

JÚLIO CÉZAR BARBOSA ROCHA

**ESTRUTURA E TERMODINÂMICA DE FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS
DE POLÍMERO DE β -CICLODEXTRINA COM SURFACTANTES
IÔNICOS E EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO POLÍMERO COM CADEIAS
DE DNA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Viçosa

T

R672e
2016

Rocha, Júlio César Barbosa, 1987-
Estrutura e termodinâmica de formação dos complexos de
polímero de β -ciclodextrina com surfactantes iônicos e efeito da
associação do polímero com cadeias de DNA / Júlio César Barbosa
Rocha. - Viçosa, MG, 2016.
xiv, 100f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Alvaro Vianna Novaes de C. Teixeira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.95-100.

1. Físico-química. 2. Agentes ativos de superfícies. 3.
Ciclodextrina. 4. DNA. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Física. Programa de Pós-graduação em Física. II.
Título.

CDD 22. ed. 541

JÚLIO CÉZAR BARBOSA ROCHA

**ESTRUTURA E TERMODINÂMICA DE FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS
DE POLÍMERO DE β -CICLODEXTRINA COM SURFACTANTES
IÔNICOS E EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO POLÍMERO COM CADEIAS
DE DNA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016.



Sergio Antonio Fernandes



Márcio Santos Rocha



Frederico Barros de Sousa



Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)



Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira
(Orientador)

Dedico aos meus pais
Francisco de Assis Rocha e Jovelina Barbosa Rocha

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Jovelina e Francisco por sempre acreditarem em mim e pelo incentivo na realização deste sonho.

Em especial ao meu orientador, Alvaro Vianna, que já me acompanha desde a graduação e tornou possível a realização deste sonho. Agradeço pelos quase 10 anos de boa convivência e grandes ensinamentos, sempre incentivando e aberto às discussões. Valeu, Alvaro!

Ao meu coorientador, Luis Henrique Mendes da Silva, que auxiliou e enriqueceu as discussões científicas e sempre abriu as portas do seu laboratório. Muito obrigado Luis.

Ao prof. Márcio Santos que possibilitou ainda mais o enriquecimento deste trabalho, tornando possível a realização dos estudos com DNA.

Ao prof. Frederico Barros que sintetizou e gentilmente cedeu o polímero necessário para a realização desta pesquisa.

Ao prof. Luis Antonio Minim do departamento de Engenharia de Alimentos da UFV que possibilitou a realização das medidas de potencial zeta em seu laboratório.

Aos professores do departamento de física da UFV que contribuíram com a minha formação acadêmica.

Aos colegas do grupo QUIVECOM, em especial ao Guilherme Max que realizou os experimentos de calorimetria, além de me ajudar nas discussões científicas deste trabalho. Valeu Guilherme.

Aos meus colegas do Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos. À galera da física biológica que me auxiliou no uso da pinça ótica em especial ao Eduardo.

A minha namorada, Edna Mayer, que durante todos esses anos foi muito compreensiva e carinhosa, sempre me apoiando nos momentos difíceis. Ao meu irmão Arley Nathan pela boa convivência.

Aos meus amigos da república1511, Vicente, Fabrício, Breno, Ulisses, Gelton, Shales com quem convivi todos esses anos. Valeu galera! Foi muito bom morar com vocês.

Aos meus amigos da pós-graduação, Fabiano, André, Polônio, Anderson, Saymon, Carlos entre muitos outros que possibilitaram muitos momentos de alegria e descontração.

Aos meus amigos do IFNMG – campus Almenara pelos momentos de diversão.

Aos membros da banca que prontamente aceitaram o convite e que enriqueceram ainda mais este trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro. À CNPQ, CAPES e FAPEMIG pelo financiamento de projetos para compra de equipamentos em nosso laboratório. À Universidade Federal de Viçosa que forneceu toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal do Norte de Minas – Campus Almenara pela concessão do afastamento e ao programa de bolsas para qualificação de servidores do IFNMG pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que a realização deste sonho fosse possível. Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
Capítulo 1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Introdução Geral.....	1
1.2 Revisão da Química de Ciclodextrinas e surfactantes	3
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivos Gerais.....	10
1.3.1 Objetivos Específicos.....	10
Capítulo 2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	12
2.1 Reagentes.....	12
2.2 Preparação de Amostras e Descrição dos Equipamentos	12
2.3 Técnicas de Caracterização.....	15
2.3.1 Espalhamento de Luz	15
2.3.2 Microcalorimetria Isotérmica de Titulação (μ -ITC).....	20
2.3.3 Potencial Zeta.....	22
2.3.4 Condutivimetria	24
2.3.5 Fluorescência do Pireno.....	25
2.3.5 Dispersão de Taylor.....	27
Capítulo 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.1 Caracterização da p β CD	28
3.2 Formação dos Complexos p β CD – surfactantes	30
3.3 – Efeito dos surfactantes na estrutura da p β CD	34
3.4 Termodinâmica de Formação dos Complexos.....	44
3.5 Efeito de Força Iônica.....	52
3.6 Mecanismo de Interação p β CD – surfactantes.....	61
3.6.1 Formação de micelas ao longo da Cadeia polimérica.....	61
3.6.2 Mecanismo de Interação p β CD – surfactantes.....	64
3.7 Conclusões e Perspectivas do Capítulo 3.....	67
Capítulo 4 INTERAÇÃO DNA – P β CD	71
4.1 Breve Histórico.....	71
4.2 Técnica de Caracterização.....	72
4.2.1 Preparação de Amostras.....	72

4.2.2 Fundamentos da Técnica	73
4.3 Físico-química de Interação DNA - p β CD	78
4.4 Conclusões e Perspectivas do capítulo 4	84
Capítulo 5 CONCLUSÕES GERAIS.....	85
APÊNDICE A.....	87
Fluorescência do Pireno.....	87
APÊNDICE B.....	91
Cálculo da Energia Eletrostática.....	91
REFERÊNCIAS.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1: Estrutura tridimensional das ciclodextrinas em que n representa o número de unidades de D-glicose. n = 6, 7 ou 8 referem-se α , β ou γ ciclodextrina respectivamente. Figura extraída da referência [19].	3
Figura 1-2: Estrutura tridimensional das ciclodextrinas e suas dimensões.	5
Figura 1-3 Ilustração da síntese do poli- β -ciclodextrina (p β CD) linear com a adição de tolueno (a) e p β CD reticulada sem a adição de tolueno (b). Figura extraída da referência [27].	7
Figura 1-4: Fórmula estrutural dos surfactantes estudados neste trabalho.	9
Figura 2-1 Modelo de sigmoide decrescente usado nos ajustes da razão dos picos 1:3 do espectro de fluorescência do pireno. cmc_1 é o ponto de inflexão da curva (x_0) e cmc_2 é o ponto de interseção das retas $y_3 = f(x)$ e $y_2 = A_2$. Figura adaptada da referência [41].	26
Figura 3-1 Gráfico de Zimm para a p β CD. A massa molar foi determinada extrapolando as curvas para $\theta \rightarrow 0$ (○) e $c \rightarrow 0$ (■) e ajustando as equações 2.6 e 2.7 respectivamente.	29
Figura 3-2: Curva de condutividades em diferentes concentrações dos surfactantes. SDS em água (▲), SDS em 0,5% m/V de p β CD (▲), DTAB em água (○), DTAB em 0,5% m/V de p β CD (●), SDBS em água (◇) e SDBS em 0,5% m/V de p β CD (◆). As linhas contínua e pontilhada são o resultado do ajuste da equação 2.23.	31
Figura 3-3: Ilustração das etapas de formação dos complexos de p β CD – DTAB, um comportamento semelhante é observado para os outros dois surfactantes.	32
Figura 3-4: Curvas de auto correlação temporal do campo elétrico espalhado ao quadrado para os complexos p β CD – surfactante em função da concentração de surfactante.	35
Figura 3-5: Curva de distribuição de tamanho para o complexo p β CD – SDS. Duas populações de partículas são observadas: uma em torno de 1 nm e outra em torno de 5 nm em todas as concentrações de SDS.	36
Figura 3-6: Raio hidrodinâmico das estruturas de p β CD – β CD em diferentes concentrações dos surfactantes: (●) DTAB, (◆) SDBS e (▲) SDS. Os símbolos vazados referem-se ao raio da ciclodextrinas livres e as setas representam a Δcmc obtidas da tabela 3.2.	37
Figura 3-7: Etapas no processo de formação dos complexos p β CD – DTAB. (a) sem adição do surfactante, (b) concentração do surfactante equivalente ao ponto de mínimo na curva de raio da Figura 3-6, (c) concentração do surfactante entre o ponto de mínimo e a c_{est} e (d) após c_{est} .	40
Figura 3-8: Intensidade espalhada pelos complexos de p β CD (símbolos preenchidos) e de ciclodextrinas livres (símbolos vazados) versus concentração de surfactante: (●, ○) DTAB, (◆, ◇) SDBS e (▲, △) SDS. As linhas contínuas são guias.	41
Figura 3-9: Curvas de dispersão de Taylor das soluções: 0,5% m/V de p β CD (○), 0,25% m/V de β CD + 2,5 mM de SDS (○), 0,5% m/V de p β CD + 2,5 mM de SDS (○).	42
Figura 3-10: Curva de potencial zeta para os complexos de p β CD – surfactante: (●) DTAB, (◆) SDBS e (▲) SDS.	43
Figura 3-11: Curvas calorimétricas para a titulação dos surfactantes em água (símbolos vazados) e em solução 0,5% m/V de p β CD (símbolos preenchidos). As	

setas duplas nos gráficos do DTAB e SDS correspondem às diferenças de concentração Δc_{cmc} apresentadas na Tabela 3.3.....	45
Figura 3-12: Entalpia aparente de interação para a titulação dos surfactantes SDBS (\diamond), DTAB (\circ), SDS (\triangle) em soluções de β CD com diferentes concentrações (à esquerda) e SDBS (\blacklozenge), DTAB (\bullet), SDS (\blacktriangle) em solução 0,5% m/V de p β CD (à direita). No detalhe: a entalpia aparente de interação para o DTAB. Os valores de concentração dos surfactantes foram normalizados pela concentração total de ciclodextrina. As curvas contínuas mostram os ajustes para o modelo de sítios únicos independentes.	47
Figura 3-13: Gráfico de compensação entálpico-entrópica para a formação dos complexos da β CD com os três surfactantes (símbolos vazados) e a complexação dos surfactantes com a p β CD (símbolos preenchidos). As linhas (contínua e tracejada) mostram o comportamento esperado para ΔG° constante.	50
Figura 3-14: Condutividade específica com a adição de 5 mM de KCl. SDS em água (\triangle) e SDS em 0,5% m/V de p β CD (\blacktriangle). DTAB em água (\circ), DTAB em 0,5% m/V de p β CD (\bullet), SDBS em água (\diamond) e SDBS em 0,5% m/V de p β CD (\blacklozenge). As linhas contínuas e tracejadas referem-se ao ajuste da equação 2.23 aos dados experimentais.....	52
Figura 3-15 cmc dos surfactantes em água ou solução 0,5% m/V de p β CD com 0 ou 5 mM de KCl. As barras preenchidas referem-se à cmc em 0 mM e as barras vazadas em 5 mM de KCl.....	54
Figura 3-16 Raio hidrodinâmico dos complexos p β CD – surfactantes em diferentes concentrações dos surfactantes sem KCl (símbolos preenchidos), com a adição de 5 mM KCl (símbolos vazados) e para o DTAB com 15 mM de KCl (\oplus).....	56
Figura 3-17: Intensidade espalhada pelos complexos de p β CD – DTAB (linhas tracejadas) e pelos complexos β CD – DTAB (linhas contínuas) em diferentes concentrações de DTAB, mantendo fixa a concentração de KCl para cada curva. As concentrações de KCl foram: 0 mM KCl (\bullet), 5 mM de KCl (\circ) e 15 mM de KCl (\oplus).	58
Figura 3-18: Entalpia aparente de interação dos complexos p β CD – surfactantes com: 0 mM KCl (símbolos preenchidos), 5 mM KCl (símbolos vazados) e 15 mM KCl (\oplus), a concentração inicial da p β CD foi 0,5% m/V.....	59
Figura 3-19: Mecanismos de associação entre PEO e SDS em diferentes concentrações do surfactante. Figura extraída da referência [58].....	61
Figura 3-20: Raio hidrodinâmico dos complexos PEO – SDS e entalpia de formação destes complexos em diferentes concentrações de SDS. Foi usada solução de 0,1% m/m de PEO 300.000 Da no experimento. Figura extraída da referência [58].	62
Figura 3-21: Estrutura dos complexos p β CD – DTAC. À esquerda: os surfactantes são distribuídos na periferia da p β CD em concentrações inferiores a concentração crítica de surfactante (C_1). À direita: os surfactantes são distribuídos de forma homogênea ao longo da p β CD para concentrações superiores a C_1 . Figura extraída da referência [15].	64
Figura 3-22: Mecanismo de formação dos complexos p β CD – DTAB, da esquerda para a direita a concentração do surfactante aumenta. (a) Complexo p β CD – β CD sem a adição do surfactante, (b) Complexo p β CD – DTAB e expulsão das ciclodextrinas não ligadas, (c) Aumento do raio da p β CD, (d) saturação da cadeia de p β CD e formação de micelas.	66
Figura 3-23: Mecanismo de formação dos complexos p β CD – DTAB com 15 mM de KCl, da esquerda para a direita a concentração do surfactante aumenta. (a) Complexo	

p β CD – β CD sem a adição do surfactante, (b) Complexo p β CD – DTAB após a saturação do polímero.....	66
Figura 4-1: Representao esquemática do pinçamento tico. A microesfera, presa no poço de potencial do laser, é ligada a molécula de DNA que por sua vez está ligada ao porta-amostra. O piezoelétrico desloca o porta-amostra para a esquerda estirando a molécula de DNA. Figura extraída da referência [65].	74
Figura 4-2: Curva de força para o estiramento de uma única molécula de DNA. Obtenção do comprimento de contorno e persistência com: $A = 46 \pm 2$ nm e $L = 15,5 \pm 0,1$ μ m, respectivamente, obtidos pelo ajuste da equao 4.1.....	76
Figura 4-3: Comprimento de contorno do complexo DNA – p β CD em diferentes concentrações da p β CD.	78
Figura 4-4: Comprimento de persistência (A) do complexo p β CD – DNA em função da concentração de p β CD. Um comportamento não monótono foi observado aumentando-se a concentração de p β CD. Um valor de mínimo de A (~ 22 nm) foi observado na concentração de 10 μ M de p β CD.	79
Figura 4-5: Inverso do comprimento de persistência, A^{-1} , em função da concentração de p β CD. A linha contínua representa ajuste o modelo de 2 sítios, acoplado com a soma de duas isotermas de Hill. O ajuste permite a determinação dos parâmetros físico-químicos de formação dos complexos p β CD – DNA.....	81
Figura 4-6: () BI_1  a isoterma de ligação dos agregados de 2-3 moléculas de p β CD, enquanto () BI_2  a isoterma de ligação dos agregados com 12 moléculas de p β CD por sítio da molécula de DNA. (•)  o A^{-1} pela [p β CD] na região de 0-25 μ M e a linha contínua em preto é o resultado do ajuste do modelo de dois sítios independentes. ...	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Principais características das ciclodextrinas. As dimensões apresentadas nesta tabela são referentes a figura 1-2. Dados extraídos das referências [1] [12].....	4
Tabela 3.1: Caracterização da p β CD: massa molar (\bar{M}_w), 2º coeficiente do virial (A_2) e número de ciclodextrina por p β CD ($n_{\beta CD}$).....	29
Tabela 3.2: cmc dos surfactantes em água e em solução 0,5% m/V de p β CD determinada das medidas de condutividade.	31
Tabela 3.3: Grau de ionização dos complexos p β CD – surfactante e das micelas em água e em solução 0,5% m/V de p β CD.	33
Tabela 3.4 Parâmetros termodinâmicos para a interação β CD – surfactantes. n é a estequiometria da reação, K a constante de ligação, ΔH° a entalpia padrão de interação, $T\Delta S^\circ$ o termo entrópico e ΔG° a variação da energia livre de Gibbs padrão.	49
Tabela 3.5: cmc dos surfactantes em água e em solução 0,5% m/V de p β CD com 5 mM KCl. Comparação da Δcmc para os três surfactantes em 0 e 5 mM de KCl e a razão do número de surfactantes por p β CD.....	53
Tabela 3.6: Grau de ionização dos complexos e das micelas em água e em solução 0,5% m/V de p β CD com 0 ou 5 mM de KCl.	55
Tabela 3.7: Parâmetros termodinâmicos para a interação p β CD – surfactantes em diferentes concentrações de KCl. n é a estequiometria da reação, K a constante de ligação, ΔH° a entalpia aparente de interação padrão, $T\Delta S^\circ$ o termo entrópico e ΔG° a energia livre de Gibbs padrão.	60

RESUMO

ROCHA, Júlio César Barbosa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Estrutura e termodinâmica de formação dos complexos de polímero de β -ciclodextrina com surfactantes iônicos e efeito da associação do polímero com cadeias de DNA.** Orientador: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Oswaldo Monteiro Del Cima.

Os polímeros de β -ciclodextrinas ($p\beta$ CD) possuem cavidades que, assim como a β -ciclodextrina, são atrativas para a complexação de moléculas. A $p\beta$ CD pode ser associada a surfactantes iônicos formando um pseudo polieletrólito de carga controlada, que pode ser usado em diversas aplicações relevantes, como por exemplo, a compactação de moléculas de DNA. Contudo, há poucos trabalhos na literatura que estudaram a interação de $p\beta$ CD com surfactantes e nenhum deles apresentou uma caracterização estrutural e termodinâmica da formação destes complexos. Desta forma, investigamos neste trabalho a formação de complexos de $p\beta$ CD em solução aquosa com os surfactantes iônicos: dodecil sulfato de sódio, dodecil benzeno sulfonato de sódio e brometo de dodecil trimetil amônio, avaliando o efeito do aumento da força iônica na estrutura e termodinâmica de complexação. Medidas de concentração micelar crítica (*cmc*) mostraram que os surfactantes associam-se à $p\beta$ CD preferencialmente, formando micelas apenas após a saturação do polímero. Uma vez saturado o polímero não afeta a formação das micelas nem interage com elas. Medidas diretas do tamanho do polímero mostraram que há a liberação das β CD não ligadas covalentemente a $p\beta$ CD com a inserção do surfactante, seguido do aumento do tamanho da cadeia, ambas causadas pela repulsão eletrostática das moléculas dos surfactantes. Verificamos que a complexação dos surfactantes com a $p\beta$ CD é menos estável do que com a β CD. Sugerimos que a diferença é devido a alterações das cavidades da β CD na forma polimerizada. A interação da $p\beta$ CD com moléculas de DNA foi estudada usando a técnica de pinça ótica para várias concentrações do polímero. Foi determinado que a β CD na forma polimerizada, assim como a β CD monomérica, não atua como intercalante. Entretanto o comprimento de persistência alterou de forma não monótona com a concentração do polímero,

reduzindo de ~ 40 nm (DNA puro) para ~ 22 nm na concentração de ~ 10 μM de p βCD e entre 10 – 25 μM aumentou levemente, estabilizando depois de 25 μM . Usamos o modelo proposto por Rocha para determinar parâmetros físico-químicos a partir da variação do comprimento de persistência. Observamos dois tipos de agregados ao longo da cadeia de DNA. Na faixa de 0 – 10 μM são formados agregados de 2-3 moléculas de p βCD por sítio da molécula de DNA e entre 10 – 25 μM aparecem agregados de 12 p βCD ao longo da cadeia de DNA. A constante de ligação típica desses dois agregados ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) é maior do que a observada por Alves e colaboradores para a βCD nativa ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$). Portanto a polimerização das βCD potencializa a interação com a molécula de DNA, criando oportunidades para potenciais aplicações usando esses sistemas.

ABSTRACT

ROCHA, Júlio César Barbosa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Structure and thermodynamics of formation of the complexes of β -cyclodextrin polymer with ionic surfactants and interaction of this polymer with DNA chains.** Adviser: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Oswaldo Monteiro Del Cima.

The β -cyclodextrin polymer (p β CD) has cavities that are suitable for the complexation of molecules. The p β CD can be associated with ionic surfactants to form a pseudo polyelectrolyte that can be used in many important applications, for example DNA compaction. However, there are few articles in the literature that studies the interaction of p β CD with surfactants and none showed a structural characterization and thermodynamics of the formation of those complexes. In this work, we study the formation of p β CD complexes in aqueous solutions with ionic surfactants: sodium dodecyl sulfate, sodium dodecyl benzene sulfonate and dodecyl trimethyl ammonium, evaluating the effect of increasing ionic strength in the structure and thermodynamics of complexation. The critical micelle concentration (*cmc*) measurements showed that the surfactants associate preferentially with the p β CD and form micelles only after the saturation of the polymer. The saturated polymer seems not to affect nor interacts with the surfactant micelles. Direct measurements of the polymer size showed that release of non-covalently β CD bound to p β CD takes place as adding the surfactant, followed by the increase of polymer size. Both phenomena were caused by strong electrostatic repulsion between surfactant molecules. We found that the complexes of surfactants with p β CD are less stable than with β CD. We suggest that the difference is due to alterations of the β CD cavity when in polymerized form. The interaction of the p β CD with DNA molecules were studied by means of the optical tweezers technique changing the polymer concentration. It was showed that the polymerized form of β CD does not act as an intercalator as well as the monomeric β CD. However the persistence length had a non-trivial dependence with the polymer concentration, reducing from ~ 40 nm (pure DNA) to ~ 22 nm at a concentration of ~ 10 μ M of

p β CD and between 10-25 μ M increased slightly, stabilizing after 25 μ M. We use the model proposed by Rocha to determine physical and chemical parameters from the variation of the persistence length. We observed two types of aggregates along the DNA chain. In the range 0 – 10 μ M there are aggregates formed by 2 – 3 p β CD molecules per site of DNA molecule, and between 10 – 25 μ M, aggregates of 12 p β CD appear along the DNA strand. The typical binding constant of these two aggregates ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) to DNA molecule is greater than that observed by Alves et al. for the native β CD ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$). Therefore, the polymerization of β CD enhances the interaction with the DNA molecule, opening a door of potential applications using these systems.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

A química supramolecular é o ramo da química que estuda as interações intermoleculares (ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, etc.) entre estruturas moleculares. Dentre essas estruturas, destaca-se a ciclodextrina, um composto obtido da degradação do amido que foi descoberta por Villers em 1891, tendo a forma de um cone truncado com as hidroxilas primárias no lado mais estreito do cone e as hidroxilas secundárias no lado mais espesso. A face externa da ciclodextrina é hidrofílica e o interior hidrofóbico [1].

A ciclodextrina e seus derivados são muito úteis para solubilização de moléculas [1]. Ela tem sido bastante usada na área farmacêutica como carreadores de fármacos de baixa solubilidade em água. Apresentam baixa toxicidade para administração oral e a liberação ocorre facilmente, pois os complexos formados não envolvem ligações covalentes [2]. Vários trabalhos têm mostrado que a encapsulação dos fármacos pelas ciclodextrinas e seu derivados é bastante eficiente no tratamento de doenças como, por exemplo, o câncer [3-10].

Dos diversos compostos sintetizados a partir das ciclodextrinas, destacamos o polímero de β -ciclodextrina (ou p β CD), que é obtido a partir da polimerização das β -ciclodextrina usando o agente de reticulação, epícloridrina, em meio básico [11]. Ele é constituído de várias ciclodextrinas ligadas entre si por ligações covalentes. Esse arranjo de ciclodextrina altera as propriedades físico-químicas quando comparadas à ciclodextrina isolada. Por exemplo, ela permite aumentar a solubilidade em água [12]; permite a formação espontânea de agregados supramoleculares com outros polímeros como, por exemplo,

dextrana modificada com grupos lauril [13] [14]. Esses agregados podem também ser usados para encapsulação de fármacos [13].

A p β CD pode associar-se com surfactantes catiônicos para a formação de um polieletrólito de carga controlada [15]. Alguns trabalhos já mostraram que esse polieletrólito associa-se com polímeros de carga negativa formando um complexo ternário com potencial para aplicação na terapia genética [16-18].

Até onde sabemos poucos trabalhos estudaram a formação de polieletrólitos pela associação de polímeros de ciclodextrina com surfactantes catiônicos [15] [16], e nenhum trabalho foi encontrado com surfactantes aniônicos. Além disso, em nenhum trabalho foi feita a caracterização estrutural destes complexos em relação ao seu tamanho em meio aquoso, nem os parâmetros termodinâmicos da interação polímero – surfactante.

Deste modo, o propósito do nosso trabalho é realizar a caracterização estrutural dos complexos formados entre polímeros de β -ciclodextrina e surfactantes catiônicos e aniônicos e determinar a termodinâmica de formação destes complexos. O efeito da força iônica também será discutido para auxiliar na compreensão do efeito das interações eletrostáticas na estrutura e termodinâmica de formação desses complexos.

A caracterização estrutural dos complexos foi determinada pelas medidas de raio hidrodinâmico, variando a concentração do surfactante. Já a termodinâmica de formação dos complexos foi caracterizada pelos parâmetros termodinâmicos: entalpia aparente de interação padrão (ΔH°), entropia de complexação padrão (ΔS°), a energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), constante de complexação (K) e estequiometria de formação dos complexos (n).

A interação do polímero de β -ciclodextrina com moléculas de DNA também foi determinada na ausência dos surfactantes, usando a técnica de pinça ótica. A fim de estudarmos os possíveis efeitos que esse polímero promove nos parâmetros mecânicos: comprimento de contorno (ou L) e comprimento de persistência (ou A) da molécula de DNA. Através da variação de A em função da [p β CD] determinamos os parâmetros físico-químicos desta interação.

Nesta tese apresentamos a revisão bibliográfica sobre ciclodextrina e seus derivados no capítulo 1. A metodologia de preparo das amostras, bem como o fundamento e descrição das técnicas no capítulo 2. No capítulo 3 apresentamos os resultados e conclusões sobre a formação do complexo de β CD – surfactantes. Já no capítulo 4, apresentamos os resultados e conclusões sobre formação dos complexos via associação de β CD com cadeias de DNA. Finalmente no capítulo 5, temos as conclusões gerais sobre os resultados obtidos neste trabalho.

1.2 Revisão da Química de Ciclodextrinas e surfactantes

As ciclodextrinas mais estudadas na literatura são constituídas de 6, 7, ou 8 unidades de D-glicose, formando uma estrutura cíclica com ligações glicosídicas do tipo α -1,4, elas são conhecidas como: α , β e γ , e sua fórmula química é apresentada na Figura 1-1.

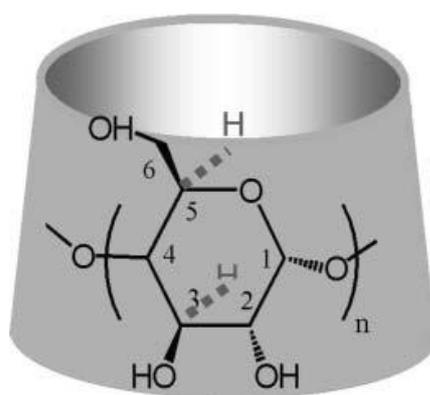


Figura 1-1: Estrutura tridimensional das ciclodextrinas em que n representa o número de unidades de D-glicose. $n = 6, 7$ ou 8 referem-se α, β ou γ ciclodextrina respectivamente. Figura extraída da referência [19].

As ciclodextrinas tem uma estrutura tridimensional na forma de um cone truncado como ilustrado na Figura 1-1. Os grupos hidroxilas são

posicionados na face externa do cone, o que confere um caráter hidrofílico a esta região. Já o hidrogênio dos grupos CH nas posições 3 e 5 são direcionados ao interior da cavidade da ciclodextrina e também os carbonos da posição 1 e 4 e o oxigênio da posição 1 que tornam a cavidade hidrofóbica [1]. Conseqüentemente as moléculas de água no interior da cavidade das ciclodextrinas são moléculas “ricas em entalpia”, pois as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água na cavidade e os hidrogênios das posições 3 e 5 e os carbonos da posição 1 e 4 são ligações mais energéticas dos que as ligações de hidrogênio das moléculas de água em solução [1].

As principais propriedades das ciclodextrinas são apresentadas na tabela 1.1. As dimensões apresentadas na tabela são referentes à Figura 1-2.

Tabela 1.1: Principais características das ciclodextrinas. As dimensões apresentadas nesta tabela são referentes a figura 1-2. Dados extraídos das referências [1] [12]

	α	β	γ
Solubilidade em água (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Volume da Cavidade (nm ³)	0,174	0,262	0,427
<i>a</i> (nm)	1,37	1,53	1,69
<i>b</i> (nm)	0,57	0,78	0,95
<i>c</i> (nm)	0,45	0,61	0,77
<i>d</i> (nm)	1,32	1,49	1,61
<i>e</i> (nm)	0,78	0,78	0,78

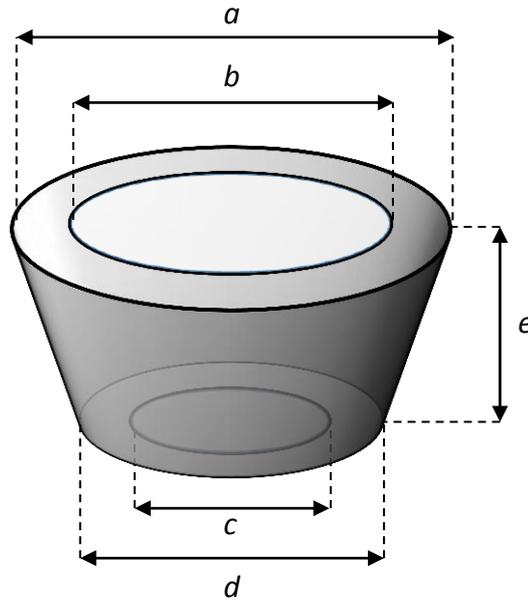


Figura 1-2: Estrutura tridimensional das ciclodextrinas e suas dimensões.

A diferença na solubilidade entre α , β e γ -ciclodextrinas apresentada na tabela 1.1 está associada à formação de ligações de hidrogênio intramolecular entre as hidroxilas secundárias de unidades de D-glicose adjacentes. A β -ciclodextrina apresenta todas as ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias tornando essa estrutura mais rígida e menos solúvel entre as três principais ciclodextrinas. Já α -ciclodextrina apresenta uma unidade de D-glicose numa posição distorcida que impede a completa formação das ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias. Já a γ -ciclodextrina é uma estrutura flexível que dificulta as ligações de hidrogênio intramolecular e a torna a mais solúvel das três ciclodextrinas [1].

A cavidade da ciclodextrina torna essa molécula interessante para a solubilização de compostos hidrofóbicos de baixo peso molecular [12]. A formação dos complexos supramoleculares, entre a ciclodextrina e moléculas hidrofóbicas, envolve vários processos termodinâmicos. Os principais são: a liberação das moléculas de água de alta energia do interior da cavidade, o efeito hidrofóbico decorrente da retirada de moléculas de água das partes hidrofóbicas que serão inseridas na cavidade da ciclodextrina e interações intermoleculares (força de van der Waals, interações eletrostática, ligações de

hidrogênio) entre a molécula hóspede e o hospedeiro (ciclodextrina) [20] [21]. Entretanto, a importância de cada termo ainda não está bem estabelecida na literatura e depende do tipo de molécula hospedeira que está sendo usada [22]. Este trabalho está focado na associação das ciclodextrinas com surfactantes.

Os surfactantes são moléculas anfifílicas capazes de reduzir a tensão interfacial entre dois meios e que podem se agregar em solução formando micelas. Surfactantes como, por exemplo, o brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) têm a parte hidrofóbica consistindo de um hidrocarboneto com 12 átomos de carbono. Já foi extensivamente estudado a interação desses surfactantes com a β -ciclodextrina (ou β CD) [20, 23-26]. As principais conclusões relatadas para esses complexos envolvem o retardo da formação das micelas de ambos os surfactantes na presença da β CD [23-25]. A formação do complexo ocorre principalmente numa estequiometria 1:1 [1], e os complexos pouco afetam as micelas dos surfactantes [24]. Entretanto, recentemente, Tsianou e colaboradores mostraram através de medidas de espalhamento de nêutrons, que a α -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina participam da formação das micelas de SDS em D₂O e estão localizadas no núcleo das micelas [26].

