption is driven by ion-pairing between charged polar heads of the lipid and oppositely charged groups on the polymer surface.

Neutral vesicles interacted with polymer-coated wafers in a different way. In air, a thickness of (5.5 ± 0.5) nm, i.e. two monolayers was obtained, up to a PC concentration of 0.45 mM. For more concentrated dispersions, the thickness decreased to half and the wettability increased. After complexation between amidine groups and phosphatidyl moieties, the hydrophobic interaction between hydrocarbon chains of the lipid and the polymeric surface destroyed the attached bilayer structure resulting in deposition of a single monolayer with polar heads outermost. In water, further deposition of a bilayer over this first monolayer is driven by the van der Waals attraction between the deposited monolayer and free vesicles in the dispersion. When the substrate was withdrawn from the aqueous solution to the air, just two monolayers remained adhered to the polymer film while the outer monolayer was removed.

Acknowledgments

FAPESP and CNPq are gratefully acknowledged. The authors thank J. Fujimoto for her technical assistance in preparing the polymeric films.

REFERENCES

1. R. G. Horn, *Biochim. Biophys. Acta* **778**, 224-228 (1984).
2. S. Jackson, M. D. Reboiras, I. G. Lyle and M. N. Jones, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **85**, 291-301 (1986).
3. L.-C. Lin, R. M. Weis and H. M. McConnell, *Nature* **296**, 164-165 (1982).
4. J. Mou, J. Yang and Z. Shao, *Biochemistry* **33**, 4439-4443 (1994).
5. J. Mou, J. Yang, C. Huang and Z. Shao, *Biochemistry* **33**, 9981-9985 (1994).
6. A. A. Brian and H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6159-6163 (1984).
7. K. H. Pearce, R. G. Hiskey and N. L. Thompson, *Biochemistry* **31**, 5983-5995 (1992).
8. G. Roberts, *Langmuir-Blodgett Films*, Plenum Press, New York (1990).
9. L. K. Tamm and H. M. McConnell, *Biophys. J.* **47**, 105-113 (1985).
10. L. K. Tamm, *Biochemistry* **27**, 1450-1457 (1988).
11. J. Yang, L. K. Tamm, A. P. Somlyo and Z. Shao, *J. Microscopy* **171**, 183-198 (1993).
12. J. A. N. Zasadzinski, C. A. Helm, M. L. Longo, A. L. Weisenhom, S. A. C. Gould and P. K. Hansma, *Biophys. J.* **59**, 755-760 (1991).
13. P. M. Claesson, A. M. Carmona-Ribeiro and K. Kurihara, *J. Phys. Chem.* **93**, 917-922 (1989).
14. A. M. Carmona-Ribeiro, *Chem. Soc. Reviews* **21**, 209-214 (1992).
15. A. M. Carmona-Ribeiro and H. Chaimovich, *Biochim. Biophys. Acta* **733**, 172-179 (1983).
16. A. M. Carmona-Ribeiro, L. S. Yoshida, A. Sesso and H. Chaimovich, *J. Colloid Interface Sci.* **100**, 433-443 (1984).
17. A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **139**, 343-350 (1990).
18. A. M. Carmona-Ribeiro and S. Hix, *J. Phys. Chem.* **95**, 1812-1817 (1991).
19. A. M. Carmona-Ribeiro, C. E. Castuma, A. Sesso and S. Schreier, *J. Phys. Chem.* **95**, 5361-5366 (1991).
20. A. M. Carmona-Ribeiro and B. R. Midmore, *J. Phys. Chem.* **96**, 3542-3547 (1992).
21. A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem.* **97**, 4247-4247 (1993).
22. A. M. Carmona-Ribeiro and B. R. Midmore, *Langmuir* **8**, 801-806 (1992).
23. L. R. Tsuruta, M. M. Lessa and A. M. Carmona-Ribeiro, *Langmuir* **11**, 2938-2943 (1995).
24. L. R. Tsuruta, M. M. Lessa and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **175**, 470-475 (1995).