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento no interesse nos polímeros de ciclodextrina [12]. Esses polímeros são sintetizados, principalmente, usando a epícloridrina que faz a ligação entre duas ciclodextrinas. A adição de tolueno na síntese leva, preferencialmente, a formação de polímeros de ciclodextrinas lineares, enquanto a não adição leva a formação de polímeros reticulados [27]. O esquema da síntese está representado na Figura 1-3. Aqui neste trabalho, estudamos a interação dos polímeros reticulados de poli- β -ciclodextrina (ou p β CD) (Figura 1-3b) com os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB) e dodecil benzeno sulfonato de sódio (SDBS).

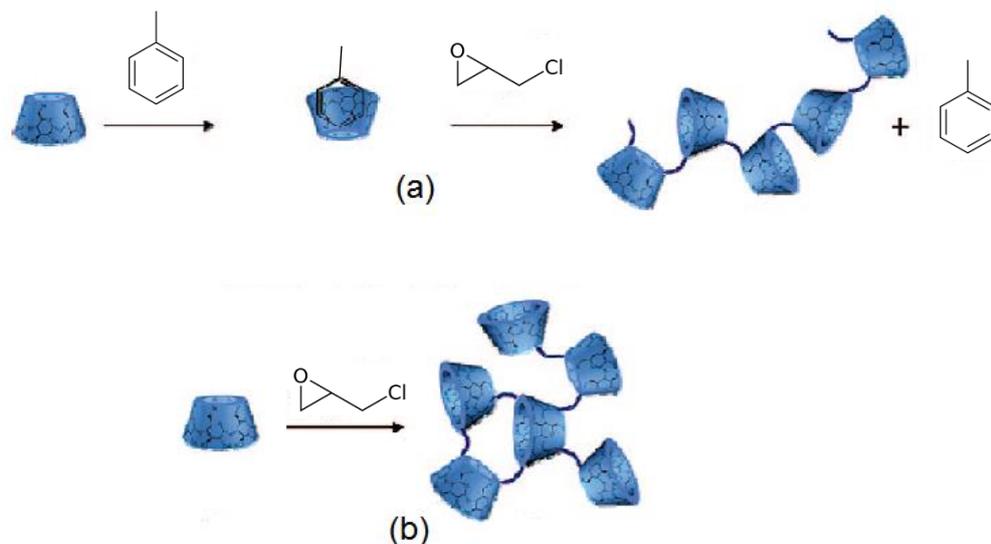


Figura 1-3 Ilustração da síntese do poli- β -ciclodextrina (p β CD) linear com a adição de tolueno (a) e p β CD reticulada sem a adição de tolueno (b). Figura extraída da referência [27].

A solubilidade da β CD em água (1,85 g/100 mL) é muito baixa em comparação com α CD e γ CD (14,5 g/100 mL e 23,2 g/100 mL, respectivamente). A síntese da p β CD possibilita aumentar a concentração de β CD solubilizadas e aumentar, portanto, a capacidade de solubilização de moléculas hidrofóbicas presentes em uma solução [12]. Outra aplicação interessante conseguida a partir da polimerização das β -ciclodextrinas é a capacidade de forma hidrogéis físicos pela associação da p β CD e polímeros de adamantano [12] [27] ou com qualquer outro polímero com partes afins à cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. A estrutura pode ser revertida associando uma molécula hidrofóbica que tenha mais afinidade com a cavidade da ciclodextrina do que o adamantano, ou então aumentando a temperatura. Essa reversibilidade torna esse sistema útil em aplicações biomédicas [12].

A possibilidade de associar as p β CD com estruturas como a dextrana modificada com grupos lauril permitiu a formação de nanogéis com diâmetro de algumas centenas de nanômetros, que são estáveis por meses a temperaturas inferiores a 37° C. Essas estruturas podem ser usadas para solubilizar fármacos, pois algumas cavidades das ciclodextrinas permanecem disponíveis [13]. A formação desses nanogéis deve-se, necessariamente, a presença das

várias β CD próximas na estrutura da p β CD. De forma que, a interação entre os grupos lauril da dextrana e as cavidades da p β CD são potencializadas [14].

A associação de surfactantes iônicos com a p β CD permite a formação de polieletrólitos de carga controlada. Galant e colaboradores estudaram a interação da p β CD com cloreto de dodecil trimetil amônio (DTAC) em uma série de trabalhos, visando a formação de um polieletrólito reversível com potencial para complexar polímeros aniônicos como, por exemplo, o DNA [15-18]. Em um desses trabalhos eles estudaram a formação do complexo p β CD – DTAC sem a adição do polímero aniônico [15]. As principais conclusões apresentadas foram: os complexos são formados numa estequiometria de 1:1, isto é, cada cavidade da p β CD acomoda apenas uma molécula de DTAC; a constante de ligação do surfactante com a cavidade da β CD diminui com o aumento da concentração de DTAC. Há uma concentração mínima de DTAC para que os complexos apresentem o comportamento de polieletrólito e, finalmente, a distribuição espacial dos surfactantes não acontece de maneira uniforme. Inicialmente, eles são distribuídos na parte externa da p β CD e, só a partir de uma concentração crítica, as moléculas se distribuem de forma homogênea em toda a estrutura da p β CD. Exceto por esse trabalho não foi encontrado na literatura o estudo da interação de surfactantes com a p β CD.

Desta maneira, a fim de entender a formação dos complexos p β CD – surfactantes, apresentamos neste trabalho uma caracterização estrutural e termodinâmica dessas estruturas. Os surfactantes estudados foram SDS, DTAB e SDBS e suas fórmulas estruturais são apresentadas na Figura 1-4.

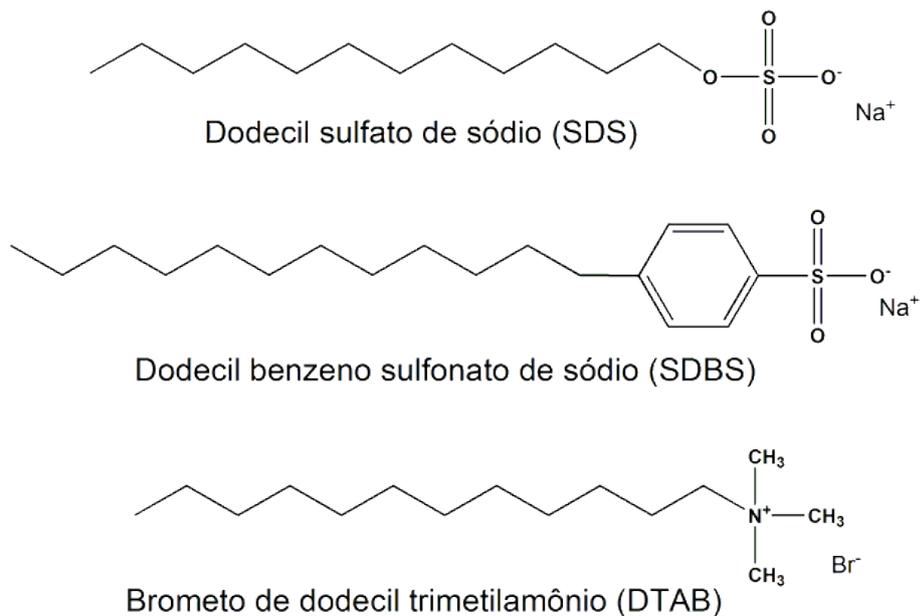


Figura 1-4: Fórmula estrutural dos surfactantes estudados neste trabalho.

A escolha destes surfactantes segue alguns critérios. Primeiramente, todos são constituídos de um hidrocarboneto com 12 átomos de carbono. O SDS e o DTAB foram escolhidos, a fim de avaliarmos como a região hidrofílica (ou cabeça) do surfactante afeta a complexação com a p β CD. Já a comparação do SDS com o SDBS mostra como a substituição do oxigênio pelo anel benzênico na cauda do surfactante influencia na formação dos complexos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivos Gerais

Determinar a estrutura e termodinâmica de formação dos complexos de p β CD – surfactantes, considerando a complexação de surfactantes catiônicos e aniônicos. Determinar o papel da força iônica na termodinâmica de formação e nos parâmetros estruturais dos complexos.

Estudar as propriedades mecânicas da molécula DNA em diferentes concentrações de p β CD correlacionando com parâmetros físico-químicos.

1.3.1 Objetivos Específicos

Caracterizar a p β CD determinando a massa molar média ponderada (\bar{M}_w), o número médio de ciclodextrinas disponíveis por cadeia do polímero e o segundo coeficiente do virial (A_2) quando em solução aquosa.

Determinar o valor da concentração micelar crítica (cmc) dos surfactantes em água e na presença de 0,5% m/V de p β CD, a diferença (Δcmc) desses valores e o número de surfactantes por cadeia de p β CD.

Comparar o raio dos complexos de p β CD – surfactantes em solução aquosa, avaliando os efeitos da diferença do tipo de carga na cabeça do surfactante (SDS e DTAB) e o efeito da presença do anel aromático no lugar do oxigênio (SDS e SDBS).

Caracterizar a carga das cadeias pela determinação do potencial zeta e condutividade elétrica de soluções da p β CD em diferentes concentrações dos surfactantes para confirmarmos a formação e a carga elétrica dos complexos.

Comparar as curvas de entalpia para os experimentos de titulação isotérmica dos surfactantes em água e em solução 0,5% m/V de p β CD para avaliarmos os efeitos que o polímero promove na micelização dos surfactantes e determinarmos a principal faixa de formação dos complexos.

Determinar os parâmetros termodinâmicos padrões: entalpia (ΔH°), entropia (ΔS°), energia livre de Gibbs (ΔG°), constante de ligação (K) e estequiometria (n) de formação dos complexos p β CD e β CD com SDS, DTAB e SDBS, ajustando o modelo de sítios únicos e independentes [28].

Determinar o papel das interações eletrostáticas no tamanho dos complexos, comparando o raio hidrodinâmico com 5 e 15 mM de KCl e variando a concentração dos surfactantes de 0 a 15 mM. Avaliar a influência da força iônica nos parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° , ΔS° , n e K).

Avaliar os efeitos no comprimento de contorno (L) e persistência (A) da molécula de DNA na presença de diferentes concentrações de p β CD. Determinar a constante de ligação e o parâmetro de Hill para a interação p β CD com DNA a partir da variação de A em função da [p β CD].

Capítulo 2

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.1 Reagentes

Os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB) e dodecil benzeno sulfonato de sódio (SDBS), todos com pureza $\geq 99\%$, foram obtidos da Sigma Aldrich e usados sem purificação extra. A β -ciclodextrina e o cloreto de potássio (KCl) também foram obtidos da Sigma Aldrich e usados como recebidos. O polímero de β -ciclodextrina foi sintetizado pelo Prof. Frederico Barros de Sousa do Instituto de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI e gentilmente cedido para a realização deste trabalho. Detalhes do processo de síntese podem ser encontrados na referência [29].

2.2 Preparação de Amostras e Descrição dos Equipamentos

As soluções foram preparadas 24 horas antes do uso, nas concentrações de 0,5% e 0,25% m/V de p β CD e β CD, respectivamente, usando água deionizada. As soluções foram filtradas usando um filtro de nylon de poros com 0,22 μm . Os surfactantes foram preparados em várias concentrações e sempre acima da *cmc*, também com pelo menos 24 horas antes do uso, em água deionizada. Foram adicionadas alíquotas para varrer toda faixa de concentração desde 0 mM até um valor maior do que a *cmc* dos surfactantes estudados.

Espalhamento de Luz: 10 mL de solução 0,5% m/v de p β CD foi adicionada em cubetas cilíndricas de vidro e titulamos alíquotas de solução 0,5 mol/L de SDS ou DTAB ou 0,25 mol/L do SDBS, varrendo concentrações dos surfactantes de 0 – 15 mM. Em cada concentração a solução foi circulada em um sistema de mangueiras passando por um filtro de nylon de 0,22 μ m durante 10 minutos usando uma bomba de circulação (Brookhaven Co.) para a remoção de impurezas sólidas. A intensidade espalhada pela amostra foi monitorada usando o equipamento da Brookhaven Co. constituído de um laser de He-Ne de comprimento de onda de 632,8 nm, um goniômetro e um correlacionador TurboCorr. Nas medidas de espalhamento dinâmico os correlogramas foram obtidos após um tempo longo o suficiente para não serem mais observadas flutuações estatísticas importantes (tipicamente 30 minutos para cada correlograma). A medida foi feita inicialmente numa faixa de ângulos de 30 – 130° para verificar se os complexos p β CD – surfactantes estão no regime difusivo. Confirmada essa condição, escolhemos o ângulo de 30°. O ajuste da função de correlação temporal foi feito usando o método de regularização de máxima entropia e, então, obtivemos o valor do raio hidrodinâmico R_h das estruturas dispersas para diferentes concentrações dos surfactantes. O mesmo procedimento foi adotado na presença de 5 ou 15 mM de KCl. A massa molar da p β CD foi determinada usando a técnica de espalhamento estático de luz. Construímos um gráfico de Zimm variando a concentração da p β CD de 0,4 – 2,7 mg/mL em intervalos de 0,39 mg/mL e para cada concentração foi realizada uma varredura angular de 40 a 130° em intervalos de 10°. Todas as medidas foram feitas à temperatura controlada a (25,0 \pm 0,5) °C. A variação do índice de refração em função da concentração (dn/dc), necessário na determinação da massa molar, foi determinada usando o refratômetro diferencial (BI-DNDC) da Brookhaven Co. com temperatura controlada igual a (25,00 \pm 0,05)° C.

Microcalorimetria Isotérmica de Titulação (μ -ITC): Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram realizados em um calorímetro CSC-4200 (Science Corp. Calorimeter) controlado pelo programa ItcRun. Os experimentos foram realizados em celas de reação (amostra e referência) de volume fixo com volume total de 1,30 mL. Para cada experimento, as celas de

amostra e referência foram preenchidas com uma solução de p β CD 0,50% m/v preparada em um solvente de interesse (água deionizada ou solução aquosa de KCl 5,0 ou 15 mM). A solução na cela de amostra foi titulada por meio de injeções consecutivas de uma solução de surfactante (SDS, SDBS ou DTAB) preparada com o mesmo solvente da solução na cela de amostra. Experimentos de titulação na ausência da p β CD ou na presença de β CD 0,25% m/V, foram igualmente realizados. Os volumes de injeção, o número de injeções e as concentrações das soluções de surfactantes foram escolhidos a fim de se alcançar a concentração final de surfactante desejada na cela após o término do experimento.

Durante cada titulação, a mistura na cela de amostra foi agitada a uma taxa de 300 rpm utilizando um agitador do tipo hélice para homogeneização da amostra. O intervalo de tempo entre cada injeção foi de 15 minutos, tempo suficiente para que o sinal registrado pelo equipamento retornasse à linha base. A temperatura de realização dos experimentos foi de $(25,000 \pm 0,001)^\circ \text{C}$.

Os dados brutos foram obtidos na forma de gráficos de potência versus tempo em que os picos associados a cada injeção foram integrados para obter a quantidade de energia absorvida ou liberada na forma de calor (q_i). A divisão de q_i pelo número de mols de surfactante adicionado forneceu a variação de entalpia observada para cada injeção (ΔH_{obs}), que foi expressa como função da concentração total de surfactante.

Potencial Zeta: Os experimentos para a determinação do potencial zeta foram realizados num equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments. Foi usada solução 2% m/V de p β CD ao invés de 0,5% m/V para melhorar a relação sinal/ruído.

Condutivimetria: A condutividade elétrica foi medida na temperatura de $(25,0 \pm 0,1)^\circ \text{C}$ usando um condutímetro digital (DM-32) com células de condutividade (DMC-010M) com eletrodos de platina da Digimed (Brasil). Foram preparadas 20 mL de soluções 0,5% m/V de p β CD ou 0,25% m/V de β CD em água. As soluções de p β CD também foram preparadas em 5 mM de KCl. Foi titulada, então, a solução de surfactante (SDS, DTAB ou SDBS).

Fluorescência: Uma solução de pireno foi preparada na concentração de $95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol. 80 μL desta solução foram adicionados num frasco. O recipiente foi deixado destampado para que o etanol evaporasse. Foi adicionado, então, 7 mL de solução 0,5% m/V de p β CD e agitado num banho de ultrassom por 3 minutos. 2,5 mL dessa solução foram transferidas para uma célula de quartzo de 10 mm. A essa solução foi titulada com solução de surfactante (SDS, DTAB ou SDBS). O espectro de fluorescência foi medido num espectrômetro de fluorescência Cary Eclipse (Agilent Technologies, EUA) com comprimento de onda de excitação de 335 nm e abertura da fenda de 2,5 nm. A faixa de varredura foi de 360 – 400 nm com uma taxa de 30 nm/min. O espectro de fluorescência do pireno foi obtido e calculado a razão das intensidades da 1 $^{\circ}$ (372,5 nm) e 3 $^{\circ}$ (383,5 nm) banda do pireno. Essa razão foi medida em função da concentração dos surfactantes.

Dispersão de Taylor: Nessa técnica, usamos um tubo de teflon de 6,1 metros de comprimento e diâmetro interno de 0,61 milímetros e com raio de enrolamento de 10 cm. A vazão foi controlada em 300 $\mu\text{L/h}$ usando uma bomba de seringa (New Era, modelo NE-1002X). Nessas condições o limite teórico da técnica é satisfeito [30]. Foi utilizado como detector o refratômetro diferencial (BI-DNDC) da Brookhaven Co. O eluente utilizado em todos os experimentos foi a água e a temperatura foi mantida em $(25 \pm 1) ^{\circ}\text{C}$. Os experimentos foram realizados com as seguintes soluções aquosas: p β CD 0,5% m/V, p β CD 0,5% m/V + 2,5 mM de SDS e β CD 0,25% m/V + 2,5 mM de SDS.

2.3 Técnicas de Caracterização

2.3.1 Espalhamento de Luz

A técnica de espalhamento de luz consiste em incidir um feixe de laser na amostra e detectar a luz espalhada pela amostra em determinado ângulo em relação ao feixe incidente. No espalhamento estático detecta-se a intensidade média e no dinâmico as flutuações da intensidade. A técnica permite determinar o tamanho de partículas nanométricas dispersas em

solução, como por exemplo: micelas, polímeros, nanopartículas semicondutoras. Além disso, também é possível determinar a massa molar e o segundo coeficiente do virial de estruturas coloidais.

Espalhamento Estático de Luz: É uma técnica não – invasiva, tradicionalmente usada na caracterização de coloides [31]. A técnica de espalhamento estático de luz possibilita determinar a massa molar média ponderada pela massa, \bar{M}_w , e o raio de giração, R_G , descritos pelas equações 2.1 e 2.2 respectivamente e o segundo coeficiente do Virial, A_2 , de macromoléculas em suspensão.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}, \quad (2.1)$$

$$R_G = \sqrt{\langle R_G^2 \rangle} = \sqrt{\frac{1}{N} \left\langle \sum_{k=1}^N (\vec{r}_k - \vec{r}_{\text{médio}})^2 \right\rangle}, \quad (2.2)$$

onde w_i é a fração de massa das moléculas de um mesmo tamanho, n_i é o número de moléculas de massa M_i , N é o número total de monômeros, \vec{r}_k é a posição de cada monômero e $\vec{r}_{\text{médio}}$ é a posição do centro de massa do polímero, ambas em relação a uma dada origem.

A intensidade de luz espalhada por um sistema coloidal pode ser escrita pela equação 2.3 [32]:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{\bar{M}_w P(\theta)} + 2A_2 c + \dots \quad (2.3)$$

onde c é a concentração do soluto, θ é o ângulo entre a linha que une o ponto espalhador ao observador e o feixe incidente, $P(\theta)$ o fator de forma das partículas espalhadoras, A_2 o segundo coeficiente do virial, K é a constante ótica e R_θ é a razão de Rayleigh. Os dois últimos parâmetros são definidos pelas equações 2.4 e 2.5:

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A \lambda^4}, \quad (2.4)$$

onde n_0 é o índice de refração do solvente, (dn/dc) o aumento do índice de refração com um incremento na concentração do soluto, N_A o número de Avogadro e λ o comprimento de onda da radiação incidente.

A razão de Rayleigh relaciona-se com a intensidade espalhada por:

$$R_\theta = \frac{r^2 i_\theta}{I_0}, \quad (2.5)$$

onde r é a distância entre observador e o ponto de espalhamento, I_0 a intensidade de luz espalhada pelo solvente e i_θ a intensidade espalhada pela solução

O método de Zimm consiste em analisar a equação 2.3 em dois limites, isto é, $\theta \rightarrow 0$ que resulta na equação 2.6 e $c \rightarrow 0$ que fornece a equação 2.7.

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{\bar{M}_w} + 2A_2c \quad \theta \rightarrow 0, \quad (2.6)$$

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{\bar{M}_w} \left[1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle R_G^2 \rangle \sin^2 \frac{\theta}{2} \right] \quad c \rightarrow 0. \quad (2.7)$$

Construindo um gráfico da intensidade espalhada em função da concentração do soluto e do ângulo de espalhamento, podemos ajustar as equações 2.6 e 2.7 nos limites adequados e obter a \bar{M}_w , $\langle R_G^2 \rangle$ e A_2 [31, 32].

Espalhamento Dinâmico de Luz: A flutuação da intensidade de luz espalhada está relacionada com a dinâmica difusiva das partículas espalhadoras. A técnica que mede essas flutuações é chamada espectroscopia de correlação de Fótons. A função de auto-correlação temporal é uma função matemática que é definida como a média estatística de uma grandeza num tempo t e num tempo $(t + \tau)$ [33]. No espalhamento de luz definimos as funções de auto-correlação temporal normalizadas da intensidade espalhada, $g^{(2)}(\tau)$, e do campo elétrico espalhado, $g^{(1)}(\tau)$ pelas expressões:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2}, \quad (2.8a)$$

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle}, \quad (2.8b)$$

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta |g^{(1)}(\tau)|^2, \quad (2.8c)$$

onde τ é o tempo de correlação, $E(t)$ e $I(t)$ são os valor da campo elétrico e intensidade em um tempo t . O símbolo * indica o complexo conjugado do parâmetro. A eq. 2.8c, conhecida como *relação de Siegert*, mostra a relação das duas funções de correlação.

A função de correlação da intensidade pode ser escrita em termos da expansão de cumulantes (eq. 2.9).

$$g^{(2)}(\tau) = A + B \exp(-2\bar{\Gamma}\tau + \gamma\tau^2). \quad (2.9)$$

Os parâmetros A e B são parâmetros de ajuste, onde A é a assíntota da função de correlação igual a $\langle I \rangle^2$ e B a amplitude da função igual a $\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2$, $\bar{\Gamma}$ é a taxa

de decaimento média da exponencial e γ é o termo de polidispersão das partículas espalhadoras.

Essa equação é válida para sistemas com muitas partículas espalhadoras de baixa dispersão e no regime Browniano.

Em sistemas que seguem uma dinâmica difusiva, $\bar{\Gamma}$ pode ser relacionado com o termo que contém a dependência angular da intensidade espalhada, o vetor de espalhamento q , que é definido pela equação 2.11:

$$\bar{\Gamma} = Dq^2, \quad (2.10)$$

onde D é o coeficiente médio de auto-difusão translacional dos entes espalhadores.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (2.11)$$

onde λ é comprimento de onda da radiação incidente, n é o índice de refração do meio e θ é o ângulo definido entre a direção do laser e a direção do detector.

A equação 2.10 fornece a correlação entre a dinâmica da intensidade espalhada e a dinâmica dos entes espalhadores. A constante D é o coeficiente de autodifusão e permite fazer essa conexão. O coeficiente de autodifusão relaciona-se com o raio hidrodinâmico dos entes espalhadores (R_h) pela equação de Stoke – Einstein [33]:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}, \quad (2.12)$$

onde k_B é constante de Boltzmann η é a viscosidade a qual os entes espalhadores estão submetidos e T é a temperatura em escala absoluta.

2.3.2 Microcalorimetria Isotérmica de Titulação (μ -ITC)

A μ -ITC é especialmente útil na determinação das energias envolvidas nos processos de formação dos complexos em sistemas macromoleculares. Ao longo das últimas décadas tem se desenvolvido calorímetros capazes de detectar energia na forma de calor da ordem de micro joules [28]. A técnica de μ -ITC consiste em realizar a titulação de um componente *A* numa amostra que contém um componente *B* mantido num banho térmico a temperatura constante. A adição do titulante pode levar a troca de calor com o banho térmico para manter a temperatura da amostra constante. Esse fluxo de calor é detectado pelo equipamento num espectro de potência versus tempo. A integral dos picos fornece o calor liberado ou absorvido após cada titulação.

A μ -ITC é a única técnica capaz de fornecer uma descrição termodinâmica completa em um único experimento [28]. Há vários modelos para o ajuste da curva de entalpia aparente de interação versus a razão molar entre ligantes e macromoléculas. O mais simples desses modelos é o de sítios únicos e independentes. Esse modelo já foi aplicado com sucesso em sistemas envolvendo a interação de surfactantes e β CD [20], e também na interação de dextrana enxertada com grupos lauril e a $p\beta$ CD [14]. [34]

A complexação entre dois componentes *A* e *B* formando *AB* está representado na eq. 2.13.



onde *K* é a constante de formação que é definida pela equação 2.14.

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}, \quad (2.14)$$

onde $[A]$, $[B]$ e $[AB]$ são as concentrações dos componentes A , B e AB respectivamente.

Além de K , a estequiometria (n) e a entalpia padrão de complexação (ΔH°) são parâmetros termodinâmicos que caracterizam a reação apresentada na equação 2.13.

Conhecendo-se os parâmetros K e ΔH° podemos determinar também a entropia padrão (ΔS°) e a energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) de complexação. Usando as equações termodinâmicas fundamentais 2.15 e 2.16.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K, \quad (2.15)$$

$$T\Delta S^\circ = \Delta H^\circ - \Delta G^\circ, \quad (2.16)$$

onde T é a temperatura na escala absoluta.

A titulação de solução de surfactantes em solução de p β CD, tipicamente, envolve variação de entalpia ($\Delta H_{\text{obs}}^{\text{p}\beta\text{CD}}$). O $\Delta H_{\text{obs}}^{\text{p}\beta\text{CD}}$ pode ser separado em vários termos como mostrado na equação 2.17.

$$\Delta H_{\text{obs}}^{\text{p}\beta\text{CD}} = \Delta H_{\text{dil}} + \Delta H_{\text{dem}} + \Delta H_{\text{ap-int}} \quad (2.17)$$

- ΔH_{dil} refere-se a entalpia de diluição das cadeias de surfactante após a formação de micelas;
- ΔH_{dem} refere-se a entalpia de demicelização das cadeias do surfactante.
- $\Delta H_{\text{ap-int}}$ é a entalpia aparente de interação entre as cadeias do surfactante e as cadeias da p β CD.

Estamos interessados na chamada variação de entalpia aparente de interação $\Delta H_{\text{ap-int}}$. Essa entalpia é aparente, pois não sabemos precisamente quantas moléculas de surfactante interagem com a p β CD e quantas moléculas vão para a solução.

É necessário para a determinação de $\Delta H_{\text{ap-int}}$ que a adição de surfactante seja feita em água.

$$\Delta H_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}} = \Delta H_{\text{dil}} + \Delta H_{\text{dem}} \quad (2.18)$$

A subtração da equação 2.18 da equação 2.17 permite determinar a entalpia aparente de interação entre o surfactante e a cadeia de p β CD.

No caso particular para a interação da p β CD com o surfactante podemos escrever:

$$\Delta H_{\text{ap-int}} = \Delta H_{\text{Surf-p}\beta\text{CD}} + \Delta H_{\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}} + \Delta H_{\text{H}_2\text{O-p}\beta\text{CD}} + \Delta H_{\text{H}_2\text{O-Surf}} \quad (2.19)$$

- $\Delta H_{\text{Surf-p}\beta\text{CD}}$ é energia liberada ou absorvida na interação do surfactante com a p β CD;
- $\Delta H_{\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}}$ é a energia liberada pela interação entre as moléculas de água que saíram da cavidade da p β CD e das primeiras camadas de solvatação do surfactante.
- $\Delta H_{\text{H}_2\text{O-p}\beta\text{CD}}$ é a energia gasta para retirar moléculas de água das cavidades da p β CD.
- $\Delta H_{\text{H}_2\text{O-Surf}}$ é a energia gasta para retirar moléculas de água das primeiras camadas de solvatação das moléculas de surfactante.

Para compreender a termodinâmica de formação dos complexos p β CD – surfactantes, é necessário verificar qual a importância de cada termo da equação 2.19 para o processo de complexação.

2.3.3 Potencial Zeta

Partículas coloidais dispersas num sistema aquoso estão sujeitas ao movimento Browniano. Elas podem flocular formando agregados e, em seguida, coagular e sedimentar. Na grande maioria das aplicações nesses sistemas, é importante controlar esses processos físico-químicos, de forma que as partículas permanecem dispersas. Há dois principais potenciais que

atuam de maneira contrária nas partículas, um deles é o potencial atrativo criado pelas interações de van der Waals (VDW), que tendem a fazer as partículas se aproximarem e o outro um potencial eletrostático repulsivo. O balanço entre eles determinará se as partículas permanecerão estáveis.

Há várias maneiras de tornar as partículas estáveis, para uma dispersão de sólido em líquido. Uma delas é a adsorção de polímeros ou surfactantes na partícula de forma que a repulsão estérica entre as cadeias das estruturas adsorvidas não permita que as interações de VDW sejam dominantes. Outra maneira é alterar a carga das partículas coloidais de forma que o potencial eletrostático repulsivo seja superior às interações de VDW. Essa segunda opção geralmente é mais usada, pois é mais barata e mais fácil de reverter o processo caso seja necessário que as partículas agreguem. Os complexos p β CD – surfactantes são exemplos típicos de sistemas com mudança da carga das estruturas coloidais, pois os surfactantes iônicos em solução aquosa dissociam dos contra-íons e se complexam na p β CD formando uma estrutura carregada.

As partículas coloidais quando possuem carga criam na região próxima a elas uma camada onde se encontram uma maior concentração de íons de carga oposta. À medida que afastamos dessas partículas em direção à solução a densidade de cargas positivas e negativas tornam-se iguais. Há duas camadas elétricas próxima da partícula, uma conhecida como camada de Stern e a outra é a camada difusa. O potencial zeta é definido como o potencial eletrostático na superfície de separação entre a região onde as cargas se movimentam com a partícula e a região onde as cargas permanecem no dispersante.

Em experimentos de eletroforese pode se determinar o potencial zeta das partículas. Aplicando-se um campo elétrico no sistema coloidal, as partículas vão se mover na direção do eletrodo de carga oposta. Nesse movimento elas estarão sujeitas às forças viscosas. Após um dado intervalo de tempo a velocidade (mobilidade eletroforética) da partícula ficará constante. A mobilidade eletroforética relaciona-se com o potencial zeta pela equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta}, \quad (2.20)$$

onde U_E é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica, z é o potencial zeta, η é a viscosidade, $f(\kappa a)$ a função de Henry e κa é a razão do raio da partícula pela espessura da dupla camada elétrica.

Há duas aproximações para a função de Henry: quando o raio das partículas é muito maior que o comprimento de Debye de modo que $\kappa a > 100$ e $f(\kappa a) = 1,5$ (aproximação de Smoluchowski), que normalmente é válido para partículas em meios aquosos de baixa concentração de eletrólitos; quando o raio da partícula é pequeno em comparação ao comprimento de Debye de modo que $\kappa a < 0,1$ e $f(\kappa a) = 1$ (aproximação de Hückel), normalmente usada para colóides em meios não aquosos.

O potencial zeta é fortemente dependente do potencial hidrogeniônico (PH) da solução e as partículas são consideradas estáveis se o potencial zeta < -30 mV ou $> +30$ mV.

2.3.4 Condutivimetria

A resistência elétrica, R , é um parâmetro que depende das características geométricas e da natureza do material. A equação que relaciona essas propriedades é:

$$R = \frac{\rho L}{A}, \quad (2.21)$$

onde ρ é a resistência específica, L é o comprimento e A é a área de seção transversal do condutor.

A condutância é definida como o inverso da resistência.

$$G = \frac{1}{R} = \frac{A}{\rho L} = \kappa \frac{A}{L}, \quad (2.22)$$

onde G é a condutância e κ é a condutividade específica.

Nas medidas com soluções eletrolíticas realizadas no condutímetro, construímos um gráfico de κ em diferentes concentrações dos surfactantes. A cmc pode ser determinada pelo método tradicional de interseção das linhas de regressão antes e depois da cmc e o grau de ionização pela razão das inclinações nessas mesmas condições. Entretanto esse método não é muito preciso, principalmente para surfactantes com transição gradual da condutividade. O método para determinação da cmc e grau de ionização usado neste trabalho foi proposto por Carpena e colaboradores e consiste de um ajuste não-linear da equação (2.23) [35].

$$\kappa(c) = \kappa(c=0) + Sc + \Delta cS(g-1) + \ln \left[\frac{1 + e^{\frac{c-cmc}{\Delta c}}}{1 + e^{-\frac{cmc}{\Delta c}}} \right], \quad (2.23)$$

onde κ é a condutividade específica, c é a concentração do surfactante, S é a inclinação antes da cmc , g é o grau de ionização, Δc é a faixa de concentração da transição. Através do ajuste dos dados de κ versus c são obtidos os parâmetros S , cmc , g e Δc .

2.3.5 Fluorescência do Pireno

O espectro de fluorescência do pireno é fortemente afetado pelo solvente. Em solventes hidrofílicos o pico I de intensidade em (372,5 nm) é mais pronunciado do que em solventes hidrofóbicos [36]. A análise da razão dos picos I e III (383,0 nm) é um excelente método para a determinação da cmc dos surfactantes iônicos e não iônicos[37-41].

A razão dos picos I e III (razão 1:3) no gráfico de fluorescência do pireno em soluções micelares apresenta comportamento típico de uma

sigmoide decrescente. Aguiar e colaboradores propuseram um método analítico, a fim de padronizar a obtenção da *cmc*. O método consiste em ajustar uma sigmoide decrescente de Boltzmann (2.24) nos dados de razão 1:3 do espectro de fluorescência do pireno em diferentes concentrações do surfactante [41].

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (2.24)$$

onde A_1 e A_2 são os limites superiores e inferiores da sigmoide, x_0 é o ponto de inflexão da sigmoide e Δx é a faixa no eixo x onde ocorre variação da sigmoide no eixo y (Figura 2-1).

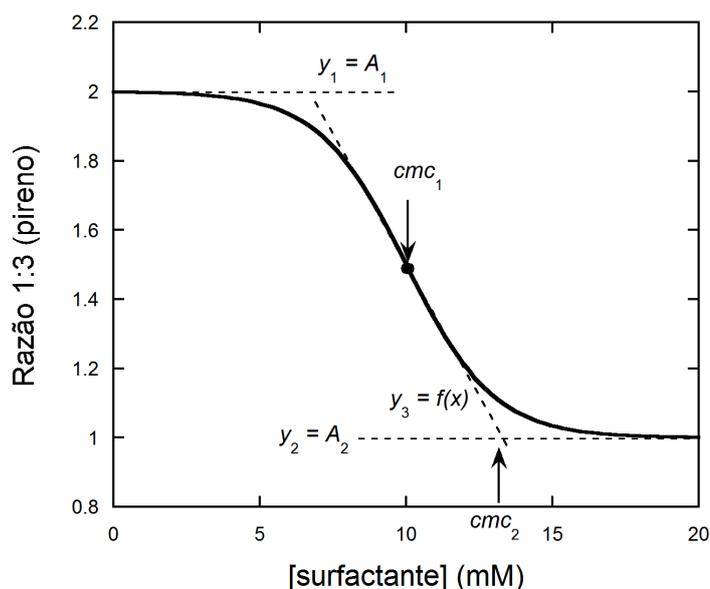


Figura 2-1 Modelo de sigmoide decrescente usado nos ajustes da razão dos picos 1:3 do espectro de fluorescência do pireno. cmc_1 é o ponto de inflexão da curva (x_0) e cmc_2 é o ponto de interseção das retas $y_3 = f(x)$ e $y_2 = A_2$. Figura adaptada da referência [41].

Os valores de cmc_1 e cmc_2 são definidos como os valores no eixo x do ponto de inflexão da sigmoide e o ponto de interseção entre as curvas $y_3 = f(x)$ e $y_2 = A_2$ respectivamente.

$$cmc_1 = x_0 \quad cmc_2 = x_0 + 2\Delta x. \quad (2.25)$$

O critério adotado por Aguiar e colaboradores para a escolha de cmc_1 ou cmc_2 como o valor da cmc é: se $x_0/\Delta x < 10$, o cmc_1 melhor representa a cmc . Agora se $x_0/\Delta x > 10$ o cmc_2 é o valor a ser escolhido. No apêndice A encontram-se as curvas de fluorescência e as sigmóides para todos os surfactantes estudados neste trabalho, tanto em água como em solução de p β CD, na presença e ausência de KCl.

2.3.5 Dispersão de Taylor

O coeficiente de difusão das partículas esféricas (D) pode ser calculado pela equação de Stoke – Einstein (2.12) realizando medidas de espalhamento dinâmico de luz. A dispersão de Taylor também possibilita determinar D usando um aparato experimental mais simples e barato. Ela foi, primeiramente, desenvolvida por Taylor em 1953 [42]. O experimento consiste em realizar um escoamento laminar em uma tubulação de seção circular e, em algum momento, injetar uma quantidade de soluto. O perfil de concentração do soluto ao longo da tubulação será distorcido pelo fluxo. Sendo $V(t)$ uma resposta qualquer de um detector sensível à concentração do soluto, após um certo intervalo de tempo o soluto dispersará formando um perfil aproximadamente gaussiano, seguindo a equação (2.26):

$$V(t) = A + Bt + V_{\text{máx}} \left(\frac{t_R}{t} \right)^{1/2} e^{-\frac{12D(t-t_R)^2}{r^2 t_R}}, \quad (2.26)$$

onde r é o raio interno do tubo, t_R é o tempo de retenção (tempo entre a injeção e o máximo da curva), A e B são parâmetros ajustáveis, t é a variável independente (tempo) e $V_{\text{máx}}$ é o máximo valor da resposta na curva de distribuição.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização da p β CD

As propriedades físico-químicas de polímeros de ciclodextrinas estão fortemente correlacionadas às condições de sua síntese [11] que, de forma geral, são obtidos pela condensação da β CD em meio básico usando a epiclôridrina (EP). O polímero usado neste trabalho foi sintetizado pelo Prof. Frederico Barros de Souza do Instituto de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI e gentilmente cedido, mais detalhe do processo de síntese pode ser encontrado na referência [29]. Este polímero apresenta uma porcentagem de 50% em massa de ciclodextrinas por cadeia da p β CD, determinada via ressonância magnética nuclear.

A determinação da massa molar de um polímero é de fundamental importância, pois permite determinar o número médio de unidades de ciclodextrina em cada cadeia da macromolécula ($n_{\beta CD}$). Dessa forma, pode-se correlacionar o número dessas unidades de ciclodextrina com a quantidade de monômeros de surfactante que interagem com a p β CD. A massa molar da p β CD foi determinada usando a técnica de espalhamento estático de luz, construindo um gráfico de Zimm, Figura 3-1.

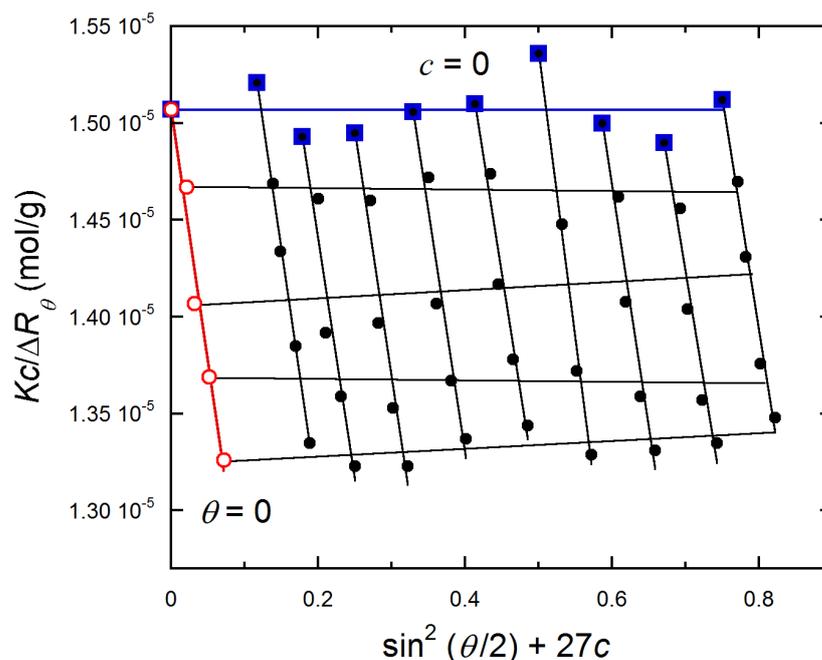


Figura 3-1 Gráfico de Zimm para a pβCD. A massa molar foi determinada extrapolando as curvas para $\theta \rightarrow 0$ (○) e $c \rightarrow 0$ (■) e ajustando as equações 2.6 e 2.7 respectivamente.

A tabela 3.1 apresenta os parâmetros de caracterização da pβCD obtidos do gráfico de Zimm. O raio hidrodinâmico da pβCD ($\approx 5\text{nm}$), que será mostrado posteriormente na Figura 3-6, é muito menor do que o comprimento de onda do laser (632,8 nm) usado no experimento. Desta maneira, não há dependência angular da intensidade, e o termo entre colchetes na equação 2.7 é aproximadamente igual a 1, não sendo possível a determinação do raio de giração das cadeias de pβCD.

Tabela 3.1: Caracterização da pβCD: massa molar (\bar{M}_w), 2º coeficiente do virial (A_2) e número de ciclodextrina por pβCD ($n_{\beta\text{CD}}$).

\bar{M}_w (g/mol)	A_2 (cm ³ mol/g ²)	$n_{\beta\text{CD}}$
67000 ± 1000	$(-3,5 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$29,5 \pm 0,4$

O número de $29,5 \pm 0,4$ ciclodextrinas por cadeia de pβCD, é o número de unidade de βCD presentes em cada cadeia do polímero, obtido dividindo 50% da massa molar do polímero pela massa molar da βCD. Considerando apenas o mecanismo de associação de 1:1, o número máximo de surfactantes

esperado por polímero é de 29,5. Já o A_2 negativo indica uma interação atrativa entre as macromoléculas. Comparando com os valores de A_2 obtidos por De Souza e colaboradores para soluções de β CD abaixo da concentração de agregação crítica ($A_2 = -9 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ mol/g}^2$) [43], verificamos que a polimerização das β CD tornou a interação consideravelmente mais atrativa sem, no entanto, levar à formação de agregados.

3.2 Formação dos Complexos $p\beta$ CD – surfactantes

Quando soluções de surfactante e $p\beta$ CD são preparadas, processos de agregação podem ocorrer, envolvendo a formação de complexos $p\beta$ CD – surfactante [15] [16]. Após a saturação dos monômeros do surfactante na cadeia da $p\beta$ CD, espera-se que micelas do surfactante sejam formadas em solução [15]. Conseqüentemente, a determinação da *cmc* dos surfactantes permite determinar a faixa de concentração do estudo. Além disso, a diferença entre os valores de *cmc* obtidas em solução de $p\beta$ CD e em água (Δcmc) fornece informações acerca do número de moléculas do surfactante que formam complexos com a $p\beta$ CD.

A *cmc* foi determinada medindo a condutividade específica da solução em diferentes concentrações do surfactante e ajustando a equação 2.23 às curvas da Figura 3-2.

A condutividade específica da solução está intrinsecamente relacionada à mobilidade das partículas carregadas. Quando da formação das micelas, uma parte dos surfactantes e contra íons se associam em estruturas micelares que possuem uma mobilidade menor do que os surfactantes e contra íons livres. Desta maneira, ocorre uma mudança de inclinação nas curvas de condutividade pela concentração do surfactante na região próxima à *cmc*. A Figura 3-2 ilustra as curvas de condutividade para os surfactantes (SDS, DTAB e SDBS) em água e em solução 0,5% m/V de $p\beta$ CD.

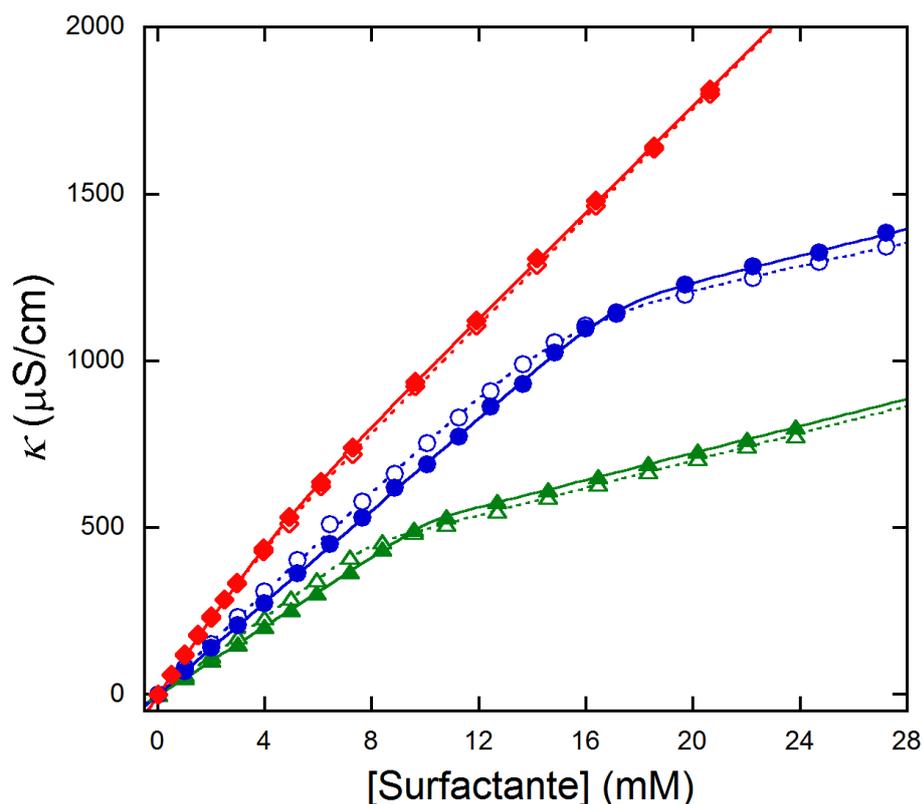


Figura 3-2: Curva de condutividades em diferentes concentrações dos surfactantes. SDS em água (\triangle), SDS em 0,5% m/V de p β CD (\blacktriangle), DTAB em água (\circ), DTAB em 0,5% m/V de p β CD (\bullet), SDBS em água (\diamond) e SDBS em 0,5% m/V de p β CD (\blacklozenge). As linhas contínua e pontilhada são o resultado do ajuste da equação 2.23.

A tabela 3.2 mostra os valores de *cmc* dos surfactantes em água e em solução de p β CD 0,5% m/V, determinados pelas medidas de condutividade. Os valores de Δcmc para os três surfactantes e a razão entre número de surfactantes por cadeia de p β CD ($n_{surf}/n_{p\beta CD}$) também são apresentados.

Tabela 3.2: *cmc* dos surfactantes em água e em solução 0,5% m/V de p β CD determinada das medidas de condutividade.

Surfactante	<i>cmc</i> (mM)			Δcmc	$n_{surf}/n_{p\beta CD}$
	H ₂ O	H ₂ O (literatura)	0,5 % m/V p β CD		
SDS	7,7 \pm 0,1	7,91 – 8,28*	10,4 \pm 0,3	2,7 \pm 0,4	36 \pm 6
DTAB	15,0 \pm 0,2	13,01 – 15,03*	17,1 \pm 0,2	2,1 \pm 0,4	28 \pm 6
SDBS	2 \pm 1	1,87**	4 \pm 1	2 \pm 1	27 \pm 13***

* resultados da referência [44].

** resultados da referência [45].

*** calculado considerando o valor da *cmc* da literatura.

Os valores de *cmc* em água apresentados na tabela 3.2 estão em bom acordo com os valores encontrados na literatura, exceto para o SDBS, onde a leve mudança na inclinação antes e depois da *cmc* tornou a medida imprecisa. Nesse caso foi utilizado o valor da *cmc* em água encontrado na literatura. O valor da *cmc* para a solução de p β CD depende da massa molar e do conteúdo de ciclodextrina da p β CD, sendo diferente para cada polímero. Os polímeros de ciclodextrina tem a capacidade de aumentar a *cmc* dos surfactantes, pois antes que as micelas sejam formadas, uma parte dos surfactantes é associado ao polímero formando um pseudo polieletrólito [15]. A Figura 3-3 ilustra as etapas de formação dos complexos p β CD – DTAB. Destacamos aqui a complexação dos surfactantes pela p β CD anterior à formação das micelas. As etapas ilustradas nessa figura serão discutidas na próxima seção, quando resultados das medidas do raio hidrodinâmico dos complexos em função da concentração do surfactante serão apresentados.

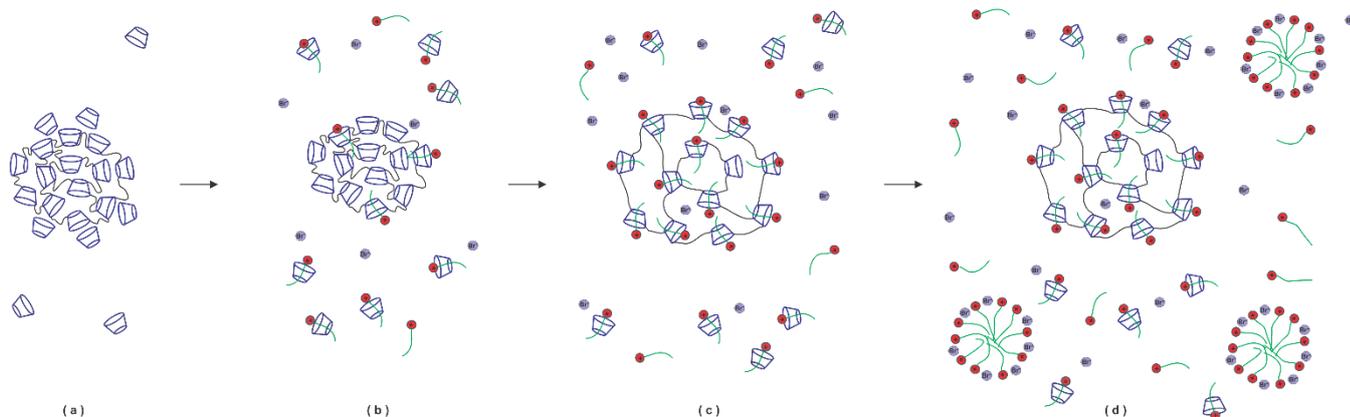


Figura 3-3: Ilustração das etapas de formação dos complexos de p β CD – DTAB, um comportamento semelhante é observado para os outros dois surfactantes.

Os valores de Δcmc permitem determinar o número máximo de moléculas de surfactante associadas para cada molécula do polímero, $n_{surt}/n_{p\beta CD}$, que para o SDBS e DTAB são próximos a $n_{\beta CD} = 29,5 \pm 0,4$. Já para o complexo SDS – p β CD encontramos que há 36 ± 6 moléculas do surfactante para cada cadeia do polímero. Deste modo, todas as ciclodextrinas disponíveis devem estar ocupadas por moléculas de DTAB e SDBS na condição de saturação da cadeia. Enquanto que para o SDS, além de todas as cavidades

estarem preenchidas, possivelmente algumas delas devem ter duas moléculas de surfactante. Junquera e colaboradores mostraram que a estequiometria dos complexos de DTAB com β CD ou hidroxipropil- β CD são 1:1 [25]. Já resultado da simulação por dinâmica molecular para a associação de SDS com β CD mostrou que há tanto complexos na estequiometria 1:1 quanto 1:2, isto é, uma molécula de β CD e duas moléculas de SDS [46]. Não foram encontradas referências para a estequiometria do SDBS com β CD.

Além da *cmc*, determinamos o grau de ionização dos complexos p β CD – surfactantes. Definimos essa variável como a razão das inclinações das retas em solução de 0,5% m/V de p β CD e em água antes da *cmc*. Já o grau de ionização das micelas tanto em água quanto em solução de p β CD foi obtido como parâmetro de ajuste da equação 2.23 aos dados da Figura 3-2. Os resultados estão apresentados na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Grau de ionização dos complexos p β CD – surfactante e das micelas em água e em solução 0,5% m/V de p β CD.

Surfactantes	p β CD	Micelas em H ₂ O	Micelas em p β CD
SDS	0,89 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01
DTAB	0,94 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01
SDBS	0,98 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,69 ± 0,02

As moléculas de surfactantes são forçadas a se concentrar junto a molécula do polímero. Mesmo assim, os contra íons não são atraídos fortemente para próximo do complexo p β CD – surfactante, como podemos ver pelos altos graus de ionização do complexo, maior do que 89% para todos os surfactantes, evidenciando que as moléculas do surfactante ao longo da p β CD não estão localizadas tão próximas umas das outras como em uma micela.

O maior grau de ionização dos complexos de p β CD com SDBS (~ 100%) pode também justificar o maior raio do complexo, após a saturação do polímero, como será mostrado na Figura 3-6. Em relação aos complexos com DTAB, encontramos que 6% da carga total do polímero, devido às moléculas de surfactante, estão associada aos íons Br⁻. Na literatura foi reportado uma interação de 1% de Br⁻ com os complexos de β CD – DTAB e

hidroxipropil – β CD (HP – β CD) – DTAB [25] O valor de 6%, maior que o encontrado em β CD, é razoável, pois para o polímero há $(29,5 \pm 0,4)$ ciclodextrinas por macromolécula, com potencial para serem ocupadas, e que devem gerar um potencial elétrico atrativo para o Br^- maior do que no caso dos complexos com ciclodextrinas livres. O menor grau de ionização dos complexos $p\beta$ CD – SDS em relação aos complexos com os outros dois surfactantes, conforme apresentado na tabela 3.3, pode ser um indício que há algumas cavidades com duas moléculas de SDS. Neste caso, uma concentração local maior de cargas levaria a uma adsorção de mais contra – íons para blindar a interação repulsiva entre as regiões hidrofílica de dois surfactantes na mesma cavidade do polímero.

O grau de ionização das micelas de SDS e DTAB está em bom acordo com a literatura [35]. Observamos que a presença do polímero não altera o grau de ionização das micelas, resultado similar ao reportado na literatura para ciclodextrinas livres. Por exemplo, o complexo β CD – SDS pouco influencia as micelas desse surfactante [24]. Bem como, o complexo formado entre a β CD e o brometo de dodeciletildimetil amônio não altera o grau de dissociação das micelas [47]. Não foram encontrados valores de referência para o grau de ionização das micelas de SDBS.

3.3 – Efeito dos surfactantes na estrutura da $p\beta$ CD

O espalhamento dinâmico permite determinar o coeficiente de autodifusão translacional das moléculas em solução pelo ajuste da função de auto correlação temporal da intensidade espalhada. Já o raio hidrodinâmico dos entes espalhadores é calculado a partir do coeficiente de difusão usando a equação de Stokes – Einstein. Essa técnica é muito usada em soluções de macromoléculas, pois estas envolvem partículas com massa molar elevada que espalham bastante luz, condição necessária nas medidas de espalhamento. As funções de auto correlação temporal do campo elétrico ao quadrado, $|g^{(1)}(\tau)|^2$, são apresentadas na Figura 3-4 em função da concentração dos surfactantes,

e na Figura 3-5 apresentamos as curvas de distribuição de tamanho do complexo $p\beta$ CD – SDS.

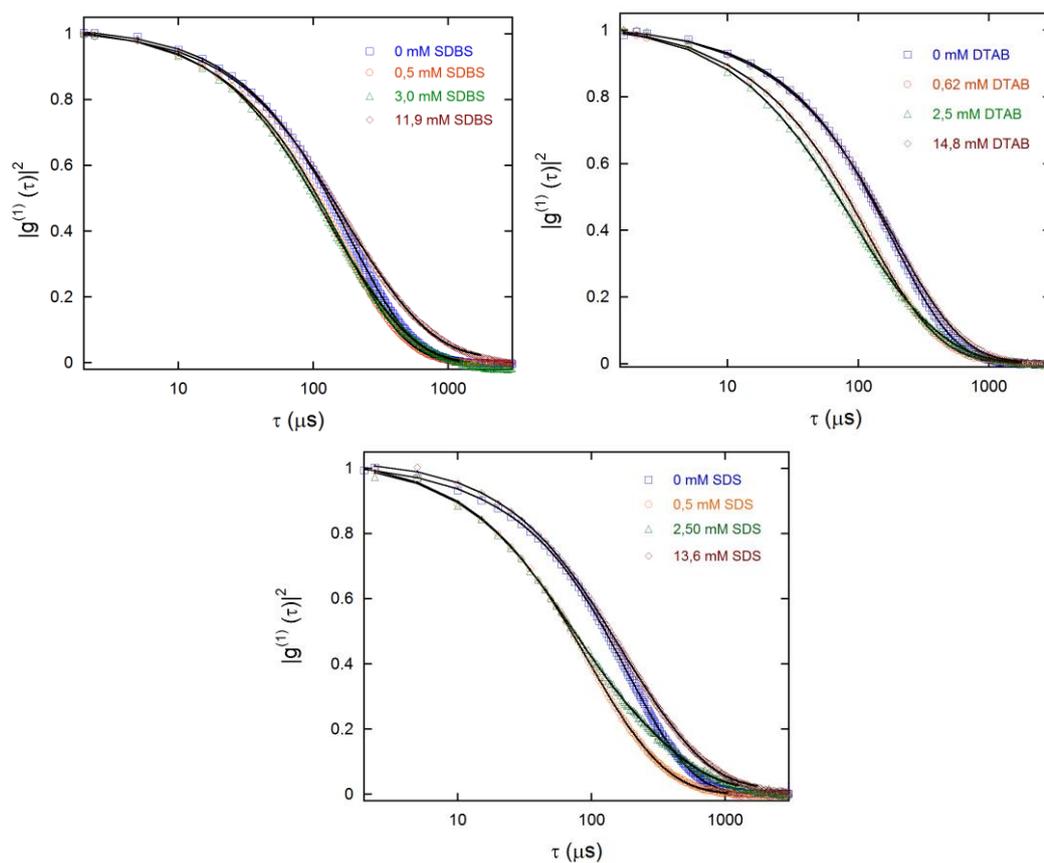


Figura 3-4: Curvas de auto correlação temporal do campo elétrico espalhado ao quadrado para os complexos $p\beta$ CD – surfactante em função da concentração de surfactante.

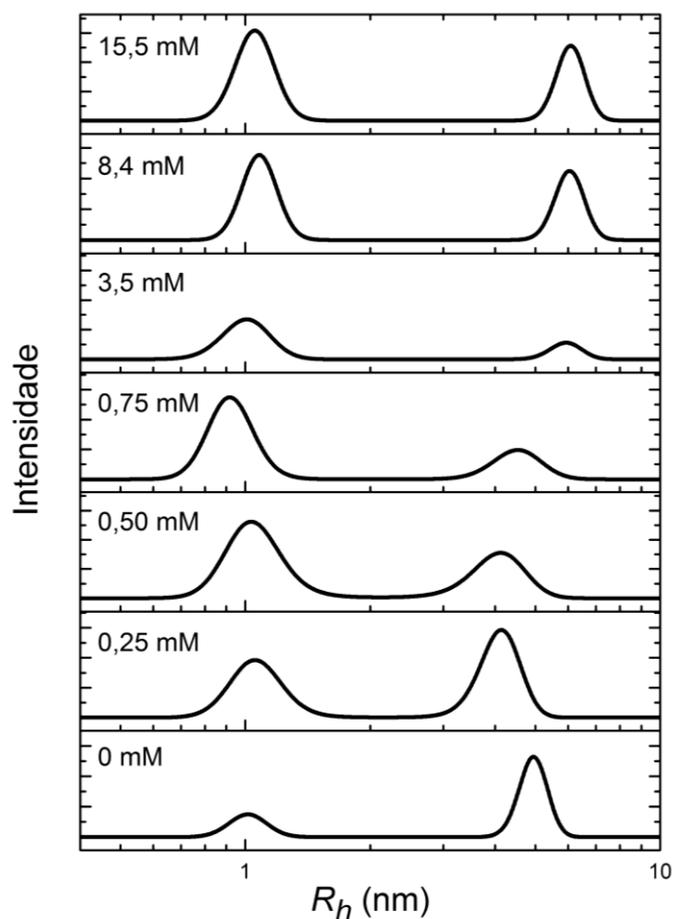


Figura 3-5: Curva de distribuição de tamanho para o complexo p β CD – SDS. Duas populações de partículas são observadas: uma em torno de 1 nm e outra em torno de 5 nm em todas as concentrações de SDS.

Na Figura 3-5 temos a distribuição de intensidade de tamanho que forneceu duas populações principais dependentes da [SDS]. Comportamento análogo foi observado para os outros surfactantes. A distribuição de intensidade pelo tamanho foi obtida pelo cálculo da transformada inversa de Laplace usando o método de máxima entropia [48]. Destas distribuições obtivemos os valores do raio hidrodinâmico dos complexos p β CD – surfactantes em função da concentração dos surfactantes. As curvas são mostradas na Figura 3-6.

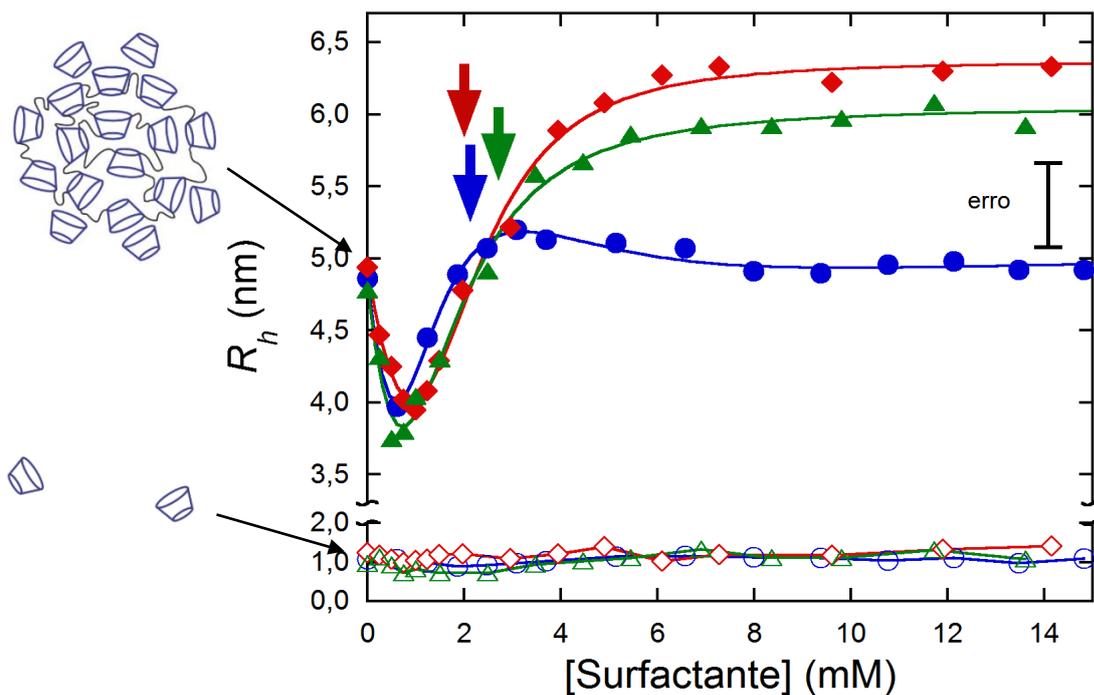


Figura 3-6: Raio hidrodinâmico das estruturas de p β CD – β CD em diferentes concentrações dos surfactantes: (●) DTAB, (◆) SDBS e (▲) SDS. Os símbolos vazados referem-se ao raio da ciclodextrinas livres e as setas representam a Δcmc obtidas da tabela 3.2.