25. L. R. Tsuruta and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem.* **100**, 7130-7134 (1996).
26. M. M. Lessa and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **182**, 166-171 (1996).
27. R. Rapuano and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **193**, 104-111 (1997).
28. L.C. Salay and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem. B* **102**, 4011-4015 (1998).
29. D. B. Nascimento, R. Rapuano, M. M. Lessa and A. M. Carmona-Ribeiro, *Langmuir* **14**, 7387-7391 (1998).
30. L. C. Salay and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Adhesion Sci. Technol.* **13**, 1165-1179 (1999).
31. R. Rapuano and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **226**, 299-307 (2000).
32. A. M. Carmona-Ribeiro, L. S. Yoshida and H. Chaimovich, *J. Phys. Chem.* **89**, 2928-2933 (1985).
33. A. M. Carmona-Ribeiro and H. Chaimovich, *Biophys. J.* **50**, 621-628 (1986).
34. A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem.* **93**, 2630-2634 (1989).
35. A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem.* **96**, 9555-9557 (1992).
36. A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem.* **97**, 11843-11846 (1993).
37. A. M. Carmona-Ribeiro and T. M. Herrington, *J. Colloid Interface Sci.* **156**, 19-23 (1993).
38. T. Charitat, E. Bellet-Amalric, G. Fragneto and F. Graner, *Eur. Phys. J. B* **8**, 583-593 (1999).
39. O. Schales and S. S. Schales, *J. Biol. Chem.* **140**, 879-884 (1941).
40. G. Houser, S. Fleischer and A. Yamamoto, *Lipids* **5**, 494-496 (1970).
41. S. Batzri and E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 1015-1019 (1973).
42. J. M. H. Kremer, M. W. J. v. d. Esker, C. Pathmamanoharan and P. H. Wiersema, *Biochemistry* **16**, 3932-3935 (1977).
43. D. F. Siqueira-Petri, G. Wenz, P. Schunk and T. Schimmel, *Langmuir* **15**, 4520-4523 (1999).
44. H. Motschmann, M. Stamm and C. Toprakcioglu, *Macromolecules* **24**, 3681-3688 (1991).
45. A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York (1982).
46. P. Edward (Ed.), *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, London (1985).
47. R. M. A. Azzam and N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland, Amsterdam (1987).

CURRICULUM VITAE

NOME: Edla Moraes de Abreu Pereira

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: Fortaleza-CE, 19/09/1949

EDUCAÇÃO

Colégio Baptista Santos Dumont, Fortaleza, 1971.

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1975.
Bacharel em Física

Universidade de S. Paulo, Instituto de Física da USP, 1980.
Mestrado em Física Nuclear Experimental

OCUPAÇÃO

Professora Adjunta, Universidade S. Judas Tadeu, 1991 até o presente.

PUBLICAÇÕES

Estrutura do núcleo ^{131}Te – Ciência e Cultura 29, 1977.

Espalhamento inelástico de prótons por ^{144}Sm sobre ressonâncias Isobáricas – Ciência e Cultura 30, 1978.

PEREIRA, E. M. A, PETRI, D.F.S. & CARMONA-RIBEIRO, A. M. (2002) Assemblies of cationic lipids on polymeric films, Mol. Cryst. Liq. Cryst. 374, 617 -622.

PETRI, D. F. S., PEREIRA, E. M. A. & CARMONA-RIBEIRO, A. M. (2002) Wettability and Adhesion of Bilayer-forming Lipids onto Polymeric Films, pp. 535 -548, In Contact Angle, Wettability and Adhesion, Vol. 2, edited by K. L. Mittal, VSP B.V., International Science Publishers, Zeist, The Netherlands, ISBN 90-6764-370-X.

PEREIRA, E. M. A., PETRI, D. F. S. & CARMONA-RIBEIRO, A. M. (2002) Synthetic Vesicles at Hydrophobic Interfaces, J. Phys. Chem. B 106, 8762 -8767.