Interessantemente, duas populações de partículas foram obtidas a partir dos dados de espalhamento de luz. Uma primeira população apresentou raio hidrodinâmico igual a 1 nm que foi independente da concentração de surfactante. Para a segunda população, o raio hidrodinâmico do polímero dependeu da concentração de surfactante, sendo que, quando a concentração do surfactante aumentou de 0 para 0,5 mM, o valor de R_h diminuiu de aproximadamente 4,8 nm para próximo de 4 nm, atingindo um valor mínimo. A partir desta concentração, o valor de R_h aumentou até atingir um valor constante que dependeu do tipo de surfactante, sugerindo a saturação da cadeia do polímero pelos monômeros de surfactante. A concentração na qual o valor de R_h tornou-se constante foi definida como concentração de estabilização (c_{est}) e o valor da ordenada nessa concentração foi definido como o raio de estabilização (R_{est})

A mudança da estrutura do surfactante afeta tanto o valor do raio hidrodinâmico máximo do polímero quanto a concentração de estabilização, que aumentaram na mesma ordem, isto é, $R_{est}^{DTAB} < R_{est}^{SDS} < R_{est}^{SDBS}$ e

$c_{\text{est}}^{\text{DTAB}} < c_{\text{est}}^{\text{SDS}} < c_{\text{est}}^{\text{SDBS}}$. A ordem no aumento desses dois parâmetros coincide com a ordem do aumento no valor de Δcmc observada na tabela 3.2, exceto para o SDBS onde esse valor está impreciso. Assim, sugerimos que os valores de R_{est} e c_{est} estão relacionados à concentração e ao grau de saturação da cadeia do polímero de p β CD pelos surfactantes.

Interessantemente, o valor de c_{est} é menor do que o valor da cmc do surfactante na presença do polímero. Por exemplo, para o DTAB, o valor de $c_{\text{est}}^{\text{DTAB}}$ é de aproximadamente 3 mM, enquanto que a cmc deste surfactante na presença de p β CD é de 17,1 mM. Esses resultados comprovam que a entrada do surfactante nas cavidades da p β CD acontece em baixas concentrações e que a adição do DTAB em concentrações superiores a 3 mM afeta pouco o raio da macromolécula, sugerindo que a saturação das cadeias da p β CD pelos monômeros do surfactante acontece previamente à formação das micelas.

Um interessante cálculo pode ser feito, comparando a energia eletrostática das cargas inseridas na p β CD com a energia térmica ($k_B T$). Apenas em distâncias nas quais a energia eletrostática superar a energia térmica os efeitos de repulsão das cargas presentes nos surfactantes podem ser considerados. Obviamente a energia elástica envolvendo as ramificações que compõem o polímero deve, também, ser superada pela energia eletrostática para haver uma deformação razoável da estrutura do polímero. Para pequenas deformações, consideramos que a variação da energia elástica em relação ao polímero sem cargas é muito menor que a energia térmica. Desta maneira, calculamos para o complexo p β CD – SDS a quantidade de surfactantes necessários para que a energia eletrostática seja da mesma ordem da energia térmica e encontramos que são necessárias 6 unidades de surfactantes em cada cadeia do polímero que equivale a uma concentração de 0,45 mM de surfactante, que é coerente com o resultado mostrado na Figura 3-6, que sugere que os efeitos de inchamento do polímero por repulsão eletrostática começam a ser observados para concentrações acima de cerca de 0,5 mM de surfactante. Os detalhes dos cálculos são apresentados no Apêndice B.

Nossos resultados mostram que, a partir de cerca de 0,5 mM de surfactante, o polímero tem o comportamento de um pseudo polieletrólito cuja carga é progressivamente elevada, isto é, um polímero cujo raio da cadeia em solução aumenta com a quantidade de carga. Essas cargas são devido ao surfactante associado à p β CD. Galant e colaboradores já haviam observado o comportamento de pseudo polieletrólito para associação de DTAC (estrutura química igual DTAB, exceto pela troca do contra-íon Br⁻ pelo Cl⁻) com a p β CD [15]. Nessa referência, no entanto, não foram feitas medidas direta dos raios em solução, mas medidas da dimensão fractal das estruturas em diferentes quantidades de surfactantes.

Para baixas concentrações de surfactante e, portanto, baixos valores de carga no polímero, é esperado que o raio do pseudo polieletrólito permanecesse constante, uma vez que não há cargas o suficiente para que a energia eletrostática supere a energia térmica. Surpreendentemente, os nossos resultados mostraram uma redução do raio hidrodinâmico para concentrações de surfactante abaixo até cerca de 0,5 mM, o que não foi observada na literatura [15].

Nossa hipótese é que a redução do raio está associada à presença de unidades de β CD monomérica na solução que inicialmente estão associadas ao polímero (R_h da β CD \approx 0,62 nm [49]). Quando as primeiras moléculas do surfactante são adicionadas na solução, elas preferencialmente interagem com as ciclodextrinas disponíveis [15]. A interação dos surfactantes com a estrutura p β CD – β CD expulsa as ciclodextrinas que não estão ligadas covalentemente, devido ao potencial eletrostático repulsivo criado pelas cabeças dos surfactantes. As etapas deste processo são ilustradas na

Figura 3-7.

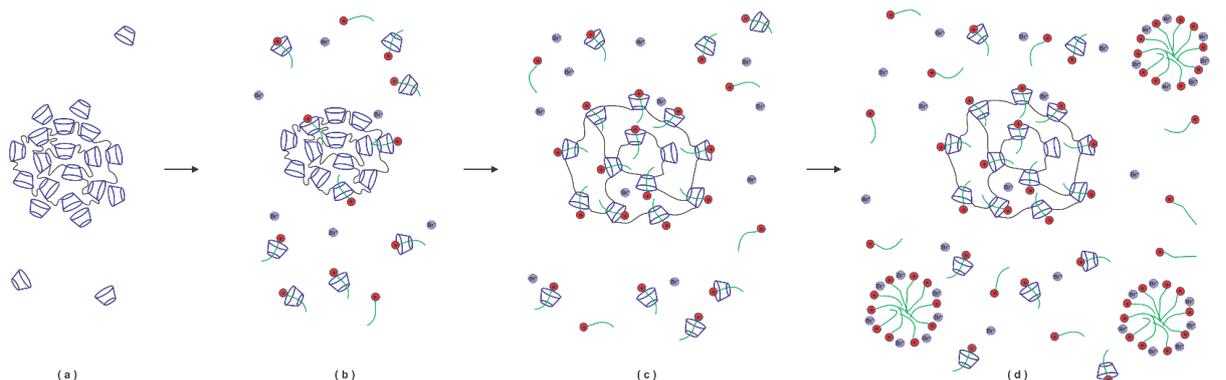


Figura 3-7: Etapas no processo de formação dos complexos p β CD – DTAB. (a) sem adição do surfactante, (b) concentração do surfactante equivalente ao ponto de mínimo na curva de raio da Figura 3-6, (c) concentração do surfactante entre o ponto de mínimo e a c_{est} e (d) após c_{est} .

Inicialmente destacamos na

Figura 3-7: (a) a existência de duas populações de partículas, mesmo sem a adição de surfactante. Nesta etapa, propomos que existem tanto ciclodextrinas ligadas covalentemente entre si formando a p β CD quanto ciclodextrinas que não estão ligadas por ligações químicas, mas que estão associadas ao polímero. Parte dessas ciclodextrinas não ligadas covalentemente ao polímero são liberadas em solução (b). A adição dos surfactantes promove a liberação de mais ciclodextrinas não-ligadas à p β CD, justificando a redução do R_h na Figura 3-6 para concentração de até 0,5 mM de surfactante. Quando o raio atinge o ponto de mínimo, que corresponde a cerca de 0,5 mM de surfactante na Figura 3-6, grande parte das ciclodextrinas já foram desprendidas, e (c) as novas moléculas de surfactantes que são adicionadas são direcionadas para a p β CD. Neste novo contexto, as moléculas do surfactante são forçadas a concentrarem próximas umas das outras e a interação repulsiva entre a parte hidrofílica dos surfactantes promove o aumento do raio dos complexos p β CD – DTAB até a saturação do polímero. (d) A partir desse ponto, as novas moléculas de surfactante são dispersas na solução e, em concentrações elevadas o suficiente, ocorre a formação das micelas, como ilustrada na

Figura 3-7.

O efeito da liberação de unidades de ciclodextrina para a solução também pode ser verificado pela análise das curvas de intensidade espalhada pela solução de p β CD na presença dos surfactantes. Para isso, a intensidade espalhada de cada solução foi calculada em suas duas contribuições: uma relativa ao complexo p β CD – surfactante ($I_{p\beta CD}$) e outra relativa ao complexo β CD – surfactante ($I_{\beta CD}$). Ambas as intensidades foram determinadas pelo produto da intensidade total pela área do pico de cada distribuição de tamanho (Figura 3-5). Os resultados estão apresentados na Figura 3-8.

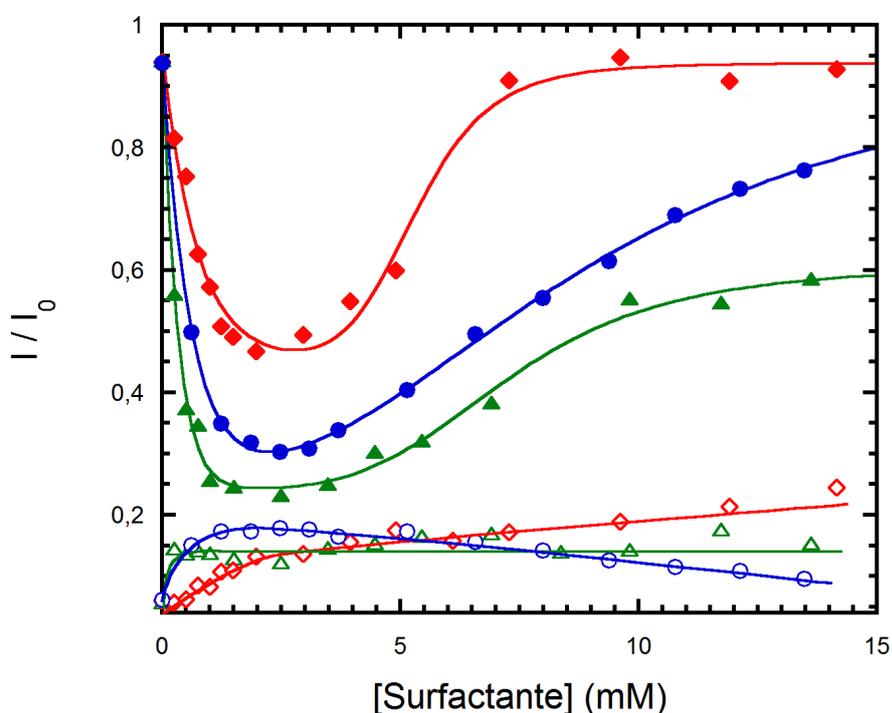


Figura 3-8: Intensidade espalhada pelos complexos de p β CD (símbolos preenchidos) e de ciclodextrinas livres (símbolos vazios) versus concentração de surfactante: (●, ○) DTAB, (◆, ◇) SDBS e (▲, △) SDS. As linhas contínuas são guias.

Pela Figura 3-8 vemos que a intensidade relativa à β CD isolada, $I_{\beta CD}$, aumenta para as primeiras adições do surfactante até cerca de 2 mM de surfactante. Esse aumento corrobora a nossa hipótese de que as β CD não-ligadas estão migrando do complexo p β CD – surfactante para a solução. A curva de $I_{p\beta CD}$ segue, aproximadamente, o perfil da curva do tamanho do

polímero de um modo não-trivial e não foram observadas tendências distintas para cada surfactante.

Para confirmar nossas hipóteses sobre a liberação de unidades de ciclodextrina não ligadas à cadeia do polímero durante o processo de interação com os monômeros dos surfactantes, os coeficientes de difusão dos complexos envolvidos nesse processo ($p\beta\text{CD}$ -Surfactante e βCD -Surfactante) foram determinados utilizando medidas de dispersão de Taylor apenas para o SDS. As curvas de dispersão de Taylor obtidas para amostras constituídas por 0,5% m/v de $p\beta\text{CD}$, 0,25% m/v de βCD + 2,5 mM de SDS e 0,5% m/v de $p\beta\text{CD}$ + 2,5 mM de SDS são mostradas na Figura 3-9. A concentração de 2,5 mM de SDS foi escolhida, pois todas as ciclodextrinas livres já estão desacopladas do complexo com a $p\beta\text{CD}$ nessa condição. As linhas contínuas em preto na Figura 3-9 são os resultados do ajuste das curvas segundo a equação 2.26. A soma das curvas resultantes dos dois ajustes foi comparada com os dados experimentais do complexo $p\beta\text{CD}$ + SDS, (linha vermelha na Figura 3-9) tendo uma excelente concordância com os valores obtidos experimentalmente.

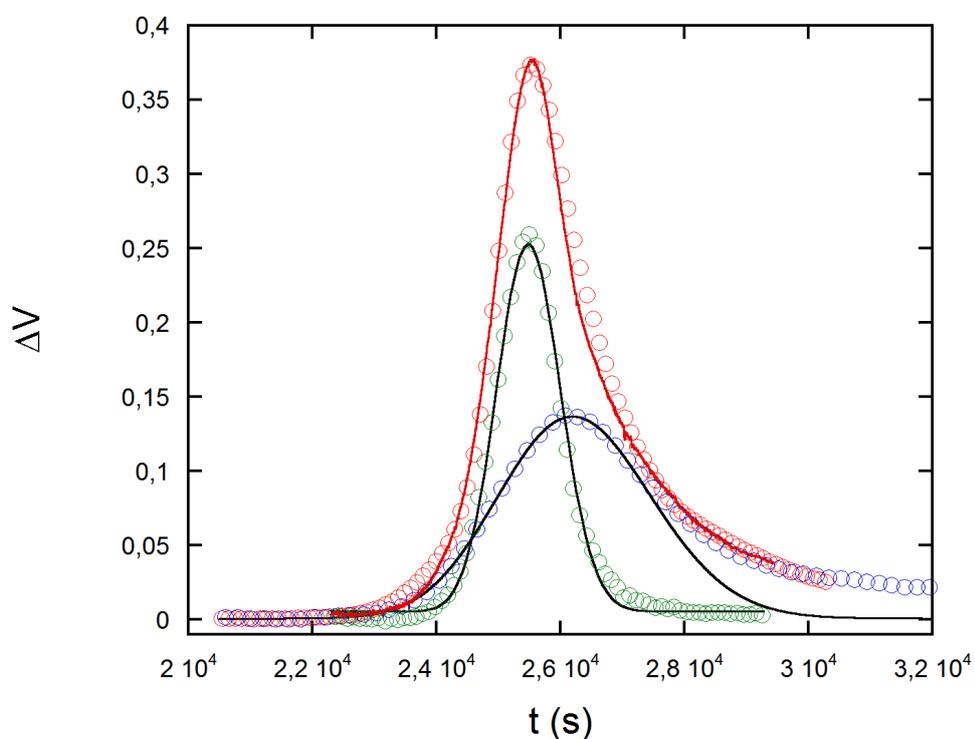


Figura 3-9: Curvas de dispersão de Taylor das soluções: 0,5% m/V de $p\beta\text{CD}$ (\circ), 0,25% m/V de βCD + 2,5 mM de SDS (\circ), 0,5% m/V de $p\beta\text{CD}$ + 2,5 mM de SDS (\circ).

Os valores dos raios hidrodinâmicos obtidos a partir dos coeficientes de difusão pelo método de Taylor foram de $(3,8 \pm 0,1)$ nm para os agregados p β CD – β CD na ausência de surfactante e de $(0,61 \pm 0,05)$ nm para a β CD na presença do SDS, valores inferiores àqueles determinados através das medidas de espalhamento de luz (Figura 3-6), mas mostra, também, a presença de duas populações de estruturas dispersas em solução. Como podemos observar, a curva contínua em vermelho se ajusta bem à curva experimental obtida para a solução de 0,5% m/v de p β CD + 2,5 mM de SDS, mostrando que aquelas duas populações de partículas (complexos β CD-SDS e macromoléculas de p β CD) estão presentes nesta solução. Conseqüentemente, a presença do surfactante é responsável pelo desacoplamento das unidades de ciclodextrina da cadeia do polímero de p β CD que leva à redução do raio hidrodinâmico do mesmo.

As medidas de potencial zeta forneceram evidências da formação dos complexos p β CD – surfactantes, e ajudaram na interpretação das curvas de raio hidrodinâmico obtidas na Figura 3-6. O potencial zeta foi medido em diferentes concentrações dos surfactantes. Como esperado, foi observado um valor positivo para o complexo p β CD – DTAB e valores negativos para os complexos p β CD – surfactantes aniônicos (Figura 3-10).

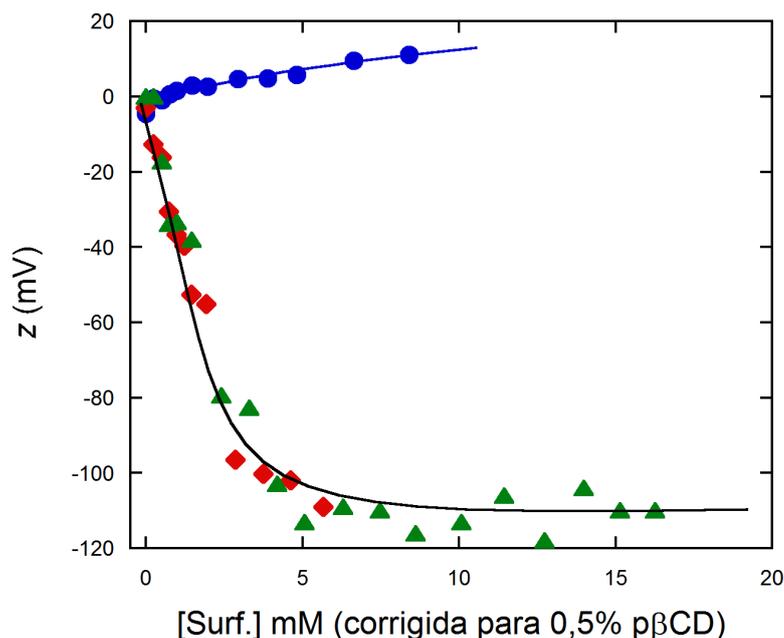


Figura 3-10: Curva de potencial zeta para os complexos de p β CD – surfactante: (●) DTAB, (◆) SDBS e (▲) SDS.

Para os surfactantes aniônicos, o potencial zeta na superfície do complexo de p β CD diminui com o aumento da concentração de surfactante, estabilizando-se para uma concentração de 5 mM. Esse resultado está de acordo com as medidas de raio hidrodinâmico mostrados na Figura 3-6, em que o processo de inserção dos surfactantes aniônicos ocorre para concentrações abaixo de 5 mM, faixa de concentração onde há as variações significativas do raio hidrodinâmico. Por outro lado os resultados mostram que não há diferença significativa entre os valores de potencial zeta para os complexos com ambos os surfactantes aniônicos, que justifique a diferença dos raios hidrodinâmicos que foi observada nos complexos com SDS e SDBS, supondo que a diferença dos raios é devido à repulsão eletrostática das moléculas associadas dos surfactantes. No entanto, os complexos envolvendo o SDS têm um grau de ionização menor que do SDBS (0,89 no primeiro e 0,98 no último), o que poderia indicar uma pequena blindagem eletrostática pelos contra-íons no complexo p β CD – SDS, tendo como efeito um menor aumento do raio hidrodinâmico em altas concentrações do surfactante.

Para os complexos de p β CD com DTAB, os valores de potencial zeta medidos são menores em módulo do que aqueles com os surfactantes aniônicos. Esse resultado indica uma menor repulsão entre monômeros de DTAB ligados na cadeia do polímero, o que pode justificar a diferença de raio observada na Figura 3-6, onde o $R_{\text{est}}^{\text{DTAB}}$ é menor do que os $R_{\text{est}}^{\text{SDS}}$ e $R_{\text{est}}^{\text{SDBS}}$. Não foi possível medir o potencial zeta para altas concentrações do DTAB, por que, na presença de Br⁻, há oxidação do eletrodo da célula [50].

3.4 Termodinâmica de Formação dos Complexos

Os resultados que temos demonstrado até agora têm sugerido que durante o processo de interação do surfactante com a p β CD, unidades de ciclodextrina não ligadas à cadeia do polímero são inicialmente liberadas para o seio da solução, resultando em uma diminuição do raio hidrodinâmico do polímero. Posteriormente, com a interação p β CD – surfactante, o raio hidrodinâmico da macromolécula aumenta, como resultado da repulsão eletrostática entre os grupos carregados do surfactante que estão complexados na cadeia do polímero. A fim de determinar os parâmetros termodinâmicos de interação da inclusão dos monômeros de surfactante nas unidades de ciclodextrina, experimentos de microcalorimetria de titulação isotérmica (μ -ITC) foram realizados, comparando os efeitos da adição do surfactante em água e em solução 0,5% m/V da p β CD (Figura 3-11).

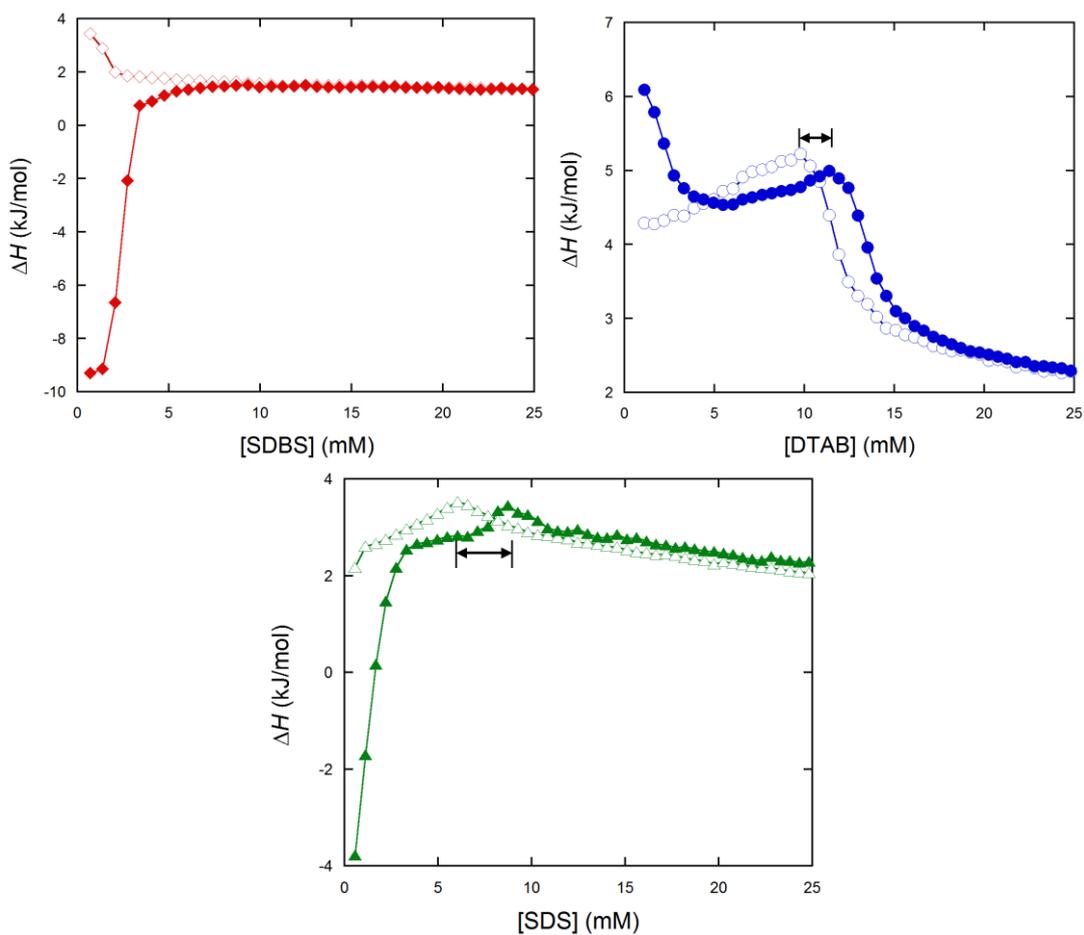


Figura 3-11: Curvas calorimétricas para a titulação dos surfactantes em água (símbolos vazados) e em solução 0,5% m/V de p β CD (símbolos preenchidos). As setas duplas nos gráficos do DTAB e SDS correspondem às diferenças de concentração Δc_{cmc} apresentadas na Tabela 3.3.

Os experimentos de titulação calorimétrica foram realizados na mesma faixa de concentração dos surfactantes que aquela avaliada nas curvas de raio hidrodinâmico, a fim de evidenciarmos os processos termodinâmicos envolvidos e comparar com a informação obtida pela variação do raio. A Figura 3-11 refere-se à entalpia de interação, observada no experimento de titulação dos surfactantes em água e em solução de 0,5% m/V de p β CD. Desta figura, destacamos que tanto para o DTAB quanto para o SDS, o perfil das curvas de titulação do surfactante em água foi deslocado para maiores concentrações dos surfactantes na presença do polímero. Evidenciando o fenômeno no qual as moléculas de surfactante são preferencialmente associadas ao polímero para, após a saturação no polímero, seguir o processo de micelização em solução. A semelhança da forma das curvas de variação da entalpia após as

primeiras titulações em água e em solução de p β CD sugere que o polímero não afeta o processo de formação de micelas de surfactantes. Todo esse comportamento não está claramente exposto nas curvas do SDBS, o que deve estar relacionado à superposição dos processos de micelização e complexação.

Como podemos observar, os valores de ΔH são diferentes para a curva de adição de surfactante em água e em solução do polímero em concentrações muito baixas (primeiras 5 a 10 injeções), confirmando que a interação com o polímero ocorre já nos primeiros pontos da curva de titulação. Desta maneira, a fim de obtermos os parâmetros termodinâmicos de formação dos complexos polímero-surfactante, repetimos os experimentos de titulação calorimétrica em baixas concentrações dos surfactantes, para evitarmos os efeitos de micelização dos surfactantes e assim obtermos a entalpia aparente de interação (ΔH_{ap-int}).

A Figura 3-12 mostra o ΔH_{ap-int} dos surfactantes com β CD e p β CD. A interação ocorre com a liberação de energia para os três surfactantes em β CD e para os surfactantes aniônicos em p β CD, contudo a interação do DTAB com p β CD é endotérmica.

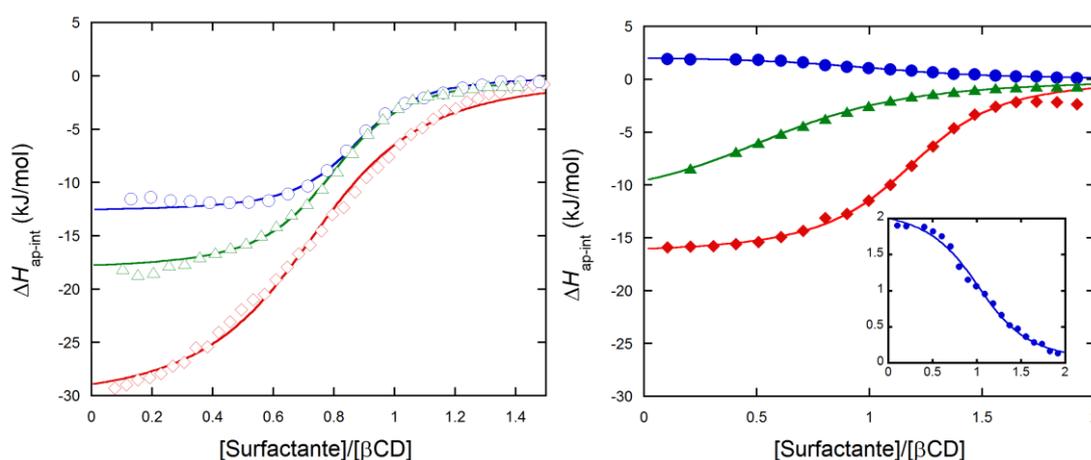


Figura 3-12: Entalpia aparente de interação para a titulação dos surfactantes SDBS (\diamond), DTAB (\circ), SDS (\triangle) em soluções de β CD com diferentes concentrações (à esquerda) e SDBS (\diamond), DTAB (\bullet), SDS (\blacktriangle) em solução 0,5% m/V de p β CD (à direita). No detalhe: a entalpia aparente de interação para o DTAB. Os valores de concentração dos surfactantes foram normalizados pela concentração total de ciclodextrina. As curvas contínuas mostram os ajustes para o modelo de sítios únicos independentes.

Alguns efeitos interessantes devem ser notados na Figura 3-12. Por exemplo, a redução do módulo ΔH_{ap-int} , quando as ciclodextrinas estão polimerizadas em relação às ciclodextrinas livres, ou seja, a complexação dos surfactantes nas ciclodextrinas polimerizadas é menos exotérmica que nas ciclodextrinas livres. Algumas hipóteses foram propostas para explicar a redução do módulo de ΔH_{ap-int} . A primeira foi que a repulsão eletrostática entre as cabeças dos surfactantes, que são forçadas a ficarem mais próximas entre si quando complexadas na p β CD, era a responsável por reduzir o valor ΔH_{ap-int} . Essa hipótese foi prontamente descartada, pois a inserção das primeiras moléculas de surfactante na cadeia da p β CD, não deveria ser afetada pela repulsão eletrostática e, desta forma, espera-se que o ΔH_{ap-int} deva convergir para o mesmo valor da interação β CD – surfactante para concentrações muito baixas de surfactante. A nossa segunda hipótese é que a entalpia aparente de interação é afetada pela polimerização das ciclodextrinas, ou modificando a cavidade, ou modificando o meio sobre o qual os surfactantes estão inseridos.

Para entendermos o processo de interação dos surfactantes com a p β CD é preciso que compreendamos a interação dos surfactantes com a β CD. Algumas conclusões podem ser obtidas da literatura. Por exemplo, sabe-se que a entrada de SDS e DTAB nas cavidades da β CD, ocorre com liberação de energia [20]. Os dois principais termos exotérmicos são: a liberação de moléculas de água de alta energia do interior das cavidades e a interação de Van der Waals entre surfactante e a β CD [1] [20] [21] [22]. Benko e colaboradores estudaram a complexação de β CD com uma série de surfactantes com mesma parte hidrofóbica, mas diferentes regiões hidrofílicas. Neste estudo, eles observaram que a região hidrofílica não afeta a energia livre de Gibbs de complexação devido à compensação entálpico-entrópica e verificaram, também, que o principal termo no processo de complexação é o efeito hidrofóbico [20].

Não encontramos na literatura trabalhos que estudaram a termodinâmica de formação de p β CD com surfactantes. Alguns trabalhos com hidroxpropil- β CD (HP – β CD) e sais de bile forneceram importantes conclusões

que serão apresentadas nesse parágrafo e ajudaram a compreender a termodinâmica de formação dos complexos $p\beta\text{CD}$ – surfactantes. Recentemente, Söchnbeck e colaboradores mostraram que sais de bile formam complexos menos estáveis com HP – βCD do que com a βCD [51] [52]. Além disso, verificaram que o aumento no número de grupos HP na ciclodextrina aumenta a entropia e entalpia de complexação, ou seja, a complexação torna-se menos exotérmica [51] [52]. O aumento de entalpia foi associado a efeitos estéricos, promovidos pela presença do HP que dificulta a entrada dos sais de bile na βCD e também altera a rigidez das cavidades, reduzindo a otimização de encaixe do hóspede no hospedeiro. Já o aumento de entropia foi associado à extensão da cavidade hidrofóbica promovida pelos grupos HP, em que a inserção dos sais de bile é precedida pela liberação das moléculas de água da cavidade e dos grupos HP. Foi observada para esse fenômeno a compensação entálpico – entrópica, de forma que a energia livre de Gibbs aumenta apenas levemente. Da mesma forma, o efeito da polimerização das ciclodextrinas na termodinâmica de complexação observado neste trabalho é de tornar a entalpia de interação menos exotérmica e também aumentar a entropia (resultados apresentados mais adiante, na tabela 3.4), quando comparada com o mesmo processo para a ciclodextrina livre.

Os parâmetros termodinâmicos para a formação dos complexos βCD – surfactantes e $p\beta\text{CD}$ – surfactantes foram obtidos através do ajuste das curvas da Figura 3-12 pelo modelo de sítios únicos e independentes. Para a $p\beta\text{CD}$ os ajustes foram feitos em termos da concentração de $p\beta\text{CD}$ e não a concentração de βCD . Desta maneira, o valor de n obtido do ajuste do modelo fornece o número de sítios ativos por cadeia ou o número de moléculas dos surfactantes que interagem com cada cadeia da $p\beta\text{CD}$. Já os valores n para a formação dos complexos com βCD são próximos de 0,8 para os surfactantes aniônicos e próximos de 0,9 para o DTAB e que, portanto, sugerem a existência de mecanismos múltiplos de associação entre βCD – surfactante. Os resultados são apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4 Parâmetros termodinâmicos para a interação β CD – surfactantes. n é a estequiometria da reação, K a constante de ligação, ΔH° a entalpia padrão de interação, $T\Delta S^\circ$ o termo entrópico e ΔG° a variação da energia livre de Gibbs padrão.

	β CD				
Surfactante	n	K (M^{-1})	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
SDS	$0,81 \pm 0,01$	15100 ± 900	$-18,2 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,4$	$-23,8 \pm 0,2$
DTAB	$0,87 \pm 0,01$	17000 ± 2000	$-12,7 \pm 0,2$	$11,4 \pm 0,4$	$-24,1 \pm 0,2$
SDBS	$0,78 \pm 0,01$	46000 ± 3000	$-30,9 \pm 0,4$	$-4,3 \pm 0,6$	$-26,6 \pm 0,2$
	$p\beta$ CD				
	n	K (M^{-1})	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
SDS	$20,5 \pm 0,5$	2200 ± 100	$-12,1 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,4$	$-19,1 \pm 0,1$
DTAB	$34,2 \pm 0,6$	4000 ± 500	$2,2 \pm 0,1$	$22,8 \pm 0,4$	$-20,6 \pm 0,3$
SDBS	$38,1 \pm 0,2$	9500 ± 500	$-16,5 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,2$	$-22,7 \pm 0,1$

Os resultados apresentados tabela 3.4 serão discutidos em partes. Vamos começar com a interação dos surfactantes e a β CD. Temos que o ΔH° depende da natureza do surfactante e segue a seguinte ordem (do mais exotérmico para o menos exotérmico): SDBS < SDS < DTAB. Assim, comparando os surfactantes aniônicos, em que a diferença na estrutura química é a presença de um átomo de oxigênio (no caso do SDS) ou de um anel benzênico (no caso do SDBS) entre a cabeça polar e a cauda apolar, verificamos um aumento na interação com a cavidade da β CD para o SDBS que possui o anel benzênico em sua estrutura. As moléculas de água possivelmente são todas liberadas da cavidade da β CD na presença dos três surfactantes, não sendo, portanto, as responsáveis pela diferença no ΔH° para os complexos de inclusão dos três surfactantes. Neste contexto, Nilsson e colaboradores discutiram que a inserção de moléculas com oito grupos CH_2 já são suficientes para que todas as moléculas de água sejam liberadas das cavidades tanto da α CD quanto da β CD [53]. Os resultados mostram que o ΔG° é apenas levemente alterado na complexação com os diferentes surfactantes devido ao efeito de compensação entálpico – entrópica, observada tanto para a interação dos surfactantes com a β CD quanto com a $p\beta$ CD. A Figura 3-13 ilustra este efeito de compensação.

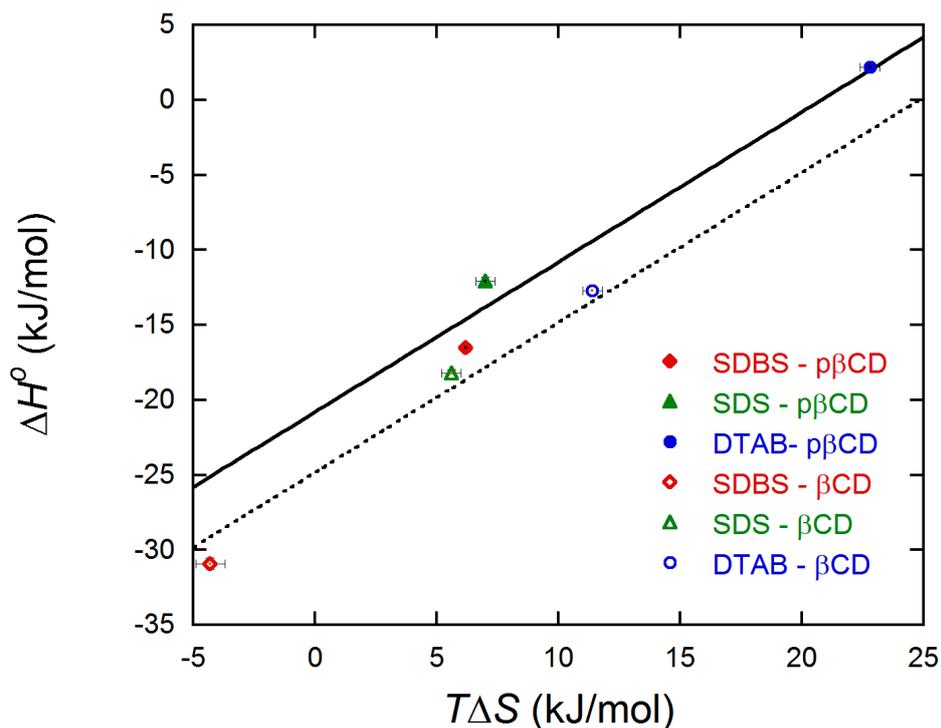


Figura 3-13: Gráfico de compensação entálpico-entrópica para a formação dos complexos da β CD com os três surfactantes (símbolos vazados) e a complexação dos surfactantes com a p β CD (símbolos preenchidos). As linhas (contínua e tracejada) mostram o comportamento esperado para ΔG° constante.

Na Figura 3-13 temos o gráfico de compensação entálpico – entrópica para a interação dos surfactantes com a β CD e p β CD. Os dados foram ajustados por uma relação linear de inclinação igual a um. O coeficiente linear mostra o valor de ΔG° e foram $(-24,8 \pm 0,9)$ kJ/mol e (-21 ± 1) kJ/mol para os complexos de β CD e p β CD com os surfactantes, respectivamente. Esses valores correspondem, também, à média dos valores da energia livre de Gibbs padrão determinado na tabela 3.4 para os três surfactantes.

O processo de complexação dos surfactantes com a p β CD é menos favorável do que com a β CD. Isso pode ser visto, comparando na tabela 3.4 as respectivas ΔG° entre os processos. A redução da estabilidade do complexo do surfactante com a p β CD deve-se ao termo entálpico cada vez menos exotérmico. A p β CD, assim como a HP – β CD, tem grupos substituídos nas regiões próximas à cavidade. Como discutido para a complexação de sais de bile com a HP – β CD, o aumento da entalpia ocorre devido, principalmente, a dois fatores: a repulsão estérica que dificulta entrada das moléculas dos

surfactantes nas cavidades e a redução da otimização de encaixe entre hóspede e hospedeiro que reduz as interações de van der Waals [51] [52]. As mesmas conclusões da interação entre HP – β CD e sais de bile, parecem pertinentes para explicar a redução da estabilidade dos complexos de $p\beta$ CD – surfactantes.

Os valores de n encontrados para a interação β CD – surfactantes na tabela 3.4 indicam a existência de equilíbrios múltiplos. Deste modo, mecanismos de associação de 2:1 (2 moléculas de β CD e uma molécula de surfactante) e 1:1 devem coexistir em solução. Equilíbrios múltiplos foram observados para a associação de β CD com fármacos [43] [54] [55] [56]. Já Brocos e colaboradores mostraram através de simulação por dinâmica molecular, que a estequiometria 2:1 (β CD /SDS) é possível e estável [46].

Os valores encontrados para o complexo $p\beta$ CD – surfactantes deveriam ser próximos ao número de ciclodextrinas disponíveis por polímero, isto é, $n_{\beta\text{CD}} = 29,5 \pm 0,4$. Apesar dos resultados para n não concordarem (20,5 para o SDS, 34,2 para o DTAB e 38,1 para o SDBS), os valores estão na mesma ordem de grandeza do valor esperado. Para o complexo $p\beta$ CD – SDS, acreditamos que essa diferença está associada ao baixo valor de K o que torna a determinação de n imprecisa para as condições experimentais adotadas.

3.5 Efeito de Força Iônica

A mudança da força iônica da solução permite determinar o papel das interações eletrostáticas na formação dos complexos $p\beta$ CD – surfactantes. Desta maneira, preparamos soluções do polímero e dos surfactantes em 5 mM de KCl e para o DTAB também foram preparadas soluções em 15 mM de KCl.

As curvas de condutividade (Figura 3-14) foram obtidas em solução com 5 mM de KCl e usadas na determinação da cmc dos surfactantes, no grau de ionização dos complexos e das micelas. Novamente, podemos notar que as curvas de condutividade para o experimento com o SDBS apresenta apenas

uma leve mudança de inclinação, próximo à região da *cmc*, o que dificulta uma determinação precisa desta propriedade termodinâmica.

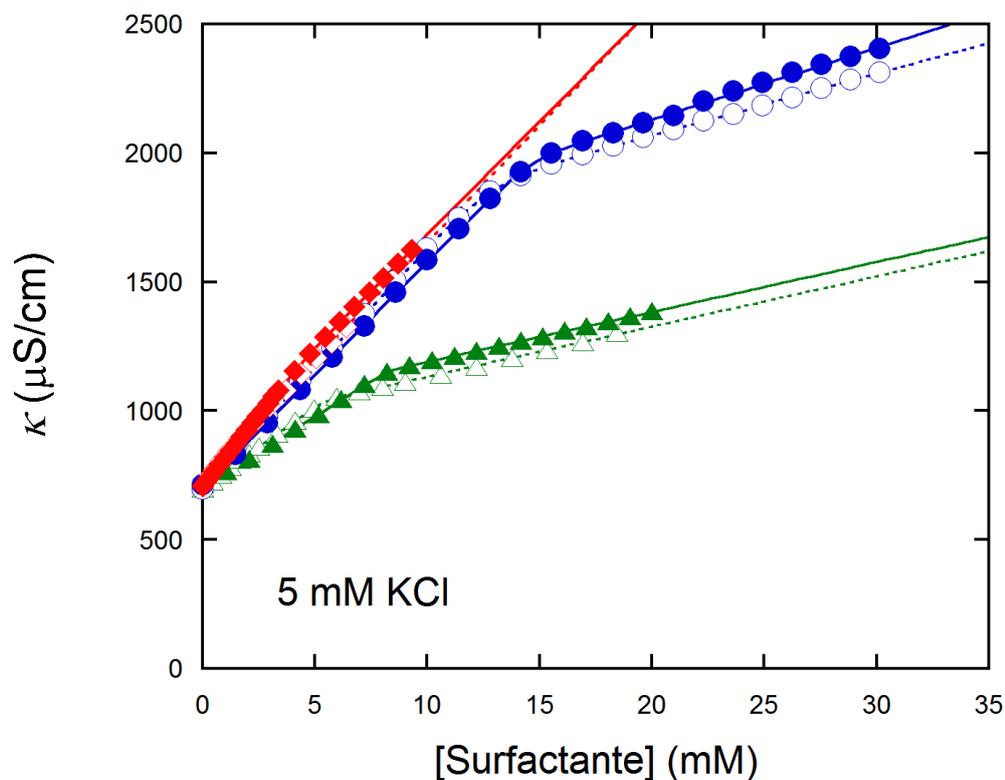


Figura 3-14: Condutividade específica com a adição de 5 mM de KCl. SDS em água (Δ) e SDS em 0,5% m/V de p β CD (\blacktriangle). DTAB em água (\circ), DTAB em 0,5% m/V de p β CD (\bullet), SDBS em água (\diamond) e SDBS em 0,5% m/V de p β CD (\blacklozenge). As linhas contínuas e tracejadas referem-se ao ajuste da equação 2.23 aos dados experimentais.

As curvas de condutividade da Figura 3-14 apresentaram comportamento análogo aos das soluções em água (0 mM de KCl), mas foram deslocadas ao longo do eixo das ordenadas em 700 μ S/cm. Esse deslocamento se deve a presença de íons livres na solução. A *cmc* foi obtida ajustando a equação 2.23 às curvas da Figura 3-14 e seus valores são apresentados na tabela 3.5.

Tabela 3.5: *cmc* dos surfactantes em água e em solução 0,5% m/V de p β CD com 5 mM KCl. Comparação da Δcmc para os três surfactantes em 0 e 5 mM de KCl e a razão do número de surfactantes por p β CD.

Surfactante	Água + 5 mM KCl (mM)	0,5 % m/V p β CD + 5 mM KCl (mM)	Δcmc (5 mM KCl) (mM)	$n_{surf}/n_{p\beta CD}$ (5 mM KCl)	Δcmc (0 mM KCl) (mM)
SDS	5,4 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1	2,9 \pm 0,2	38 \pm 3	2,7 \pm 0,4
DTAB	12,8 \pm 0,1	14,6 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	24 \pm 3	2,1 \pm 0,4
SDBS	1,1 \pm 0,5	4 \pm 2	3 \pm 2	40 \pm 27	2 \pm 1

Para a melhor visualização dos resultados, os valores de *cmc* foram esboçados em forma de gráfico e comparados com os valores obtidos sem a presença do sal, e são apresentados na Figura 3-15.

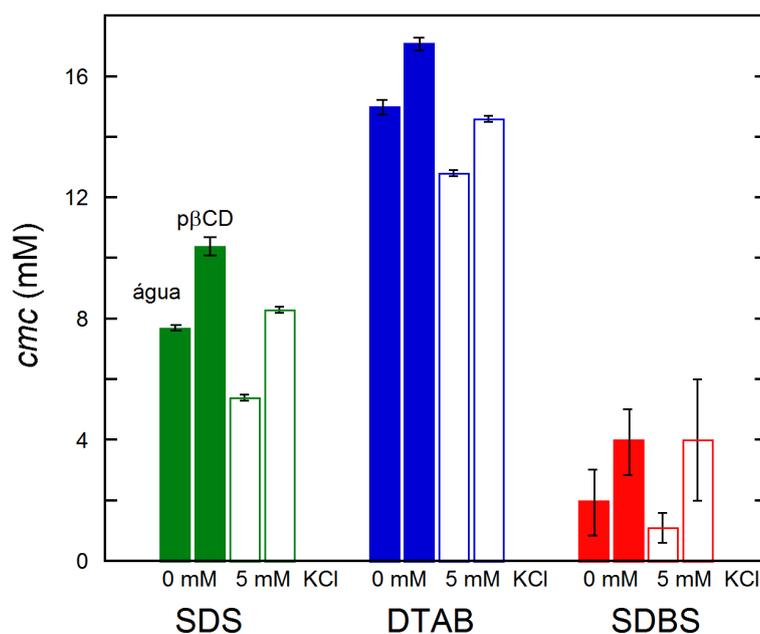


Figura 3-15 *cmc* dos surfactantes em água ou solução 0,5% m/V de p β CD com 0 ou 5 mM de KCl. As barras preenchidas referem-se à *cmc* em 0 mM e as barras vazadas em 5 mM de KCl.

Os valores de *cmc* de todos os sistemas reduziram com a adição do KCl, resultado já esperado e encontrado na literatura [15] e causado pela blindagem parcial da repulsão eletrostática das cabeças dos surfactantes pelos íons, contribuindo para a formação de micelas. Mas, interessante, a

presença do sal não alterou a Δcmc que se manteve dentro da barra de erro. Deste modo, notamos que a presença do sal não afeta o número de cavidades das ciclodextrinas acessíveis aos surfactantes. Nossa hipótese é que a repulsão eletrostática criada pela entrada das primeiras moléculas de surfactantes no complexo, não é um fator impeditivo para entrada de novas moléculas, caso contrário a presença de íons adicionais em solução alteraria o número de moléculas por cadeia. Os resultados de DLS e ITC que serão apresentadas posteriormente corroboram essa hipótese

O grau de ionização dos complexos e o grau de ionização das micelas em água e em solução 0,5% m/V de p β CD, todos com 5 mM de KCl, foram determinados pelas medidas de condutividade, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente nas medidas sem KCl. Os resultados são mostrados na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Grau de ionização dos complexos e das micelas em água e em solução 0,5% m/V de p β CD com 0 ou 5 mM de KCl.

Conc. KCl	p β CD		Micelas em H ₂ O		Micelas em p β CD	
	5 mM	0 mM	5 mM	0 mM	5 mM	0 mM
SDS	0,86±0,02	0,89 ± 0,01	0,31±0,01	0,35 ± 0,01	0,31±0,01	0,35 ± 0,01
DTAB	0,95±0,01	0,94 ± 0,01	0,26±0,01	0,26 ± 0,01	0,30±0,01	0,27 ± 0,01
SDBS	0,94±0,02	0,98 ± 0,02	0,81±0,01	0,69 ± 0,02	0,94±0,01	0,69 ± 0,02

O grau de ionização desses complexos pouco mudaram com KCl. Foram observadas variações significativas somente no grau de ionização das micelas de SDBS.

O raio hidrodinâmico fornece uma medida direta do tamanho dos complexos p β CD – surfactante, que depende da interação entre os surfactantes adsorvidos no polímero. A Figura 3-16 mostra os gráficos do raio hidrodinâmico dos complexos em 0 e 5 mM de KCl. Para o DTAB também foram feitas medidas em 15 mM de KCl.

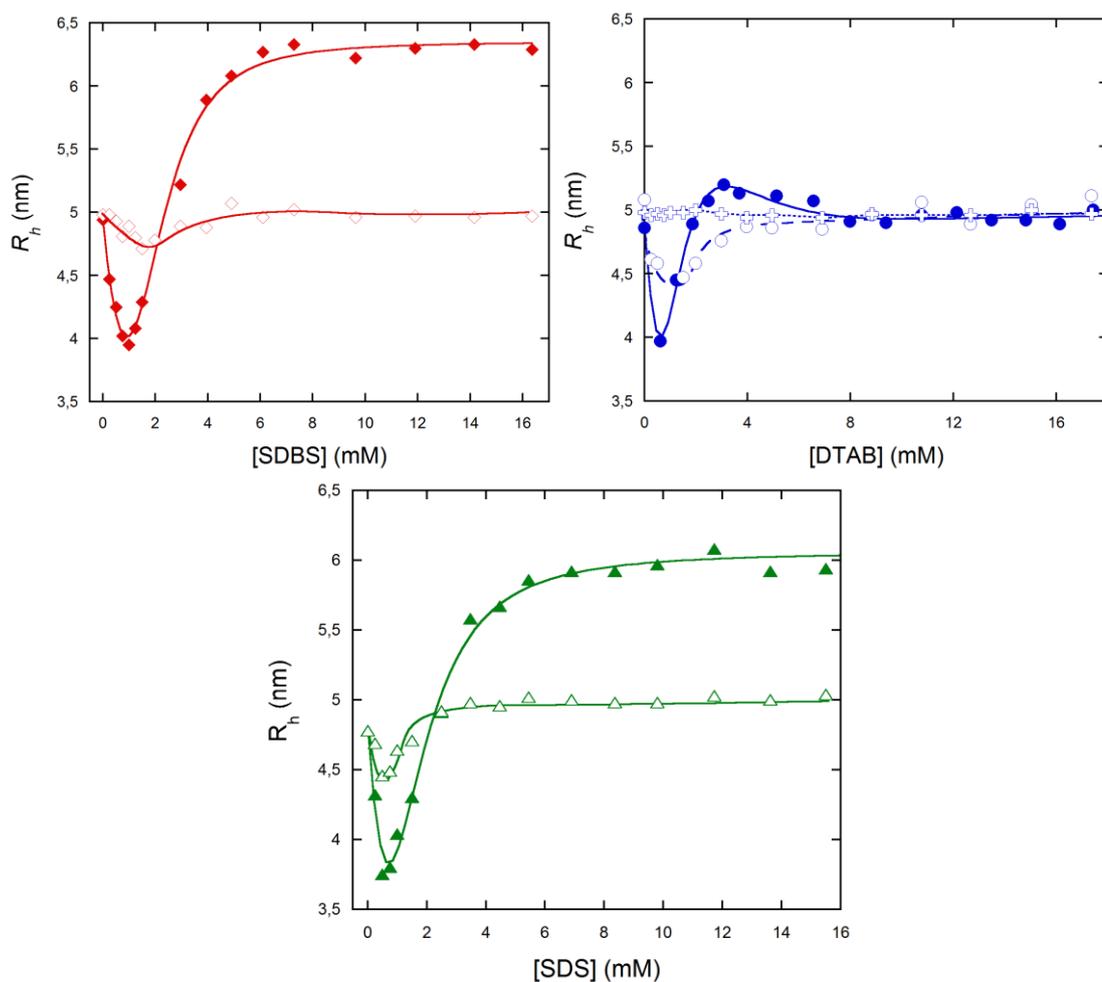


Figura 3-16 Raio hidrodinâmico dos complexos β CD – surfactantes em diferentes concentrações dos surfactantes sem KCl (símbolos preenchidos), com a adição de 5 mM KCl (símbolos vazados) e para o DTAB com 15 mM de KCl (\oplus).

A redução das variações do raio hidrodinâmico com o aumento da concentração dos surfactantes foi o principal efeito observado da presença do sal. Tanto a redução do raio dos complexos para as concentrações abaixo de 1 mM, quanto o aumento para concentrações acima de 1 mM diminuíram de magnitude na presença do sal. Esse efeito tornou-se ainda mais evidente, quando aumentamos a concentração para 15 mM de KCl. Não foi possível a realização do experimento para os surfactantes aniônicos com 15 mM de KCl, por que o íon K^+ precipita o SDS [57] e no experimento com SDBS foi observado alta intensidade espalhada, indicativo da formação de grandes agregados.

Anteriormente, associamos a liberação das ciclodextrinas não ligadas à β CD com a diminuição do raio para concentrações inferiores a 1 mM de surfactante. A presença do KCl reduziu a diminuição do raio para todos os surfactantes. A nossa hipótese para essa atenuação na diminuição do raio é a minimização do desprendimento das β CD do complexo. Sendo que, a blindagem promovida pelos íons K^+ ou Cl^- das interações entre surfactantes adsorvidos em ciclodextrinas diferentes, reduz o efeito eletrostático repulsivo entre elas. Consequentemente, reduz a liberação delas para a solução. Já o menor aumento do raio acima de 1 mM, também ocorre devido a atenuação das interações repulsivas entre as cabeças dos surfactantes associadas em diferentes partes do complexo, de forma que não há variações do raio do complexo com 15 mM de KCl.

A intensidade espalhada pela solução de β CD em diferentes concentrações de DTAB em 0, 5 e 15 mM de KCl são mostradas na Figura 3-17 e é mais uma evidência da hipótese da blindagem eletrostática impedindo a liberação das ciclodextrinas livres e impedindo o inchamento da cadeia. A intensidade foi separada em dois termos: um relativo ao complexo β CD – DTAB e o outro relativo a β CD – DTAB. Observa-se uma menor redução da intensidade espalhada pelo complexo polímero–surfactante e também um menor aumento da intensidade do complexo β CD – surfactante, quando se aumenta a concentração de KCl.

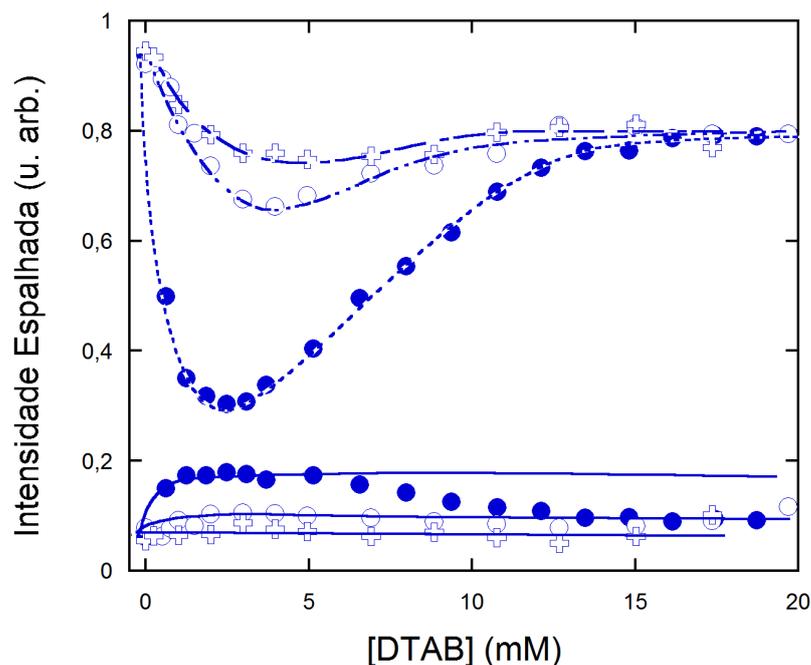


Figura 3-17: Intensidade espalhada pelos complexos de p β CD – DTAB (linhas tracejadas) e pelos complexos β CD – DTAB (linhas contínuas) em diferentes concentrações de DTAB, mantendo fixa a concentração de KCl para cada curva. As concentrações de KCl foram: 0 mM KCl (●), 5 mM de KCl (○) e 15 mM de KCl (+).

Avaliando as curvas da Figura 3-17 em diferentes concentrações de KCl, sugerimos que o efeito de menor redução da intensidade dos complexos p β CD – DTAB, aumentando-se a concentração de KCl, é devido ao menor desprendimento das ciclodextrinas, e que torna-se evidente, quando observamos a intensidade espalhada pelas estruturas de β CD – DTAB. A intensidade espalhada por essas estruturas aumenta menos com a aumento da concentração de KCl, o que certamente está associada a menor quantidade dessas estruturas na solução.

O efeito da força iônica foi avaliado na termodinâmica de formação dos complexos. Observamos apenas variações modestas na curva de entalpia aparente com o aumento da concentração de KCl como ilustrado na Figura 3-18, muito diferente dos resultados das curvas de raio hidrodinâmico observados na Figura 3-16, em que a adição de 5 mM de KCl foi suficiente para minimizar os efeitos de redução e aumento do raio dos complexos.

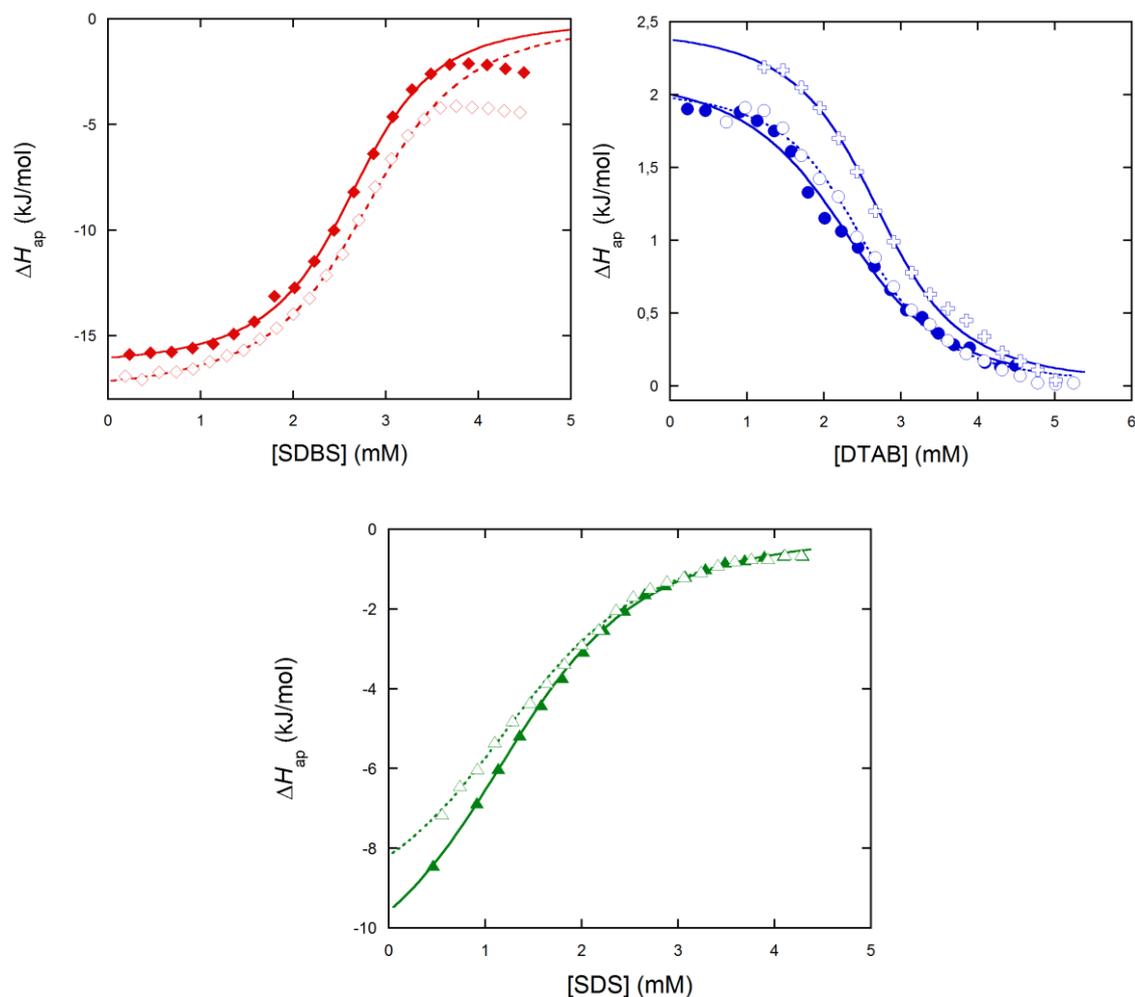


Figura 3-18: Entalpia aparente de interação dos complexos β CD – surfactantes com: 0 mM KCl (símbolos preenchidos), 5 mM KCl (símbolos vazados) e 15 mM KCl (\oplus), a concentração inicial da β CD foi 0,5% m/V.

As curvas de entalpia (Figura 3-18) com a adição de 5 e 15 mM de KCl são similares às aquelas com 0 mM de KCl. Desta maneira, apesar da forte influência do KCl no raio dos complexos, a termodinâmica de complexação não parece ser afetada pelo aumento da força iônica. Sendo assim, sugerimos que as energias de complexação entre os surfactantes e a β CD são muito maiores que as energias de interação eletrostática. Em outras palavras, as interações de natureza eletrostática têm efeito significativo no aumento e diminuição do tamanho dos complexos, mas não absorvem ou liberam quantidades significativas de energia.

Os parâmetros termodinâmicos apresentados na tabela 3.7 foram obtidos através do ajuste das curvas da Figura 3-18 pelo modelo de sítios

únicos e independentes. Os valores de n para a p β CD foram determinados considerando a concentração do polímero.

Tabela 3.7: Parâmetros termodinâmicos para a interação p β CD – surfactantes em diferentes concentrações de KCl. n é a estequiometria da reação, K a constante de ligação, ΔH° a entalpia aparente de interação padrão, $T\Delta S^\circ$ o termo entrópico e ΔG° a energia livre de Gibbs padrão.

p β CD + 0 mM KCl					
	n	K (M ⁻¹)	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
SDS	20,5 ± 0,5	2200 ± 100	-12,1 ± 0,3	7,0 ± 0,4	-19,1 ± 0,1
DTAB	34,2 ± 0,6	4000 ± 500	2,2 ± 0,1	22,8 ± 0,4	-20,6 ± 0,3
SDBS	38,1 ± 0,2	9500 ± 500	-16,5 ± 0,1	6,2 ± 0,2	-22,7 ± 0,1
p β CD + 5 mM KCl					
	n	K (M ⁻¹)	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
SDS	20,8 ± 0,5	2200 ± 100	-10,3 ± 0,4	8,8 ± 0,5	-19,1 ± 0,1
DTAB	33,8 ± 0,5	8000 ± 1000	2,1 ± 0,1	24,4 ± 0,4	-22,3 ± 0,3
SDBS	39,3 ± 0,2	7900 ± 400	-17,8 ± 0,1	4,4 ± 0,2	-22,2 ± 0,1
p β CD + 15 mM KCl					
	n	K (M ⁻¹)	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
DTAB	36,7 ± 0,8	7000 ± 1000	2,5 ± 0,1	24,4 ± 0,5	-21,9 ± 0,4

Interessantemente, apesar da forte influência do KCl no raio dos complexos, o ΔG° sofreu pequenas variações com o aumento da força iônica. Esse resultado confirma nossa hipótese, anteriormente descrita, de que não são as forças eletrostáticas as responsáveis por reduzir a estabilidade dos complexos com p β CD quando comparados aos complexos com β CD. Pois as interações eletrostáticas repulsivas, entre os surfactantes adsorvidos em diferentes cavidades do complexo p β CD – surfactante são minimizadas com a adição de KCl, conforme vimos nas curvas de raio da Figura 3-16. Mas mesmo assim, a estabilidade dos complexos não é afetada. Desta maneira, podemos inferir que a repulsão estérica e a redução das interações de van der Waals são as principais contribuições para a diminuição da estabilidade do complexo e não a repulsão eletrostática entre as regiões hidrofílicas dos surfactantes que são forçados a se concentrarem próximas devido à polimerização das ciclodextrinas.

Outro resultado interessante na tabela 3.7, refere-se ao grau de ocupação da cadeia do polímero pelos surfactantes (n). Observamos que esse valor não muda com o aumento da força iônica. Este resultado está de acordo com a comparação das Δcmc da tabela 3.5 e Figura 3-15, onde vimos que o KCl não aumenta o número de cavidades acessíveis aos surfactantes.

3.6 Mecanismo de Interação $p\beta CD$ – surfactantes

Nesta seção, apresentaremos os mecanismos que propomos para a associação entre a $p\beta CD$ e surfactantes iônicos com base nos dados obtidos pelos experimentos realizados. Compararemos também, com os mecanismos conhecidos de interação entre surfactantes e polímeros, no caso, PEO e $p\beta CD$.

3.6.1 Formação de micelas ao longo da Cadeia polimérica

Em 2005 Dai e Tam propuseram um mecanismo para a interação entre PEO e SDS [58]. A Figura 3-19 ilustra as etapas do mecanismo de associação PEO e SDS.

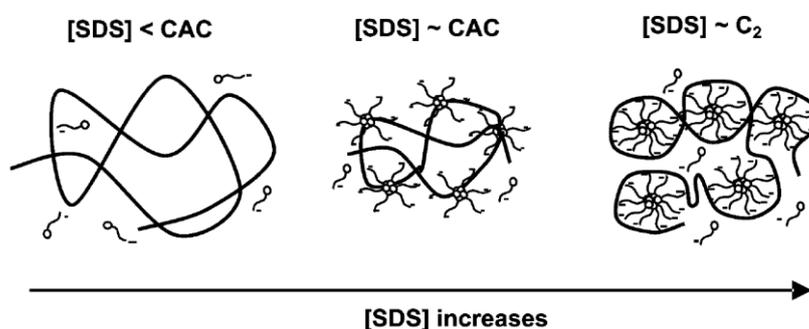


Figura 3-19: Mecanismos de associação entre PEO e SDS em diferentes concentrações do surfactante. Figura extraída da referência [58].

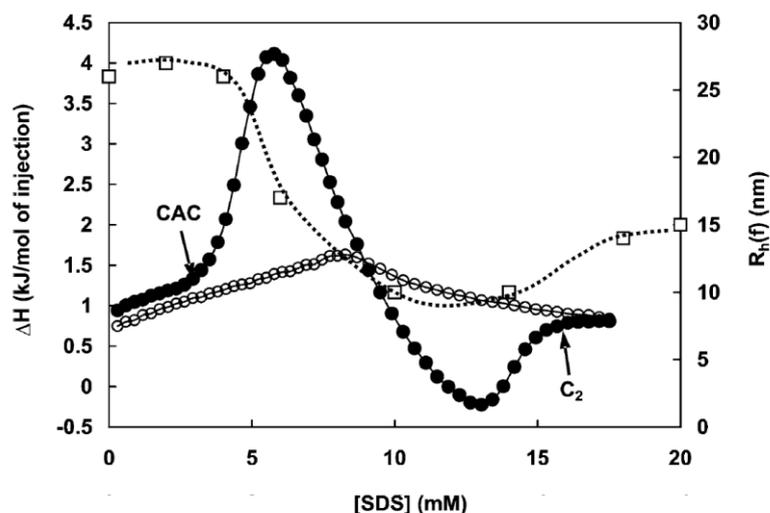


Figura 3-20: Raio hidrodinâmico dos complexos PEO – SDS e entalpia de formação destes complexos em diferentes concentrações de SDS. Foi usada solução de 0,1% m/m de PEO 300.000 Da no experimento. Figura extraída da referência [58].

A associação entre PEO – SDS pode ser dividida em três regiões, cujas repercussões em termos de tamanho da cadeia e da variação de entalpia de interação estão apresentadas na Figura 3-20: I abaixo da concentração de agregação crítica (CAC), II entre a CAC e a concentração de saturação das cadeias (C_2) e III após a C_2 . Na região I, o raio da molécula de PEO permanece constante e a entalpia aparente de interação é próxima de zero. Nesta região as moléculas de surfactante não interagem com a cadeia do polímero. Entretanto quando a concentração de surfactante atinge a CAC o raio hidrodinâmico do complexo diminui. Tal redução foi associada à desidratação da cadeia e formação de agregados micelares com baixo número de agregação ao longo do polímero, conforme ilustrado na estrutura central da Figura 3-19. Continuando a aumentar a concentração de SDS, o raio atinge um ponto de mínimo e depois começa a aumentar. Essa mudança de regime foi associada ao aumento no número de agregação das micelas e a reidratação das cadeias PEO, de tal forma que a cadeia do polímero engloba as micelas conforme a estrutura à direita na Figura 3-19. Finalmente, após a C_2 não é observada interação entre PEO e SDS e aparece estruturas da ordem 1 nm que são as micelas livres. Esse mecanismo foi aplicado com muito sucesso para a interação entre PEO e SDS. Entretanto ele não é o modelo ideal para explicar a formação dos complexos de p β CD – surfactantes, apesar da curva

de raio hidrodinâmico do complexo de p β CD apresentar algumas semelhanças com a curva do complexo de PEO.

A principal semelhança entre as curvas acontece nas regiões II e III. Nessas regiões, o raio dos complexos de PEO reduz de valor, atinge um ponto de mínimo e depois aumenta até atingir um valor constante após a C_2 . As curvas de raio hidrodinâmico apresentadas na Figura 3-6 têm um comportamento qualitativo semelhante, exceto para a região I, pois não é observada uma região de raio constante para baixas concentrações do surfactante na formação dos complexos com a p β CD. Entretanto, há vários aspectos que contrariam esse mecanismo de associação para os nossos resultados.

Os resultados de ITC apresentados nas Figura 3-11 e Figura 3-12 indicam a não existência de uma CAC para associação entre p β CD – surfactantes, pois já nas primeiras adições de moléculas de surfactantes, a entalpia aparente é diferente de zero, o que mostra que os surfactantes estão complexando com a p β CD. Outro aspecto que pode ser claramente observado na Figura 3-11 para as curva de DTAB e SDS, é que a micelização na presença da p β CD em comparação a micelização em água, parece apenas estar deslocada no eixo das abcissas, não sendo observada nas curvas calorimétricas nenhum tipo adicional de agregação e/ou alteração no processo de micelização.

O alto grau de ionização dos complexos (0,89 – 0,98), apresentados na tabela 3.3, indica que quase todos os contra-íons estão dissociados. Se pequenos agregados micelares fossem formados ao longo da cadeia de p β CD, era esperado que esse grau de ionização fosse bem menor, pois seriam necessários contra-íons para estabilizar as micelas. Além disso, o grau de ionização das micelas em água e em solução de p β CD é praticamente o mesmo, confirmando que as micelas não são influenciadas pela presença da p β CD. As curvas de razão de banda do pireno, apresentadas no apêndice A, confirmam que, tanto as micelas formadas em água, quanto as micelas formadas em solução de 0,5% m/V p β CD possuem o núcleo hidrofóbico semelhante. Portanto, temos fortes evidências experimentais de que o

mecanismo de associação proposto por Dai e Tam, não é adequado para explicar a complexação de p β CD com os surfactantes.

3.6.2 Mecanismo de Interação p β CD – surfactantes

Galant e colaboradores propuseram um mecanismo de associação para a interação entre cloreto de dodecil trimetil amônio (DTAC) e a p β CD, usando técnicas como viscosimetria e espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS) [15, 16]. A estrutura resultante deste mecanismo está ilustrada na Figura 3-21.

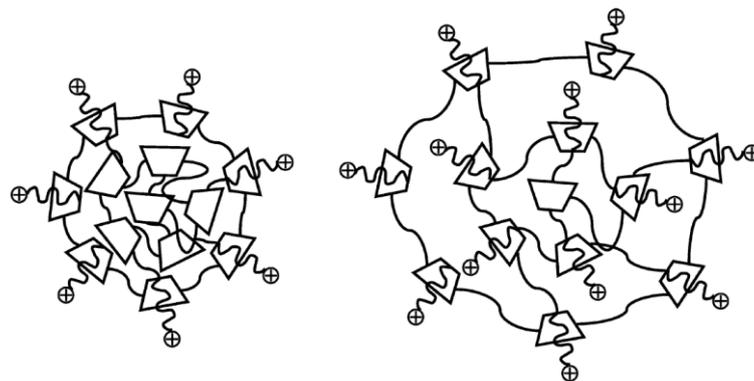


Figura 3-21: Estrutura dos complexos p β CD – DTAC. À esquerda: os surfactantes são distribuídos na periferia da p β CD em concentrações inferiores a concentração crítica de surfactante (C_1). À direita: os surfactantes são distribuídos de forma homogênea ao longo da p β CD para concentrações superiores a C_1 . Figura extraída da referência [15].

Eles propuseram a existência de uma concentração crítica de surfactante (C_1). Esta concentração separa dois regimes de distribuição dos surfactantes ao longo da cadeia do polímero. Abaixo da C_1 os surfactantes são distribuídos na parte externa da p β CD. Nesta região, as cadeias do polímero não sofrem um aumento do volume e comportam-se como cadeias neutras. Já para concentrações acima de C_1 , ocorre o inchamento do polímero, os surfactantes se distribuem de forma homogênea ao longo da cadeia e o complexo comporta-se como pseudo polieletrólito, como ilustrado à direita da Figura 3-21. Em nosso trabalho, não evidenciamos a existência de C_1 , como

proposto por Galant. Não podemos afirmar que os nossos resultados são contraditórios aos de Galant, pois a técnica de DLS não é sensível a mudanças na distribuição de surfactantes ao longo do complexo, mas sim ao raio do complexo como um todo. Mas também, não reforçam a hipótese de preenchimento preferencial do surfactante na região periférica da β CD para depois preencher a região central, pois usamos o modelo de sítio único e independente que ajustou muito bem os dados experimentais de microcalorimetria. Considerando que o mecanismo de associação polímero – surfactante proposto por Galant esteja correto, constatamos que a mudança no regime de distribuição dos surfactantes no complexo não envolve variação significativa do conteúdo entálpico do sistema, pois não foi observada qualquer anomalia nas curvas de entalpia aparente de interação mostrada na Figura 3-12.

A partir das curvas de raio hidrodinâmico apresentadas na Figura 3-6, sugerimos um mecanismo de associação diferente do proposto por Galant. Esse mecanismo pode ser aplicado aos outros dois surfactantes. A estrutura dos complexos é apresentada na Figura 3-22 para diferentes concentrações do DTAB. Nessa figura, em (a) temos o complexo sem a adição do surfactante. Nesta situação, há tanto ciclodextrinas livres em solução, quanto ciclodextrinas que estão interagindo com a β CD. A adição de surfactantes induz o desprendimento das ciclodextrinas não-ligadas ao polímero para a solução, que acarreta uma redução do raio hidrodinâmico. (b) Quando grande parte das ciclodextrinas for expulsa o raio hidrodinâmico da β CD atinge o ponto mínimo na curva da Figura 3-6. (c) As novas moléculas de surfactante adicionadas formam o complexo com a β CD e a repulsão eletrostática entre a cabeça dos surfactantes promove o inchamento do complexo. (d) Após a saturação das cadeias do polímero, as moléculas de surfactantes são redirecionadas para a solução e posteriormente ocorre a formação das micelas.

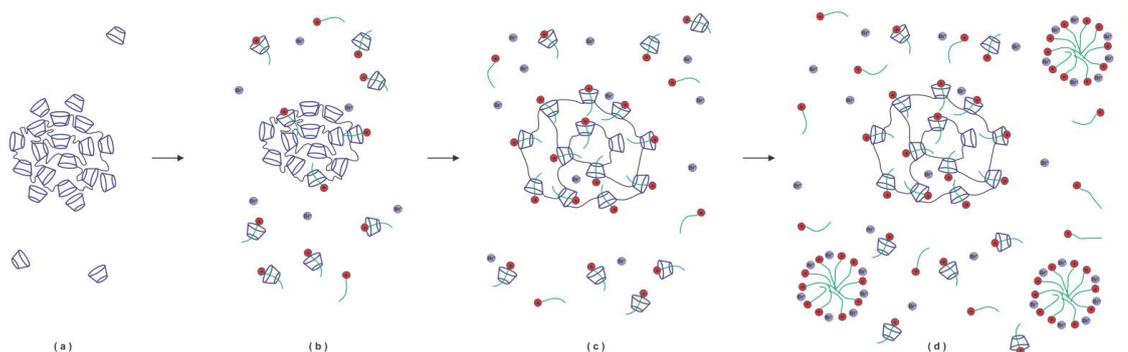


Figura 3-22: Mecanismo de formação dos complexos $p\beta CD - DTAB$, da esquerda para a direita a concentração do surfactante aumenta. (a) Complexo $p\beta CD - \beta CD$ sem a adição do surfactante, (b) Complexo $p\beta CD - DTAB$ e expulsão das ciclodextrinas não ligadas, (c) Aumento do raio da $p\beta CD$, (d) saturação da cadeia de $p\beta CD$ e formação de micelas.

Interessantemente, o efeito de aumento da força iônica foi reduzir as variações do raio hidrodinâmico como ilustrado na Figura 3-16. Com a adição de 15 mM de KCl, a curva de raio dos complexos $p\beta CD - DTAB$ praticamente não sofreu alteração. Apresentamos na

Figura 3-23, a formação dos complexos de DTAB e $p\beta CD$ na presença de 15 mM de KCl.

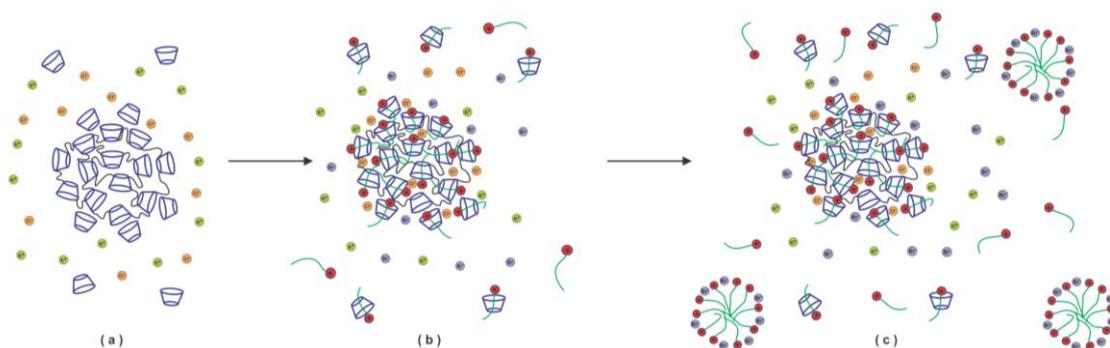


Figura 3-23: Mecanismo de formação dos complexos $p\beta CD - DTAB$ com 15 mM de KCl, da esquerda para a direita a concentração do surfactante aumenta. (a) Complexo $p\beta CD - \beta CD$ sem a adição do surfactante, (b) Complexo $p\beta CD - DTAB$ após a saturação do polímero.

Figura 3-23 ilustra o efeito que a adsorção do DTAB promove na estrutura da cadeia do polímero na presença de 15 mM de KCl. A

Figura 3-23 (a) mostra a coexistência de ciclodextrinas livres e aquelas que interagem com o complexo. A presença do sal não modificou o tamanho inicial da cadeia do polímero. Já a

Figura 3-23 (b) mostra o complexo completamente saturado por moléculas do surfactante. Como o raio hidrodinâmico não muda com o aumento da concentração do DTAB, propomos o seguinte mecanismo: as moléculas de surfactantes adsorvidas no complexo não são capazes de expelir as ciclodextrinas não-ligadas, bem como o complexo não sofre o processo de inchamento, devido a blindagem eletrostática promovida pelos íons Cl^- . Esse modelo pode ser aplicado de maneira análoga para os surfactantes na concentração de 5 mM de KCl, entretanto nessa situação, algumas moléculas de ciclodextrinas são expelidas do complexo e acontece um inchamento parcial do complexo polímero – surfactante, pois nessas condições, a força iônica não é capaz de blindar totalmente as interações repulsivas entre os surfactantes. E por último temos a formação das micelas após a saturação do polímero na

Figura 3-23 (c).

3.7 Conclusões e Perspectivas do Capítulo 3

Complexos estáveis foram formados entre a $\text{p}\beta\text{CD}$ e os três surfactantes estudados. A cmc aumentou na presença do polímero, resultado da formação do complexo. A partir da Δcmc , calculamos o número de surfactantes por cadeia de $\text{p}\beta\text{CD}$ e encontramos 36 ± 6 para o SDS, 28 ± 6 para o DTAB e 27 ± 13 para o SDBS. O número de ciclodextrinas por polímero foi ($n_{\beta\text{CD}} = 29,5 \pm 0,4$). Conseqüentemente, todas as cavidades estão ocupadas por moléculas de surfactantes após a saturação da cadeia e possivelmente para o SDS algumas cavidades possuem duas moléculas. O grau de ionização das micelas dos três surfactantes não sofreu variação na presença ou ausência do polímero. Entretanto, o grau de ionização do complexo $\text{p}\beta\text{CD}$ – surfactante

foi dependente do surfactante e seguiu a seguinte ordem SDBS > DTAB > SDS.

Observamos, sem a adição de surfactante, a existência de duas populações de partículas, uma de aproximadamente 1 nm, que sugerimos ser de β CD livre e a outra de 5 nm de raio que associamos aos complexos de $p\beta$ CD – β CD. Ocorreu uma redução do raio hidrodinâmico da $p\beta$ CD com a adição dos três surfactantes, que associamos ao desprendimento das ciclodextrinas não ligadas covalentemente ao polímero. O comportamento de pseudo polieletrólito encontrado em outros trabalhos [15, 16], só foi observado a partir da concentração de 1 mM, quando o raio passou a aumentar devido a repulsão eletrostática entre as cabeças dos surfactantes adsorvidas em regiões próximas do complexo. A técnica de dispersão de Taylor confirmou a existência de duas populações de partículas e também evidenciou o desprendimento das ciclodextrinas. Já o potencial zeta confirmou a associação dos três surfactantes com o polímero e, como esperado, o complexo com o surfactante catiônico apresentou carga positiva e o complexo com os surfactantes aniônicos carga negativa. Além disso, evidenciamos que a formação dos complexos para os surfactantes aniônicos ocorre para concentrações inferiores a 5 mM.

A entalpia de interação polímero – surfactante foi determinada na mesma faixa de concentração das curvas de raio hidrodinâmico e comparada com a curva de diluição do surfactante em água. A presença do polímero deslocou as curvas de micelização para maiores concentrações de surfactante, consequência da formação dos complexos antes da micelização. Os parâmetros termodinâmicos (n , K , ΔH , ΔS e ΔG) foram obtidos para a inclusão dos surfactantes tanto na β CD quanto na $p\beta$ CD, usando o modelo de sítios únicos e independentes.

Foram observadas diferenças no ΔH^p para a inclusão dos surfactantes em β CD, seguindo a seguinte ordem SDBS < SDS < DTAB. Nesta sequência, a inclusão é mais exotérmica para SDBS e menos para o DTAB. A compensação entálpico – entrópica foi observada para a formação dos complexos β CD – surfactantes.

Já os complexos de surfactantes com a p β CD são menos estáveis do que com a β CD. A diminuição na estabilidade deve-se ao aumento da entalpia, devido principalmente a dois fatores: as forças estéricas causada pela polimerização da β CD que dificultam a entrada do surfactante nas cavidades da p β CD e a redução do encaixe entre surfactante – cavidade, pois a polimerização altera a cavidade reduzindo as interações entre hóspede e hospedeiro.

O efeito das interações eletrostáticas entre as cabeças dos surfactantes foi avaliado pelo aumento da força iônica da solução pela adição de KCl. A Δcmc não foi afetada pelo aumento da força iônica. Deste modo, não foi observado aumento no número de cavidades acessíveis aos surfactantes na presença de 5 mM de KCl. Em relação ao raio hidrodinâmico dos complexos não houve nenhuma alteração do raio alterando a concentração de surfactante na presença de 15 mM de KCl. Comprovamos, aumentando a força iônica da solução, que o processo de desprendimento das ciclodextrinas do complexo p β CD – surfactante, assim como o crescimento do complexo para concentrações de surfactante acima de 1 mM, é principalmente eletrostático. Verificamos ainda, que o aumento da força iônica não modifica de maneira significativa a entalpia e entropia padrão de complexação, apesar dos efeitos nas curvas de raio serem pronunciados. Concluímos, então, que o desprendimento das ciclodextrinas, bem como o aumento do tamanho dos complexos, não envolvem absorção ou liberação significativa de energia quando comparadas com as energias de complexação do surfactante na cavidade das β CD.

Propusemos o seguinte mecanismo para interação de p β CD com surfactantes. Inicialmente, há ciclodextrinas livres na solução e interagindo com a p β CD. A 0 mM de KCl, quando os surfactantes são adsorvidos na p β CD eles expulsam as ciclodextrinas não ligadas no complexo. Após a expulsão de todas as ciclodextrinas livres, a adição de surfactante é responsável pelo inchamento da cadeia do polímero até a saturação. Nesta condição, as novas moléculas de surfactante serão redirecionadas para a solução e posteriormente formarão as micelas. Já a presença do KCl promove a blindagem eletrostática, prevenindo tanto a expulsão das ciclodextrinas livres quanto o inchamento do complexo.

Nossos resultados descartam a formação de micelas ao longo da cadeia do polímero, tal como observado na associação de PEO com SDS proposto por Dai e Tam [58]. Também, não obtivemos evidências experimentais que comprovem que os surfactantes inicialmente se distribuem na periferia da p β CD até uma concentração crítica e depois passa a se distribuir homogeneamente na cadeia do polímero como proposto por Galant e colaboradores [15].

Sugerimos que os surfactantes podem ser usados na purificação dos polímeros de ciclodextrinas, pois a repulsão eletrostática entre β CD e a p β CD quando os surfactantes são adsorvidos nessa estrutura, podem facilitar o processo de dialise da p β CD. Esse processo de purificação será objeto de futuros estudos.

Capítulo 4

INTERAÇÃO DNA – P β CD

4.1 Breve Histórico

As ciclodextrinas são estruturas supramoleculares que despertam grande interesse nas áreas: farmacêutica, alimentos e cosméticos, pois ela possui um interior hidrofóbico que permite a complexação de compostos liofílicos e a parte externa hidrofílica, o que a torna solúvel em água [1]. Desta maneira, a compreensão das interações entre ciclodextrinas e DNA é de extrema importância para que possa se desenvolver produtos seguros para o consumo humano.

Alves e colaboradores estudaram a interação entre β CD e λ -DNA, usando a técnica de pinça ótica para o estiramento de uma única molécula de DNA na presença de diferentes concentrações de β CD [59]. Eles observaram um comportamento não monótono entre o comprimento de persistência (A) e a concentração de β CD e não observaram variação no comprimento de contorno (L). A β CD não altera a rigidez do DNA na faixa de concentração de micromolar, os efeitos são observados apenas para concentração acima de 1 mM. Nessas condições, o DNA torna-se mais rígido até a concentração de 6 mM. Após essa concentração, o DNA sofre o processo de desnaturação com consequente redução de A . Alves verificou que a β CD neutra interage menos com a molécula de DNA do que a β CD catiônica, sendo, portanto, mais adequada ao consumo humano [59].

Já Siman e colaboradores estudaram a formação de complexos entre β CD catiônica e λ -DNA [60]. Eles observaram inicialmente a redução de A até a concentração de 20 μ M, depois um aumento até 55 μ M, após essa concentração, ocorre uma queda abrupta de A , indicando a desnaturação da cadeia de DNA.

A polimerização das ciclodextrinas permite alterar propriedades físico-químicas das ciclodextrinas. Esses polímeros podem ser associados a dextrana modificada com grupos lauril para a formação de nanogéis e usados para a solubilização de fármacos [13]. Os polímeros de ciclodextrinas apresentam propriedades químicas e mecânicas que os tornam interessantes para aplicações nas áreas de biomédica, farmácia, etc. [12]. Apesar disso, não encontramos estudos que avaliem os efeitos da interação de p β CD com DNA.

Desta forma, propomos neste trabalho avaliar a interação entre p β CD e λ -DNA. Estudamos as propriedades mecânicas (A e L) em diferentes concentrações de p β CD. Usamos o modelo estatístico proposto por Rocha para determinar as propriedades físico-químicas da interação entre p β CD e DNA a partir da variação de A [60]. Esse modelo foi usado com sucesso na determinação de parâmetros físico-químicos para a interação entre DNA – β CD neutra e DNA – β CD catiônica [59] [60].

4.2 Técnica de Caracterização

4.2.1 Preparação de Amostras

As soluções para as medidas de interação de λ -DNA (New England Biolabs) com a p β CD foram preparadas em solução salina tamponada de fosfato com PH 7,4 e [NaCl] = 140 mM. A concentração de pares de base de DNA usada ao longo de todo experimento foi 2,4 μ M. As extremidades das moléculas de DNA são ligadas à proteína biotina para facilitar a ligação com microesferas de poliestireno de 3 μ m de diâmetro (Bangs Labs) que vêm recobertas com a proteína estreptavidina.

O porta-amostra é preparado colando-se um anel de borracha a uma lamínula de vidro. Para potencializar as interações entre a molécula de DNA e a lamínula é necessário que ela seja tratada. Primeiro adiciona-se 20 μ L de solução 1,9 μ g/mL de proteína de soro de leite biotilada (BSA-biot) em

tampão A* ao porta-amostra e espera-se 20 minutos. Após este tempo retira-se o excesso da solução de BSA-biot e adiciona-se lentamente 20 μ L de solução tampão A e retira-a logo em seguida. A seguir adiciona-se 20 μ L de solução 0,1 mg/mL de estreptavidina em tampão de fosfato e espera 20 minutos. Em seguida o porta amostra é novamente lavado com 20 μ L de solução tampão A.

A montagem da pinça ótica consiste de um laser de fibra dopada com itérbio de comprimento de onda 1064 nm com potência máxima de 5,8 W da IPG Photonics. O feixe de laser passa por um conjunto de espelhos para alinhamento e em seguida pela objetiva do microscópio invertido (aumento de 100X e abertura numérica 1,4) da Nikon Ti-S que serve para focalizar o feixe na amostra. O porta amostra é colocado sobre o estágio de piezoelétrico que possibilita o deslocamento translacional. O equipamento foi anteriormente calibrado por dois métodos independentes: calibração por força de Stokes Indireta e análise das flutuações Brownianas da microesfera no poço de potencial da pinça, como descrito na referência [61].

O experimento consiste em, após localizar um DNA ligado à lamínula e ao mesmo tempo à microesfera de poliestireno, quando encontrado, realizar uma série de 6 estiramentos e, então, determina-se os parâmetros A_0 e L_0 (ou comprimento de contorno e persistência do DNA puro respectivamente), estão dentro da faixa adequada [62]. Uma concentração de ligante é adicionada e esperava-se um tempo entre 20 a 30 minutos, tempo suficiente para o sistema entrar em equilíbrio e novamente a mesma molécula de DNA é estirada para determinar A e L na presença do ligante.

4.2.2 Fundamentos da Técnica

O pinçamento ótico consiste em focalizar um feixe de laser gaussiano, sobre uma partícula dielétrica que tenha índice de refração maior do que o meio. Esse fenômeno foi descoberto em 1969 por Arthur Ashkin e

* Solução tampão é preparada com 10 mM de $MgCl_2$, 25 mM de Tris HCl em pH8 e 40 mM de KCl

colaboradores nos Estados Unidos [63]. Desde então o pinçamento ótico vem sendo utilizado nas áreas de física, bioquímica, biologia, etc.

Uma das áreas de grande interesse na física biológica envolve o estudo da interação de DNA – fármacos. A técnica de pinçamento ótico possibilita a determinação de parâmetros mecânicos. Por exemplo, o comprimento de contorno e comprimento de persistência das moléculas de DNA em diferentes concentrações de fármacos. Uma das grandes vantagens dessa técnica é a realização do experimento com uma única molécula [64].

A figura 4-1 ilustra uma microesfera presa ao poço de potencial criado por um feixe de laser focalizado. Essa microesfera está ligada ao porta-amostra por uma única molécula de DNA. Um deslocador piezoelétrico colocado sobre o estágio do microscópio desloca o porta amostra para a esquerda. A microesfera também é deslocada e como o feixe de laser é mantido fixo, a força da pinça tende a trazê-la para o foco, estirando a molécula de DNA. O experimento é realizado em baixas velocidades ($v \sim 0,1 \mu\text{m/s}$), garantindo que a microesfera passe por estados de equilíbrio e as forças de Stokes sejam desprezíveis.

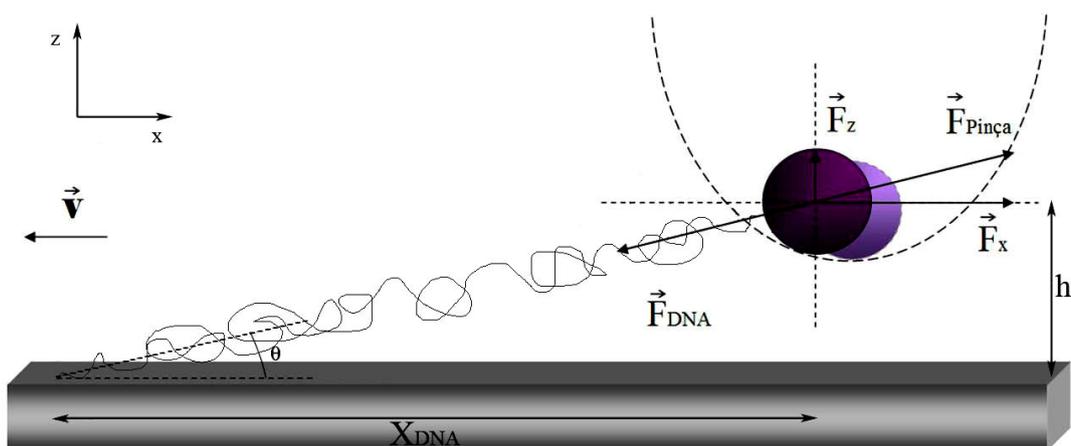


Figura 4-1: Representação esquemática do pinçamento ótico. A microesfera, presa no poço de potencial do laser, é ligada a molécula de DNA que por sua vez está ligada ao porta-amostra. O piezoelétrico desloca o porta-amostra para a esquerda estirando a molécula de DNA. Figura extraída da referência [65].

Marko e Siggia obtiveram a equação que relaciona a força com o estiramento da molécula de DNA no regime entrópico*. A equação 4.1 é a componente x desta força [66].

$$F_x = \frac{K_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{X_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{X_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \times \frac{X_{DNA}}{\sqrt{X_{DNA}^2 + h^2}}, \quad (4.1)$$

onde F_x é a componente x da força, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, A é o comprimento de persistência, L é o comprimento de contorno, X_{DNA} é a projeção da distância ponta a ponta da molécula de DNA ao longo do eixo x, h é a altura da microesfera em relação a lamínula.

As curvas de força pelo estiramento da molécula de DNA são construídas a partir da obtenção da posição do centróide da microesfera em função do tempo, determinados por vídeo microscopia. Já a força de estiramento no DNA é igual à força da pinça que é calculada pela equação 4.2.

$$F_{DNA} = F_{Pinça} = k\Delta x, \quad (4.2)$$

onde F_{DNA} é o módulo da força de estiramento no DNA, $F_{Pinça}$ é módulo da força ótica, k é a constante da pinça, Δx é a deformação do centroide da microesfera em relação à posição de equilíbrio (foco do laser).

O ajuste da equação 4.1 aos dados experimentais permite a determinação de A e L . A curva apresentada na figura 4-2 é a curva experimental obtida para o estiramento da molécula de DNA sem a adição de ligantes. A linha contínua em preto é o resultado do ajuste da equação 4.1.

* O regime entrópico ocorre quando as força externas são suficientemente pequenas para serem capazes de alterar apenas a conformação do polímero.

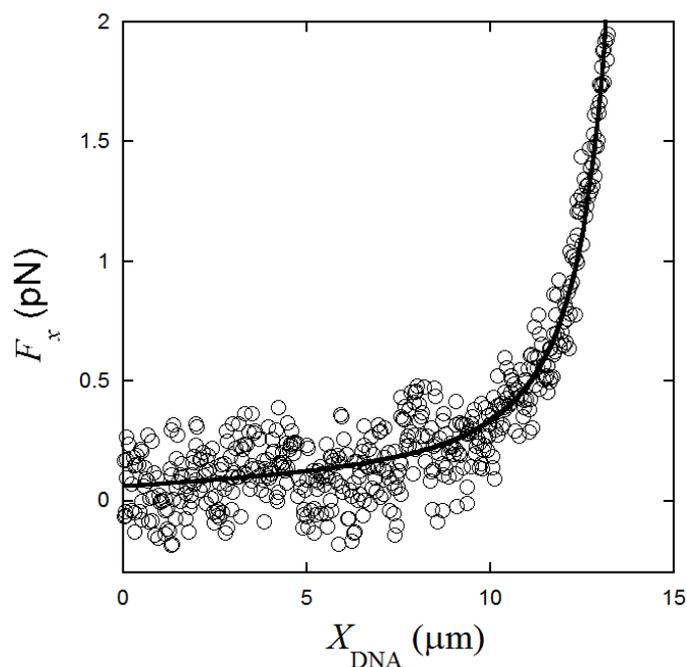


Figura 4-2: Curva de força para o estiramento de uma única molécula de DNA. Obtenção do comprimento de contorno e persistência com: $A = 46 \pm 2$ nm e $L = 15,5 \pm 0,1$ μm , respectivamente, obtidos pelo ajuste da equação 4.1.

Nos experimentos o ajuste foi limitado de modo que a força máxima fosse de 2 pN, garantindo que a microesfera encontra-se na região harmônica do poço de potencial do laser. Desse modo garante-se que a equação proposta por Marko e Siggia ajusta-se muito bem os dados experimentais.

Rocha propôs um modelo para transição estrutural das moléculas de DNA na presença de diferentes concentrações de ligante. Considerando que o DNA era constituído de molas entrópicas associadas em série, sendo que a porção do DNA onde não havia ligante, se comporta como uma mola com comprimento de persistência A_0 (DNA puro). Já a porção da molécula com o ligante tem persistência A_1 [60]. A equação 4.3 considera o DNA como uma série de i molas entrópicas associadas em série [64], com:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f_0(r)}{A_0} + \frac{f_1(r)}{A_1} + \frac{f_2(r)}{A_2} + \dots, \quad (4.3)$$

onde $f_0(r)$, $f_1(r)$, $f_2(r)$,... são as funções da fração de ligante e representa a probabilidade de encontrar uma mola com comprimento de persistência A_i , já A_E é o comprimento de persistência efetivo do DNA.

A isoterma de Hill é uma equação capaz de conectar as propriedades mecânicas do DNA com parâmetros físico-químicos. Ela relaciona a fração de ligantes ligados num substrato com a concentração de ligantes livres:

$$r = \frac{r_{\max} (K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}, \quad (4.4)$$

onde r é a fração de ligantes ligados, K_i é a constante de associação, C_f é a concentração de ligantes livres ($C_f = C_T - C_b = C_T - rC_{pb}$), C_b é a concentração de ligante ligado, C_T é a concentração de ligante total C_{pb} é a concentração de pares de bases da molécula de DNA, n é o expoente de Hill (parâmetro de cooperatividade) e r_{\max} é o valor de saturação de r .

O expoente de Hill ou parâmetro de cooperatividade indica o quanto é cooperativa ou não a associação do ligante com o substrato, isto é, se $n > 1$ a associação é de cooperatividade positiva, se $n < 1$ de cooperatividade negativa e se $n = 1$ é não-cooperativa. Deste modo, $n > 1$ significa que a entrada do primeiro ligante facilita a entrada do próximo ligante.

A grande dificuldade de se obter os parâmetros físico-químicos das medidas do comprimento de persistência reside no fato de a isoterma de Hill relacionar o r contra C_f . Em geral os gráficos de comprimento de persistência são relacionados a C_T . A isoterma de Hill foi escolhida por conveniência. Entretanto, outras isotermas poderiam ser usadas, desde que forneça parâmetros físico-químicos reais.

4.3 Físico-química de Interação DNA - p β CD

Os experimentos de pinça ótica possibilitam determinar os parâmetros mecânicos (A e L) dos complexos DNA – p β CD estirando uma única molécula de DNA em diferentes concentrações de p β CD. Na figura 4-3 mostramos o comportamento de L em função da concentração de ligante.

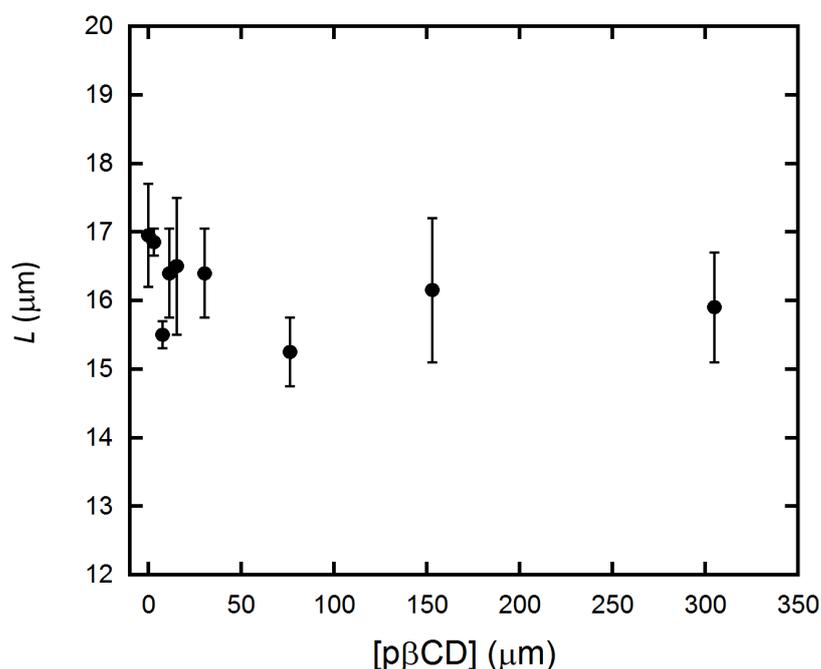


Figura 4-3: Comprimento de contorno do complexo DNA – p β CD em diferentes concentrações da p β CD.

Os valores de L na figura 4-3 são a média de valores de L , obtidos em experimentos com duas moléculas de DNA distintas. Não observamos variações significativas de L quando aumentamos a concentração de ligante. As barras de erros nos gráficos da figura 4-3 e 4-4 foram calculadas pelo desvio-padrão médio do conjunto de medidas.

Interessantemente, observamos uma redução da rigidez da molécula de DNA à medida que aumentamos a concentração de p β CD até 10 μ M. Nestas condições, A diminui de ~ 40 nm (DNA puro) para ~ 22 nm na

concentração de 10 μM . A figura 4.4 mostra o comportamento do comprimento de persistência em função da concentração de p β CD para o complexo DNA – p β CD.

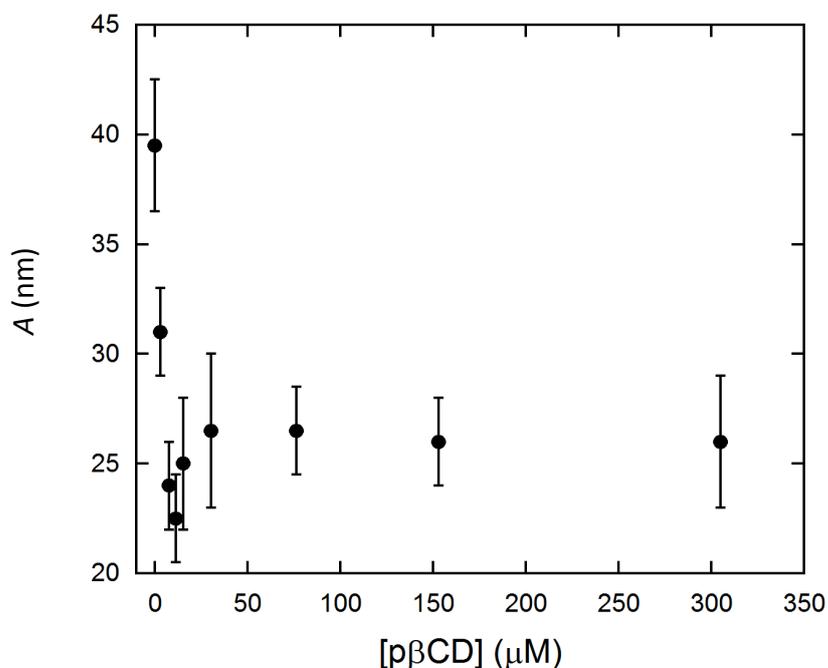


Figura 4-4: Comprimento de persistência (A) do complexo p β CD – DNA em função da concentração de p β CD. Um comportamento não monótono foi observado aumentando-se a concentração de p β CD. Um valor de mínimo de A (~ 22 nm) foi observado na concentração de 10 μM de p β CD.

O comprimento de persistência está intrinsicamente relacionado a rigidez da molécula de DNA. Uma redução do comprimento de persistência indica que a molécula tornou-se mais flexível interagindo com a p β CD. Na região entre 0 (DNA puro) até 10 μM de p β CD, percebemos o aumento da flexibilidade da molécula de DNA. Entretanto, a partir de 10 μM ocorre um leve aumento de A , estabilizando em 25 μM . Esse comportamento não monótono dos complexos com o aumento da concentração de p β CD sugere que temos dois mecanismos de ligação da p β CD com o DNA.

Para ajustar os dados da figura 4.4, usamos um modelo mais simples do que o proposto na equação 4.3 com apenas 2 sítios de ligação possíveis. A equação 4.5 representa este modelo.

$$\frac{1}{A_E} = \frac{(1-x)^2}{A_0} + \frac{2x(1-x)}{A_1} + \frac{x^2}{A_2}, \quad (4.5)$$

onde $x = r/r_{\text{máx}}$ e $P_0 = (1-x)^2$; $P_1 = 2x(1-x)$; $P_2 = x^2$ são probabilidades de encontrar dois sítios próximos desocupados, dois sítios próximos um ocupado e o outro desocupado e dois sítios próximos ocupados, respectivamente. A_0 , A_1 e A_2 são os comprimentos de persistência local para cada uma das configurações anteriormente descritas.

A ligação entre o comprimento de persistência e os parâmetros físico-químicos de formação dos complexos pβCD – DNA pode ser feita considerando uma isoterma adequada. Neste caso em particular, são necessários duas isotermas para ajustar os dados da figura 4-4. Propomos aqui, usar a soma de duas isotermas de Hill, como mostrado na equação 4.6.

$$x = \frac{(K_1 C_f)^{n_1}}{2[1 + (K_1 C_f)^{n_1}]} + \frac{(K_2 C_f)^{n_2}}{2[1 + (K_2 C_f)^{n_2}]}, \quad (4.6)$$

onde K_1 e K_2 são as constante de ligação do modos 1 e 2 respectivamente. n_1 e n_2 são os graus de cooperatividade. Neste caso em particular, n_1 e n_2 também representa o número de pβCD que liga cooperativamente a cada sítio da molécula de DNA nos modos 1 e 2 respectivamente.

O comprimento de persistência na figura 4-4 está relacionado à concentração total de ligante. Para acoplarmos as equações 4.5 e 4.6 e usá-las para ajustar os dados da figura 4-4 é necessário usar o seguinte vínculo $C_f = C_T - C_b = C_T - rC_{pb}$. Foram considerados como parâmetros fixos no ajuste: $A_0 = (40 \pm 3)$ nm, $A_2 = (26 \pm 3)$ nm e $C_{pb} = 2,4$ mM, e parâmetros variáveis: K_1 , K_2 , n_1 , n_2 , A_1 e $r_{\text{máx}}$. Por conveniência ajustamos o inverso de A em função da [pβCD] e cujo resultado do ajuste está apresentado na figura 4-5.

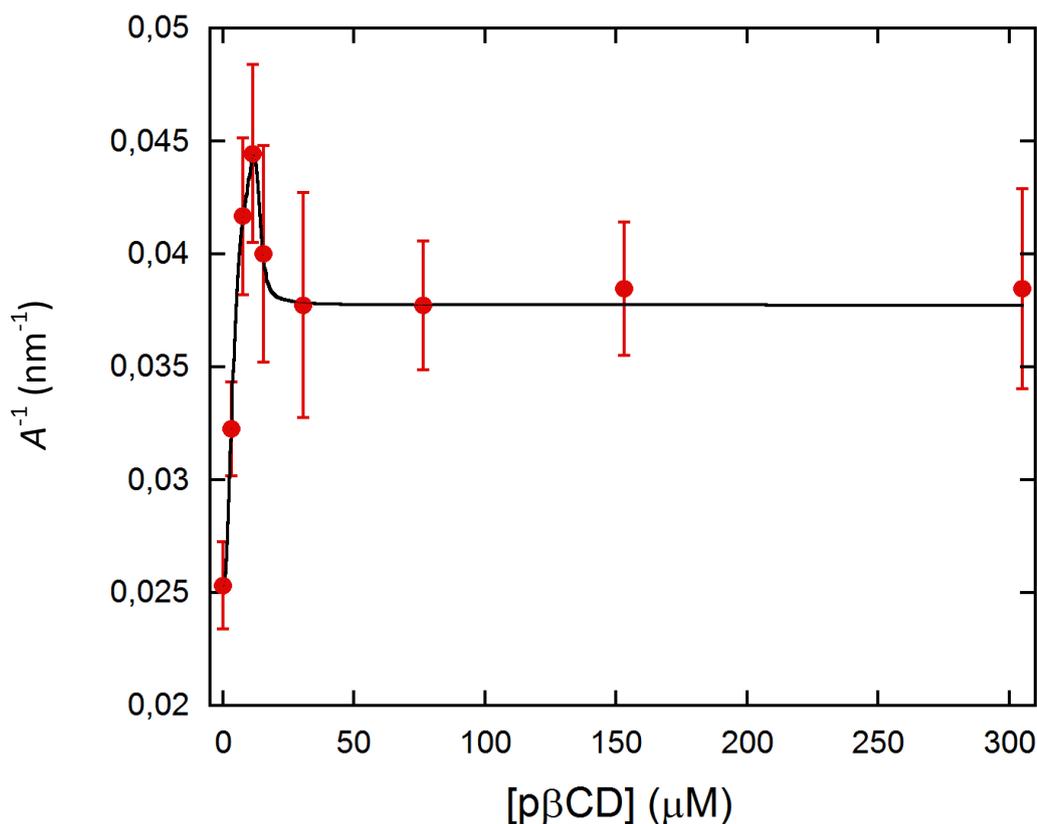


Figura 4-5: Inverso do comprimento de persistência, A^{-1} , em função da concentração de pβCD. A linha contínua representa ajuste o modelo de 2 sítios, acoplado com a soma de duas isotermas de Hill. O ajuste permite a determinação dos parâmetros físico-químicos de formação dos complexos pβCD – DNA.

No gráfico da fig. 4-5 mostramos o ajuste pelo modelo de 2 sítios independentes, acoplado com a soma de 2 isotermas de Hill. Verificamos que os pontos experimentais são muito bem ajustados por esse modelo e fornece parâmetros físico-químicos reais. Modelo com mais de 2 sítios independentes, ou mesmo somar mais de 2 isotermas poderiam ser usados. Provavelmente o ajuste ficaria ainda melhor, entretanto o excesso de parâmetros poderia aumentar as barras de erros e até mesmo gerar parâmetros físico-químicos não-reais. Deste modo, esse modelo foi escolhido por se tratar do mais simples possível e que ajusta muito bem os dados experimentais.

Obtivemos os parâmetros físico-químicos do ajuste: $K_1 = 2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_1 = 2,6$, $n_2 = 12$ e $A_1 = 18 \text{ nm}$. Os erros relativos foram estimados entre 10 – 15 %. Desta maneira, temos a formação de agregados de 2-3 moléculas de pβCD e agregados com 12 moléculas de pβCD ao longo da

cadeia de DNA, sendo que os agregados de 2-3 moléculas reduzem a persistência da molécula de DNA localmente de ~ 40 nm para 18 nm. Enquanto os agregados de 12 moléculas reduzem a persistência de ~ 40 nm para ~ 26 nm. Vemos que as constantes de ligação dos agregados menores é 2,5 vezes maior do que os agregados com 12 moléculas.

As duas isotermas de ligação obtidas do ajuste são apresentadas na figura 4.6 em função da concentração de p β CD, juntamente com os mesmos resultados do gráfico da figura 4.5, porém restrito a faixa de concentração de 0 – 25 μ M onde efetivamente ocorrem alterações na interação p β CD – DNA.

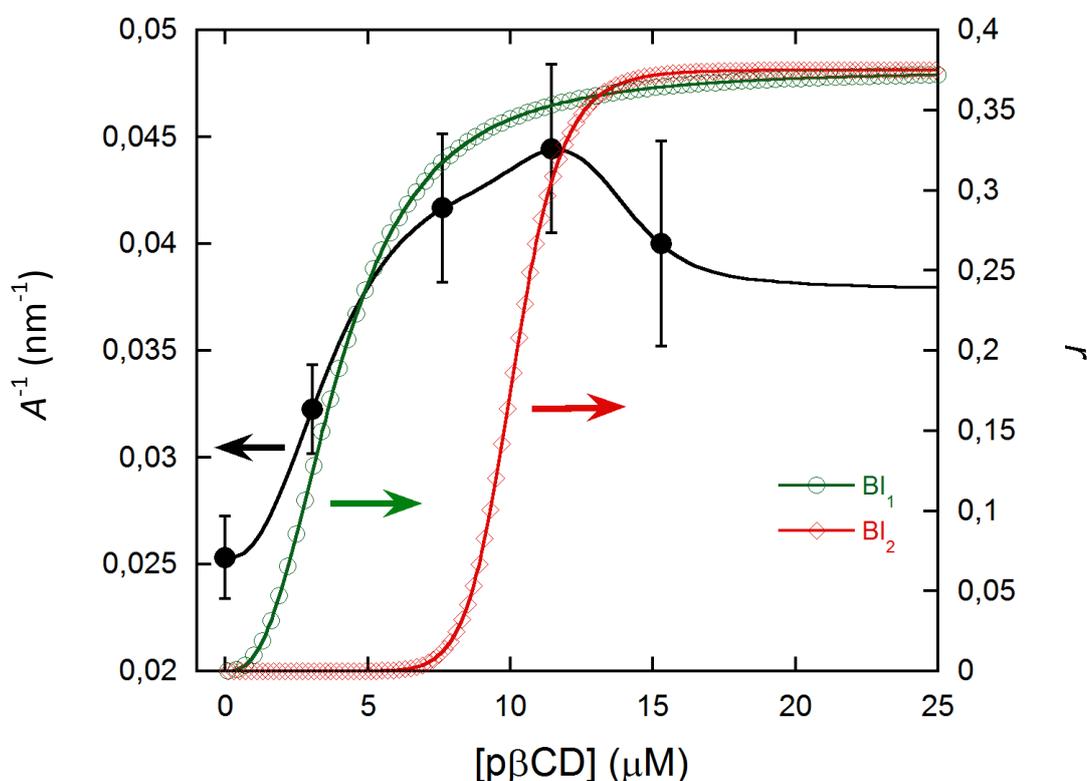


Figura 4-6: (○) BI₁ é a isoterma de ligação dos agregados de 2-3 moléculas de p β CD, enquanto (◇) BI₂ é a isoterma de ligação dos agregados com 12 moléculas de p β CD por sítio da molécula de DNA. (●) é o A^{-1} pela [p β CD] na região de 0-25 μ M e a linha contínua em preto é o resultado do ajuste do modelo de dois sítios independentes.

Os resultados da figura 4-6 indicam que primeiro são formados agregados de 2-3 moléculas ao longo da cadeia de DNA, reduzindo o comprimento de persistência de ~ 40 nm para ~ 22 nm (ou A^{-1} aumentando de

0,025 a 0,045 nm⁻¹), a saturação destes agregados ao longo da cadeia de DNA ocorre ~ 10 μM, região onde a fração de moléculas ligadas da primeira isoterma é dominante. Próximo a essa concentração, a formação de agregados de 12 moléculas de pβCD ao longo da cadeia de DNA, torna-se importante e aumenta A de ~ 22 nm para ~ 26 nm (ou A^{-1} reduzindo de 0,045 a 0,038 nm⁻¹). A saturação das cadeias ocorre para a concentração de pβCD ~ 25 μM.

Propomos o seguinte mecanismo de interação entre a pβCD e o DNA. Inicialmente, são formados ao longo da cadeia de DNA agregados de 2-3 moléculas de pβCD. Esses agregados alteram localmente o comprimento de persistência de $A_0 = (40 \pm 3)$ nm para $A_1 = 18$ nm, aumentando o número de dobras da cadeia de DNA. Esse processo acontece principalmente de 0 – 10 μM de pβCD. A partir de 10 μM, forma-se na cadeia de DNA agregados de 12 moléculas de pβCD, esses agregados possuem comprimento de persistência local, $A_2 = 26 \pm 3$ nm, sendo responsável pelo leve aumento do comprimento de persistência na faixa de 10 – 25 μM. A partir de 25 μM ocorre a saturação da molécula de DNA com os agregados de pβCD.

Uma interessante comparação entre os nossos resultados e os resultados obtidos por Alves e colaboradores para βCD neutra pode ser feita [59]. Observamos que a pβCD afeta o comprimento de persistência da molécula de DNA na faixa de concentração de 0 – 25 μM. Determinamos anteriormente que cada pβCD possui cerca de 30 unidades de βCD. Sendo assim, a faixa de concentração em unidades de βCD torna-se 0 – 750 μM. Já Alves e colaboradores observaram que a partir de 3000 μM de βCD neutra ocorre alteração de A . Além disso, podemos comparar as constantes de associação típica com o DNA, para a pβCD (~ 10⁵ M⁻¹) enquanto para βCD neutra (~ 10² M⁻¹). Portanto, constatamos que a polimerização das ciclodextrinas potencializa as interações com a molécula de DNA.

4.4 Conclusões e Perspectivas do capítulo 4

Realizamos experimentos de pinça ótica em moléculas de DNA com p β CD. Verificamos que o comprimento de persistência variou com o aumento da concentração de p β CD de forma não monótona. Uma redução de A de ~ 40 nm para ~ 22 nm foi observada na faixa de $0 - 10 \mu\text{M}$ e um aumento menos acentuado de A entre $10 - 25 \mu\text{M}$ de p β CD. O ajuste dos dados de A em função da [p β CD] pelo modelo de dois sítios independentes acoplada com duas isotermas de Hill permitiu determinar os parâmetros físico químicos da interação p β CD – DNA. Já o comprimento de contorno não variou na faixa de concentração de p β CD estudada neste trabalho, o que mostra que a p β CD, assim como a β CD não atua como intercalante.

A interação do polímero com o DNA apresenta dois mecanismos diferentes de ligação dependentes da faixa de concentração. De $0 - 10 \mu\text{M}$ estruturas com 2-3 moléculas de p β CD são observadas ao longo da cadeia de DNA. Essas estruturas são capazes de reduzir o comprimento de persistência localmente de ~ 40 nm para ~ 18 nm. Interpretamos esse efeito como o aumento do número de dobras da cadeia de DNA induzida por esses pequenos agregados. Já na região entre $10 - 25 \mu\text{M}$, agregados com 12 moléculas de p β CD são formados ao longo da molécula de DNA, aumentando levemente o comprimento de persistência. A constante de ligação entre os agregados menores de p β CD e o DNA é 2,5 vezes maior do que a constante de ligação da cadeia de DNA com os agregados maiores. Observamos que a constante de ligação dos agregados de p β CD com o DNA é da ordem de 10^5 M^{-1} , valor três ordens de grandeza maior do que para a interação entre β CD nativa e DNA ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$). Portanto, a polimerização das ciclodextrinas potencializa a interação com a cadeia de DNA.

Entender como os agregados de p β CD afetam o processo de desnaturação da cadeia de DNA no regime de altas forças, assim como avaliar o efeito da adição de surfactantes catiônicos e aniônicos na modulação da interação entre a p β CD e o DNA desperta grande interesse e será objeto de futuros estudos.

Capítulo 5

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho avaliamos a formação de complexos $p\beta$ CD – surfactantes, sendo o primeiro trabalho relativo à caracterização estrutural da $p\beta$ CD em diferentes concentrações de surfactante. Propusemos um mecanismo de interação entre os surfactantes e a $p\beta$ CD. Na região de 0 – 0,5 mM de surfactante, a entrada das moléculas de surfactante expulsa as ciclodextrinas não ligadas covalentemente no complexo de $p\beta$ CD reduzindo o raio hidrodinâmico. Já para concentrações maiores do que 0,5 mM, a adsorção do surfactante induz um aumento do raio hidrodinâmico do complexo, devido aos efeitos de repulsão eletrostática entre as cabeças do surfactante em diferentes porções do complexo $p\beta$ CD – surfactantes. Já o aumento da força iônica reduziu os efeitos de desprendimento da ciclodextrinas livres e também reduziu o aumento do raio hidrodinâmico dos complexos.

Os parâmetros termodinâmicos da interação entre $p\beta$ CD e surfactantes sofreram apenas leve alteração com o aumento da força iônica, diferentemente do raio hidrodinâmico, onde o efeito de completo amortecimento das variações do raio foi observado para o complexo $p\beta$ CD – DTAB na presença de 15 mM de KCl. Então, sugerimos que os efeitos de desprendimento das ciclodextrina, bem como o aumento do raio para o complexo formado a 0 mM de KCl não envolvem quantidades significativas de energia em comparação às energias envolvidas na inserção das cadeias de surfactante nas cavidades da β CD.

Por último propomos que os surfactantes tem um potencial de uso interessante na síntese dos polímeros de ciclodextrina, pois eles poderiam ser usados na etapa de purificação da $p\beta$ CD, a fim de evitar a formação de complexos entre a $p\beta$ CD e as β CD livres. Esta proposta será objeto de futuros estudos.

Já para os complexos de DNA – $p\beta$ CD verificamos que o comprimento de contorno não se altera na faixa de concentração estudada e o comprimento

de persistência altera de maneira não monótona. Foi possível determinar os parâmetros físico-químicos através das medidas de A em função da $[p\beta CD]$. Observamos dois tipos de agregados de $p\beta CD$ que se ligam ao DNA. Para a concentração de 0 – 10 μM , agregados de 2-3 moléculas são formadas ao longo da cadeia de DNA e para a faixa de concentração entre 10 – 25 μM agregados de 12 moléculas de $p\beta CD$ são formadas ao longo da cadeia.

Outro resultado interessante veio da comparação da constante de ligação entre $p\beta CD$ com DNA ($\sim 10^5 M^{-1}$) com a constante de ligação dos complexos $\beta CD - DNA$ ($\sim 10^2 M^{-1}$). Sugerimos que a polimerização das ciclodextrinas potencializa a interação com a cadeia de DNA.

Os efeitos da adição de surfactantes catiônicos e aniônicos na associação entre DNA e $p\beta CD$ será objeto de futuros estudos, bem como o estudo da desnaturação da molécula de DNA na presença da $p\beta CD$ no regime de altas forças.

APÊNDICE A

Fluorescência do Pireno

Os resultado para a *cmc* de todos os surfactantes também foram obtidos pelo método de fluorescência do pireno, tanto em água quanto em solução 0,5% m/V de p β CD. Neste apêndice iremos mostrar os espectros de fluorescência do pireno em água e em solução de p β CD 0,5% m/V e as respectivas razões de bandas 1:3 em função da concentração dos surfactantes.

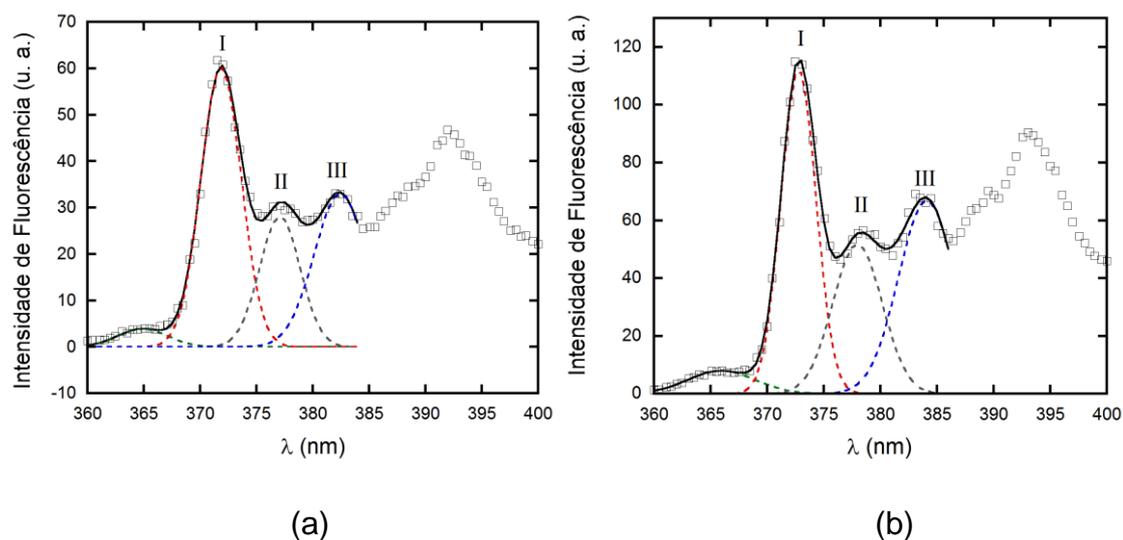


Figura A.1: Espectro de fluorescência obtido para o pireno em água (a) e em solução 0,5% m/V p β CD (b). As curvas pontilhadas são o resultado da deconvolução dos pontos experimentais e a curva contínua é o resultado da soma das curvas deconvoluídas.

As razões de banda 1:3 no espectro de fluorescência do pireno, geralmente, são calculadas pelo valor da fluorescência no ponto I dividido pela fluorescência no ponto III. Como a dispersão dos dados experimentais pode provocar erro nos valores determinados, resolvemos usar o método de deconvolução como mostrado na figura A.1. Usamos como a intensidade, os respectivos máximos dos picos deconvoluídos. No processo de deconvolução

foi considerada a fluorescência na região $360 < \lambda < 386$ nm, pois a segunda parte da curva gera distorções no pico III.

As curvas resultantes das razões de bandas em função da concentração dos surfactantes segue o comportamento de uma sigmoide decrescente e foi ajustado pela sigmoide de Boltzmann (eq. 2.24). Os valores de cmc_1 e cmc_2 foram calculados pelas equações em 2.25 e são apresentados na tabela A.1.

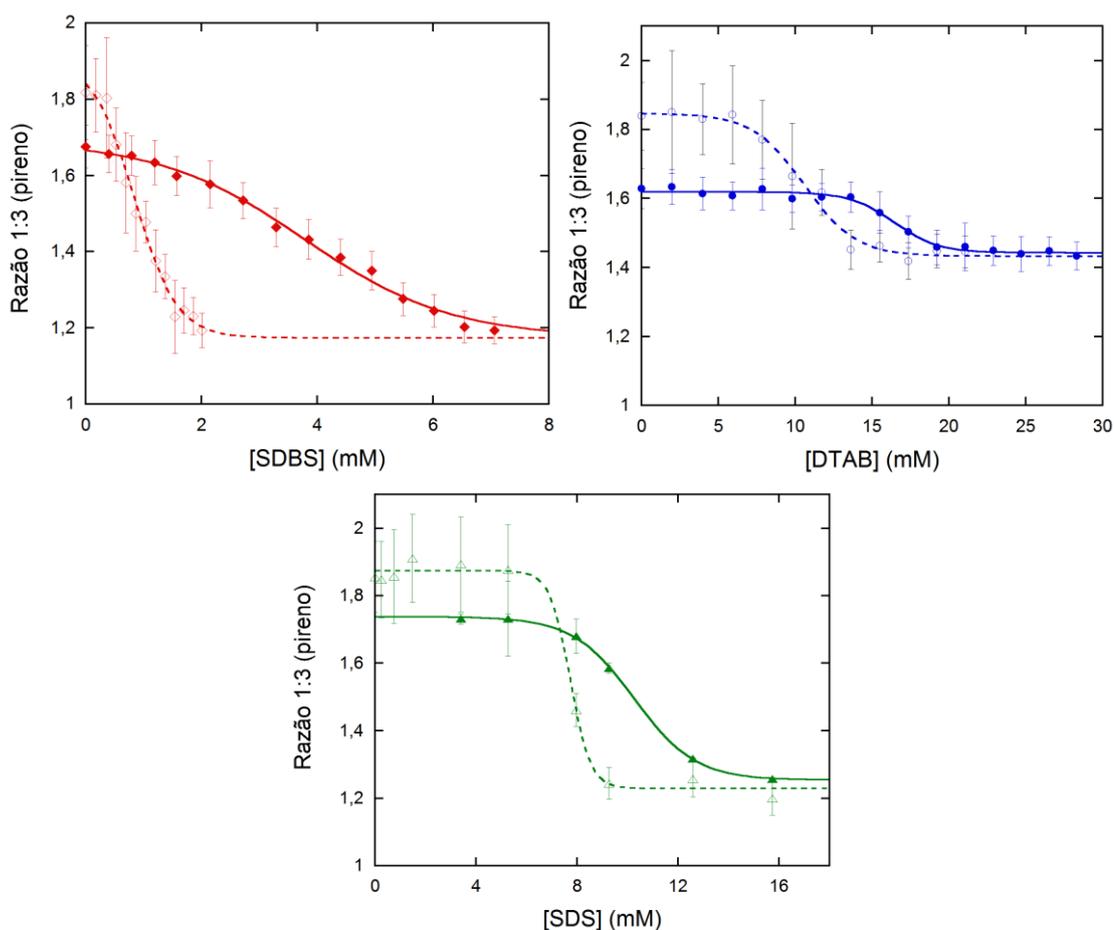


Figura A.2: Curvas de razão de banda 1:3 para diferentes concentrações dos surfactantes, símbolos preenchidos referem-se ao experimento em solução de 0,5% m/V de $p\beta$ CD e símbolos vazados em água.

Tabela A.1: Parâmetros obtidos do ajuste da sigmoide de Boltzmann em água e em solução 0,5% m/V de p β CD, x_0 é o centro da sigmoide, Δx é variação de y em torno de x_0 , cmc_1 e cmc_2 são cmc dada pela eq. 2.25 e cmc são valores da literatura e Δcmc_2 é a diferença de cmc_2 na solução de p β CD e em água.

Água						
	x_0	Δx	cmc_1 (mM)	cmc_2 (mM)	cmc (mM)	$x_0/\Delta x$
SDS	7,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3	7,7 \pm 0,2	8,5 \pm 0,8	7,91 – 8,28	19,3
DTAB	10,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3	10,6 \pm 0,1	14,0 \pm 0,7	13,01 – 15,03	6,3
SDBS	0,8 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,84 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3	1,87	2
0,5% m/V p β CD						
	x_0	Δx	cmc_1 (mM)	cmc_2 (mM)	Δcmc_2 (mM)	$x_0/\Delta x$
SDS	10,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	10,3 \pm 0,1	12,7 \pm 0,3	4 \pm 1	8,6
DTAB	16,5 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	16,5 \pm 0,3	19,3 \pm 0,7	5 \pm 1	11,8
SDBS	3,8 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	6,4 \pm 0,3	5 \pm 1	2,9

Segundo Aguiar e colaboradores [41] o cmc_2 deve ser usado quando $x_0/\Delta x > 10$. Para os nossos resultados usando água como diluente apenas o SDS cumpriu essa condição. Entretanto os valores encontrados para a cmc_2 são mais próximos aos valores apresentados na literatura para todos os surfactantes. Os valores de Δcmc_2 são bem maiores do que a Δcmc da tabela 3.2, indicando uma maior complexação dos surfactantes pela β CD e p β CD na presença do pireno. A explicação para esse fenômeno ainda não foi muito bem compreendida, necessitando de mais estudos.

As razões de banda 1:3 do pireno também foram determinadas para os surfactantes em soluções aquosa de 5 mM de KCl e 0,5% m/V p β CD + 5 mM KCl e são apresentadas na figura A.3. Os valores de cmc_1 e cmc_2 também foram calculados e são apresentados na tabela A.2.

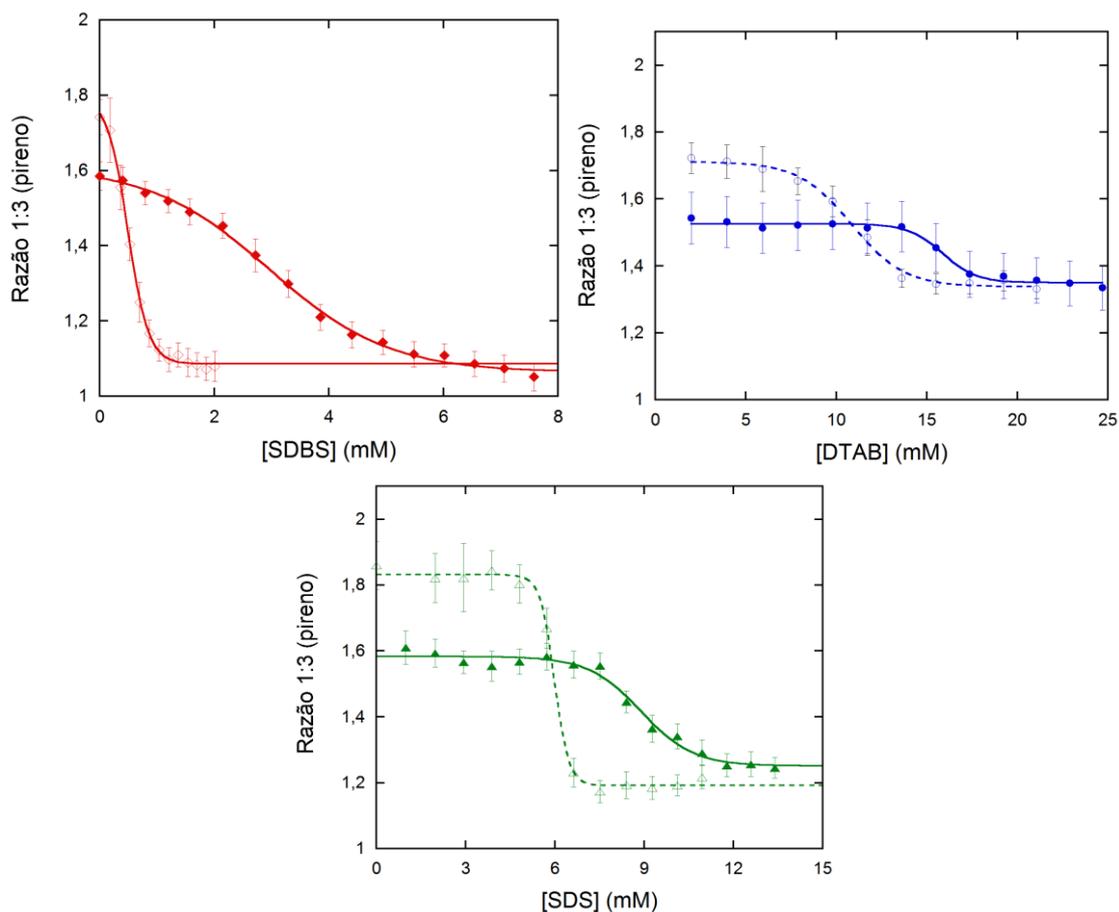


Fig. A.3: Curvas de razão de banda 1:3 para diferentes concentrações dos surfactantes, símbolos preenchidos referem-se ao experimento em solução de 0,5% m/V de p β CD + 5 mM de KCl e símbolos vazados em solução aquosa de 5 mM de KCl.

Tabela A.2: Parâmetros obtidos do ajuste da sigmoide de Boltzmann em solução aquosa de 5 mM de KCl e em 0,5% m/V de p β CD + 5 mM de KCl, x_0 é o centro da sigmoide, Δx é variação de y em torno de x_0 , cmc_1 e cmc_2 são a cmc dada pela eq. 2.25 e cmc são valores da literatura e Δcmc_2 é a diferença de cmc_2 na solução de p β CD e na solução aquosa.

Água + 5 mM de KCl						
	x_0	Δx	cmc_1 (mM)	cmc_2 (mM)	cmc (mM)	$x_0/\Delta x$
SDS	6,0 \pm 0,1	0,24 \pm 0,04	6,0 \pm 0,1	6,5 \pm 0,2	-	25
DTAB	10,8 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	10,8 \pm 0,2	13,8 \pm 0,6	-	6,7
SDBS	0,49 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01	0,85 \pm 0,03	-	2,7
0,5% m/V p β CD + 5 mM de KCl						
	x_0	Δx	cmc_1 (mM)	cmc_2 (mM)	Δcmc_2 (mM)	$x_0/\Delta x$
SDS	8,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	8,9 \pm 0,2	10,7 \pm 0,6	4,2 \pm 0,8	9,9
DTAB	15,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	15,9 \pm 0,2	17,7 \pm 0,6	4 \pm 1	17,7
SDBS	2,96 \pm 0,08	1,0 \pm 0,1	2,96 \pm 0,08	5,0 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	3

APÊNDICE B

Cálculo da Energia Eletrostática

No cálculo da energia eletrostática associada a formação do complexo $\rho\beta\text{CD} - \text{SDS}$ consideramos o polímero como uma estrutura esférica de raio R_h com N cargas elétricas em seu interior. Supomos que as cargas estão dispostas homogeneamente no volume, chamamos de d a distância mínima entre duas cargas, como ilustrado na figura B1.

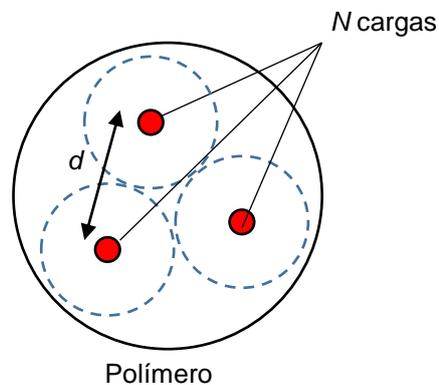


Figura B1: Estrutura esquemática de um polímero considerando-o constituído de N cargas espaçadas homogeneamente em que d representa a distância mínima entre duas cargas. Cada carga ocupa um volume esférico de raio $d/2$ (linhas pontilhadas).

O volume do polímero é, aproximadamente, o número de cargas vezes o volume da esfera definido por cada carga, cujo o raio é $d/2$, mostrado na figura pelas linhas pontilhadas. Podemos obter a relação entre d e o raio hidrodinâmico obtido na Figura 3-6 considerando a equação B1:

$$\frac{4\pi R_h^3}{3} = N \frac{4\pi (d/2)^3}{3} \quad (\text{B1})$$

onde R_h é o raio hidrodinâmico do polímero considerando que não haja o desprendimento de ciclodextrinas ($\approx 3,6$ nm). Ou seja, ignora-se os primeiros pontos na Figura 3.6 em que o raio hidrodinâmico reduz de valor com a concentração e estima-se o valor extrapolado desse raio para concentração igual a zero de SDS.

Rearranjando a equação B1 temos:

$$d = 2R_h N^{-1/3} \quad (\text{B2})$$

Observe que a equação B2 relaciona a distância entre as cargas com o número de cargas que são adicionadas ao polímero. Consideramos que o raio hidrodinâmico do complexo p β CD – SDS não muda até a energia eletrostática ser da ordem, pelo menos, da energia térmica como será discutido posteriormente. Note também, que a distância mínima entre as cargas diminui com o aumento do número de cargas. Essa consideração é bastante coerente, pois, a medida que novas moléculas de surfactante são distribuídas ao longo da cadeia do polímero e, considerando que a distribuição ocorre de maneira homogênea, é esperado que um surfactante fique cada vez mais próximo dos surfactantes restantes.

A energia eletrostática (E_{el}) é a energia clássica do eletromagnetismo de duas cargas separadas por d , vezes o valor das cargas interagindo. Nessa aproximação desconsidera-se a energia devido aos segundos vizinhos e considera-se que o número de pares interagindo é N . Logo:

$$E_{el} = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{e^2}{d} N \quad (\text{B3})$$

onde ϵ é a permissividade elétrica da água e e o módulo da carga do elétron.

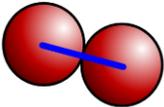
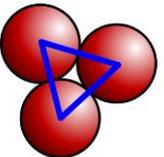
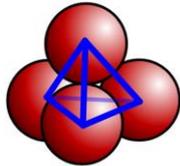
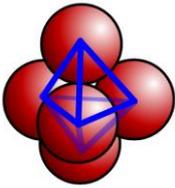
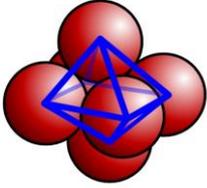
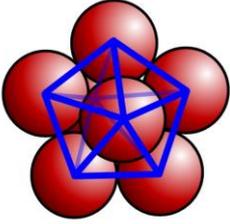
A consideração de que a energia eletrostática, na eq. (B3), é proporcional à N pode não ser uma boa aproximação. Desta maneira, em um cálculo mais adequado, precisamos contar quantos pares de cargas estão

interagindo. A construção das formas geométricas permite determinar quantos vizinhos imediatos cada carga tem.

Seja $N = 2$, então a energia eletrostática desta configuração de cargas é $\frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{e^2}{d}$, pois, neste caso, apenas um par de interação entre duas cargas é formada. Esse valor de energia será chamado de E_0 . Já para $N = 3$ as três cargas formarão um triângulo ao conectar o centro de esfera com as próximas vizinhas, como ilustrado na tabela B1. Ou seja, há três pares de cargas interagindo, sendo que cada par de carga contribui com E_0 , e então a energia total do sistema é, $E_{el} = 3E_0$. Note que o valor de d deve ser recalculado pela equação (B2), pois este valor depende do número de cargas. Repetindo o cálculo temos as figuras e energias mostradas na tabela B1, considerando as novas distâncias mantendo a restrição que o volume total das esferas deve se manter. O número de pares de interações será o número de arestas das figuras geométricas mostradas. Na última coluna é feito o cálculo da razão da energia eletrostática pela energia térmica. Nesse cálculo foram usados os valores:

$$\epsilon(\text{água}) = 707.10^{-12} \text{ F/m}; k_B = 1,381.10^{-23} \text{ J/K}; T = 298\text{K}; e = 1,6.10^{-19} \text{ C}$$

Tabela B1: Figuras geométricas representando a interação entre pares de cargas. N é o número de cargas associadas à cadeia do polímero e (n° de arestas) representa o número de pares de interações entre as cargas. A energia eletrostática do conjunto é $E_{el} = (n^\circ \text{arestas}) \times E_0$ e, na última coluna, é apresentada a razão da energia eletrostática pela energia térmica.

N	Forma geométrica	n° arestas	E_{el}	$E_{el} / k_B T$
2		1	E_0	0,1
3		3	$3E_0$	0,29
4		6	$6E_0$	0,58
5		9	$9E_0$	0,87
6		12	$12E_0$	1,16
7		15	$15E_0$	1,45

A energia eletrostática supera a energia térmica quando há $N=6$ moléculas de SDS por polímero, que equivale a uma concentração de 0,45 mM de SDS para uma solução de 0,5% m/V de p β CD. Essa concentração é próxima da encontrada para que o raio do complexo p β CD – SDS comece a aumentar, cerca de 0,5 mM, como ilustrado na Figura 3-6.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Szejtli, "Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry," *Chemical Reviews*, vol. 98, pp. 1743-1753, 1998.
- [2] S. V. Kurkov e T. Loftsson, "Cyclodextrin," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 453, pp. 167-180, 2013.
- [3] T. Utsuki, H. Brem, J. Pitha, T. Loftsson, T. Kristmundsdottir, B. M. Tyler e A. Olivi, "Potentiation of anticancer effect of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl α -cyclodextrin," *Journal of Controlled Release*, vol. 40, pp. 251-260, 1996.
- [4] E. Castagnino, M. Cangiotti, S. Tongiani e M. F. Ottaviani, "A study of free radical release from β -cyclodextrin-anticancer pro drugs adducts in water," *Journal of Controlled Release*, vol. 108, pp. 215-225, 2005.
- [5] M. H. Pourgholami, K. T. Wangoo e D. L. Morris, "Albendazole-Cyclodextrin Complex: Enhanced Cytotoxicity in Ovarian Cancer Cells," *Anticancer Research*, vol. 28, pp. 2775-2780, 2008.
- [6] J. J. Yin, S. Sharma, S. P. Shumyak, Z. X. Wang, Z. W. Zhou, Y. Zhang, P. Guo, C. Z. Li, J. R. Kanwar, T. Yang, S. S. Mohapatra, W. Liu, W. Duan, J. C. Wang, Q. Li, X. Zhang, J. Tan, L. Jia, J. Liang, M. Q. Wei, X. Li e S. F. Zhou, "Synthesis and Biological Evaluation of Novel Folic Acid Receptor-Targeted, β -Cyclodextrin-Based Drug Complexes for Cancer Treatment," *Plos One*, vol. 8, p. e62289, 2013.
- [7] J. Jing, A. Szarpak-Jankowska, R. Guillot, P. Pignot-Paintrand, C. Picart e R. Auzély-Velty, "Cyclodextrin/Parclitaxel Complex in Biodegradable Capsules for Breas Cancer Treatment," *Chemistry of Materials*, vol. 25, pp. 3867-3873, 2013.
- [8] S. M. L. Gontijo, P. P. G. Guimarães, C. T. R. Viana, Â. M. L. Denadai, A. D. M. Gomes, P. P. Campos, S. P. Andrade, R. D. Sinisterra e M. E. Cortés, "Erlotinib/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro and in vivo evaluation," *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 83, pp. 267-279, 2015.
- [9] I. M. Savic, V. D. Nikolic, I. Savic-Gajic, L. B. Nikolic, B. C. Radovanovic e J. D. Mladenovic, "Investigation of properties and structural characterization of the quercetin inclusion complex with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin," *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 82, pp. 383-394, 2015.
- [10] M. Yokoo, Y. Kubota, K. Motoyama, T. Higashi, M. Taniyoshi, H. Tokumaru, R. Nishiyama, Y. Tabe, S. Mochinaga, A. Sato, N. Sueoka-Aragane, E. Sueoka, H. Arima, T. Irie e S. Kimura, "2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent," *Plos One*, vol. 4, pp. 1-20, 2015.
- [11] E. Renard, A. Deratani, G. Volet e B. Seville, "Preparation and characterization of water soluble high molecular weight cyclodextrin-epichlorohydrin polymers," *European Polymer*

Journal, vol. 33, nº 1, pp. 49-57, 1997.

- [12] F. van de Manakker, T. Vermonden, C. F. van Nostrum e W. E. Hennink, "Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 3157-3175, 2009.
- [13] R. Gref, C. Amiel, K. Molinard, S. D. Mohammed, B. Sébille, B. Gillet, J. C. Beloeil, C. Ringard, V. Rosilio, J. Poupaert e P. Couvreur, "New self-assembled nanogels based on host-guest interactions: characterization and drug loading," *Journal of Controlled Release*, vol. 111, pp. 316-324, 2006.
- [14] M. Othman, K. Bouchemal, P. Couvreur, D. Desmaele, E. Morvan, T. Pouget e R. Gref, "A comprehensive study of the spontaneous formation of nanoassemblies in water by a "lock-and-key" interaction between two associative polymers," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 354, pp. 517-527, 2011.
- [15] C. Galant, V. Wintgens e C. Amiel, "A Reversible Polyelectrolyte Involving a β -Cyclodextrin Polymer and a Cationic Surfactant," *Macromolecules*, vol. 38, pp. 5243-5253, 2005.
- [16] C. Galant, C. Amiel, V. Wintgens e B. Sébille, "Ternary complexes with poly(β -cyclodextrin), cationic surfactant, and polyanion in dilute aqueous solution: a viscometric and small-angle neutron scattering study," *Langmuir*, vol. 18, pp. 9687-9695, 2002.
- [17] C. Galant e C. Amiel, "Tailorable polyelectrolyte complexes using cyclodextrin polymers," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, pp. 19218-19227, 2004.
- [18] C. Galant, C. Amiel e L. Auvray, "Ternary complex formation in aqueous solution between a β -cyclodextrin polymer, a cationic surfactant and DNA," *Macromolecular Bioscience*, vol. 5, pp. 1057-1065, 2005.
- [19] N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, I. M. Mavridis e K. Yannakopoulou, "Per(6-guanidino-6-deoxy)cyclodextrins: synthesis, characterisation and binding behaviour toward selected small molecules and DNA," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 5, pp. 125-131, 2007.
- [20] M. Benko e Z. Király, "Thermodynamics of inclusion complex formation of β -cyclodextrin with a variety of surfactants differing in the nature of headgroup," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 54, pp. 211-216, 2012.
- [21] J. W. Steed e J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Columbia: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- [22] L. Liu e Q. X. Guo, "The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrin," *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 42, pp. 1-14, 2002.
- [23] E. Junquera, G. Tardajos e E. Aicart, "Effect of the presence of β -cyclodextrin on the micellization process of sodium dodecyl sulfate or sodium perfluorooctanoate in water," *Langmuir*, vol. 9, pp. 1213-1219, 1993.
- [24] D. J. Jobe, V. C. Reinsborough e S. D. Wetmore, "Sodium Dodecyl sulfate micellar aggregation numbers in the presence of cyclodextrin," *Langmuir*, vol. 11, pp. 2476-2479,

1995.

- [25] E. Junquera, L. Pena e E. Aicart, "A conductimetric study of the interaction of β -cyclodextrin or hydroxypropyl- β -cyclodextrin with dodecyltrimethylammonium bromide in water solution," *Langmuir*, vol. 11, pp. 4685-4690, 1995.
- [26] M. Tsianou e A. I. Fajalia, "Cyclodextrin and surfactan in aqueous solution above critical micelle concentration: where are the cyclodextrin located," *Langmuir*, vol. 30, pp. 13754-13764, 2014.
- [27] C. Koopmnas e H. Ritter, "Formation of physical hydrogels via host-guest interactions of β -cyclodextrin polymers and copolymers bearing adamantyl groups," *Macromolecules*, vol. 41, pp. 7418-7422, 2008.
- [28] E. Freire, O. L. Mayorga e M. Straume, "Isothermal titration," *Analytical Chemistry*, vol. 62, pp. 950-959, 1990.
- [29] M. F. Oliveira, D. Suarez, J. C. B. Rocha, A. V. N. d. C. Teixeira, M. E. Cortés, F. B. Sousa e R. D. Siniestra, "Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system," *Materials Science and Engineering C*, vol. 54, pp. 252-261, 2015.
- [30] W. Loh, "A técnica de dispersão de Taylor para estudos de Difusão em Líquidos e suas aplicações," *Química Nova*, vol. 20, pp. 541-545, 1997.
- [31] C. Tanford, *Physical chemistry of macromolecules*, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1961.
- [32] S. F. Sun, *Physical chemistry of macromolecules*, Hoboken: John Wiley & Son, Inc., 2004.
- [33] B. J. Berne e R. Pecora, *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- [34] A.-M. Layre, V. Wintgens, N.-M. Gosselet, F. Dalmas e C. Amiel, "Tuning the interactions in cyclodextrin polymer nanoassemblies," *European polymer journal*, vol. 45, pp. 3016-3026, 2009.
- [35] P. Carpena, J. Aguiar, P. Galván-Bernaola e C. C. Ruiz, "Problems associated with the treatment of conductivity-concentration data in surfactant solutions: simulations and experiments," *Langmuir*, vol. 18, pp. 6054-6058, 2002.
- [36] K. Kalyanasundaram e J. K. Thomas, "Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 99(7), pp. 2039-3044, 1977.
- [37] A. Nakajima, "Fluorescence spectra of anthracene and pyrene in water and in aqueous surfactant solution," *Journal of Luminescence*, vol. 15, pp. 277-282, 1977.
- [38] K. P. Ananthapadmanabhan, E. D. Goddard, N. J. Turro e P. L. Kuo, "Fluorescence probes for critical micelle concentration," *Langmuir*, vol. 1, pp. 352-355, 1985.

- [39] N. J. Turro e P.-L. Kuo, "A fluorescence probe investigation of the effect of alkali metal ions on the micellar properties of a crown ether surfactant," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 90, pp. 837-841, 1986.
- [40] K. Hara e H. Suzuki, "High-pressure studies of a fluorescence probe for the critical micelle concentration in sodium dodecyl sulfate," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 93, pp. 3710-3713, 1989.
- [41] J. Aguiar, P. Carpena, J. A. Molina-Bolivar e C. Ruiz, "On the determination of the critical micelles concentration by the pyrene 1:3 ratio method," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 258, pp. 116-122, 2003.
- [42] G. I. Taylor, "Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube," *Proceeding of the Royal Society A*, vol. 219, pp. 186-203, 1953.
- [43] F. B. De Sousa, A. C. Lima, Â. M. L. Denadai, C. P. A. Anconi, W. B. De Almeida, W. T. G. Novato, H. F. Dos Santos, C. L. Drum, R. Langer e R. D. Sinisterra, "Superstructure based on β -CD self-assembly induced by a small guest molecule," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 14, pp. 1934-1944, 2012.
- [44] M. Perez-Rodríguez, G. Prieto, C. Rega, L. M. Varela, F. Sarmiento e V. Mosquera, "A comparative study of the determination of the critical micelle concentration by conductivity and dielectric constant measurements," *Langmuir*, vol. 14, pp. 4422-4426, 1998.
- [45] A. T. Tyouwua, S. G. Yiase e R. A. Wuanna, "Manipulation of concentration-conductivity data of sodium dodecyl sulphate and sodium dodecylbenzene sulphonate in KCl solution in relation to micellisation parameters," *Chemical Sciences Journal*, vol. CSJ79, pp. 1-9, 2012.
- [46] P. Brocos, N. Díaz-Vergara, X. Banquy, S. Pérez-Casas, M. Costas e Á. Piñeiro, "Similarities and Differences Between Cyclodextrin-Sodium Dodecyl sulfate Host-Guest Complexes of Different Stoichiometries: Molecular Dynamics Simulations at Several Temperatures," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, pp. 12455-12467, 2010.
- [47] E. Junquera, L. Pena e E. Aicart, "Micellar behavior of the aqueous solutions of dodecylethyldimethylammonium bromide. A characterization study in the presence and absence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin," *Langmuir*, vol. 13, pp. 219-224, 1997.
- [48] W. Brown, *Dynamic light scattering: the method and some applications (monographs on the physics and chemistry of materials)*, Oxford: Clarendon Press, 1993.
- [49] G. G. Gaitano e W. Brown, "Inclusion complexes between cyclodextrin and triblock copolymers in aqueous solution: a dynamics and static light-scattering study," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, pp. 710-719, 1997.
- [50] Y.-Y. Yu, S.-S. Chang, C.-L. Lee e C. R. C. Wang, "Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties," *Journal of physical Chemistry B*, vol. 101, pp. 6661-6664, 1997.
- [51] C. Schönbeck, P. Westh, J. C. Madsen, K. L. Larsen, L. W. Ståde e R. Holm, "Hydroxypropyl-substituted β -cyclodextrin: influence of degree of substitution on the thermodynamics of

- complexation with tauroconjugated and glycoconjugated bile salts," *Langmuir*, vol. 26(23), pp. 17949-17957, 2010.
- [52] C. Schönbeck, R. Holm, P. Westh e G. H. Peters, "Extending the hydrophobic cavity of β -cyclodextrin results in more negative heat capacity changes but reduced binding affinities," *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 78, pp. 351-361, 2014.
- [53] M. Nilsson, A. J. M. Valente, G. Olofsson, O. Söderman e M. Bonini, "Thermodynamic and Kinetic Characterization of Host-Guest Association between Bolaform Surfactants and α - and β -Cyclodextrins," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, pp. 11310-11316, 2008.
- [54] E. E. B. De Paula, F. B. De Souza, J. C. Da Silva, F. R. Fernandes, M. N. Melo, F. Frézard, R. M. Grazul, R. D. Sinisterra e F. C. Machado, "Insights into multi-equilibrium, superstructure system based on β -cyclodextrin and a highly water soluble guest," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 439, pp. 207-215, 2012.
- [55] Â. M. L. Denadai, K. I. Teixeira, M. M. Santoro, A. M. C. Pimenta, M. E. Cortés e R. D. Sinisterra, "Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine," *Carbohydrate Research*, vol. 342, pp. 2286-2296, 2007.
- [56] F. B. De Souza, Â. M. L. Denadai, I. S. Lula, C. S. Nascimento Jr., N. S. G. F. Neto, A. C. Lima, W. B. De Almeida e R. D. Sinisterra, "Supramolecular Self-Assembly of Cyclodextrin and Higher Water Soluble Guest: Thermodynamics and Topological Studies," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, pp. 8426-8436, 2008.
- [57] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Handbook of Pharmaceutical Excipients," em *Sodium Lauryl Sulfate*, Chicago, Pharmaceutical Press, 2009, pp. 651-653.
- [58] S. Dai e k. C. Tam, "Laser light scattering and isothermal titration calorimetric studies of poly(ethylene oxide) aqueous solution in presence of sodium dodecyl sulfate," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 292, pp. 79-85, 2005.
- [59] P. S. Alves, O. N. Mesquita e M. S. Rocha, "Controlling cooperativity in the β -cyclodextrin-DNA binding reactions," *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 6, pp. 3549-3554, 2015.
- [60] L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. de Oliveira, M. S. Rocha e O. N. Mesquita, "Quantitative assessment of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands," *Physical Review Letters*, vol. 109(24), pp. 248103(1)-248103(5), 2012.
- [61] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos e M. S. Rocha, "DNA-cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments," *Integrative Biology*, vol. 4, pp. 568-574, 2012.
- [62] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles e S. M. Block, "Stretching DNA with optical tweezers," *Biophysical Journal*, vol. 72, pp. 1335-1346, 1997.

- [63] A. Ashkin, "Optical trapping and manipulation of neutral particles using laser," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, pp. 4853-4860, 1997.
- [64] M. S. Rocha, "Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments," *Integrative Biology*, vol. 7, pp. 967-986, 2015.
- [65] M. S. Rocha, *Pinças ópticas: experimentos teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*, Belo horizonte: Departamento de Física - Universidade Federal de Minas Gerais -, 2008.
- [66] J. F. Marko e E. D. Siggia, "Stretching DNA," *Macromolecules*, vol. 28, pp. 8759-8770, 1995.