

**GEANY PERUCH CAMILLOTO**

**TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO ENTRE LACTATO E VESÍCULAS  
NANOESTRUTURADAS DE POLIDIACETILENO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C183t  
2012

Camilloto, Geany Peruch, 1984-

Termodinâmica de interação entre lactato e vesículas  
nanoestruturadas de polidiacetileno / Geany Peruch Camilloto.  
- Viçosa, MG, 2012.  
viii, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 72-83

1. Alimentos - Embalagens. 2. Termodinâmica. 3. Polímeros  
conjugados. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

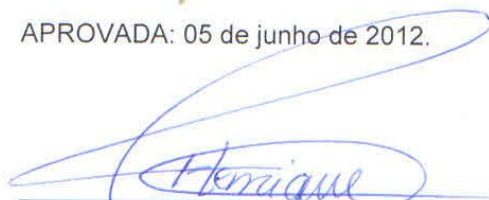
CDD 22. ed. 664.09

GEANY PERUCH CAMILLOTO

TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO ENTRE LACTATO E VESÍCULAS  
NANOESTRUTURADAS DE POLIDIACETILENO

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


APROVADA: 05 de junho de 2012.

  
Luis Henrique Mendes da Silva  
(Coorientador)

  
Ana Clarissa dos Santos Pires  
(Coorientadora)

  
Eduardo Basílio de Oliveira

  
Washington Azevedo da Silva

  
Nélio José de Andrade  
(Presidente)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da existência, pela proteção e pela presença em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, orientação e confiança.

Aos professores Luis Henrique Mendes da Silva e Ana Clarissa dos Santos Pires pela disponibilização de equipamentos e preciosos aconselhamentos.

Aos professores Paulo Cesar Stringheta pela disponibilização de equipamentos para realização deste trabalho.

Ao Professor Nélio José de Andrade pela disponibilização de equipamentos para realização deste trabalho, conselhos e especialmente pela participação na banca examinadora como presidente.

Aos Eduardo Basílio de Oliveira e Washington Azevedo da Silva pela participação na banca e valiosas sugestões.

À minha mãe, pelo amor incondicional, paciência, carinho, ensinamentos, conselhos e cobranças. Pelas horas de conversa ao telefone - Mãe, sem você eu não teria chegado até aqui.

Ao meu pai, pelo amor e dedicação. Apesar dos nossos desencontros, me ensinou a ter garra, dedicação e amor ao trabalho.

À minha irmã, pelo carinho, amor e conselhos. Gê, você é a melhor irmã do mundo.

A toda minha família, pelo amor, apoio, ajuda e incentivo em todos os momentos.

À Rêmili, Germanna, Isadora, Caio, Cícero e Renatinho pela fundamental ajuda durante os experimentos.

À turma presente nas reuniões gastronômicas de quinta-feira à noite, pela diversão, conversas e discussões.

Ao Renatinho, pela amizade, companheirismo, conselhos sugestões tanto profissionais quanto pessoais.

Ao Caio, “VERRRRDE”, pela amizade e por tornar as exaustivas jornadas de trabalho no LABEM mais alegres com seu humor refinado.

À Rêmili, “Lorão”, pela amizade e ajuda. Por me fazer rir com seus constantes questionamentos.

Ao Allan, pela amizade, constante humor e companheirismo.

Ao Cícero, pelo companheirismo e constante disposição para ajudar. Apesar do pouco tempo de convivência mostrou-se ser um verdadeiro amigo.

Ao Vicente, pela amizade e contribuição no meu desenvolvimento profissional.

Ao Éber Medeiros, pela presteza na aquisição dos insumos necessários para realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Embalagens, pela união, ajuda e alegre convivência.

Aos funcionários do DTA, pela contribuição em vários momentos.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

GEANY PERUCH CAMILLOTO, filha de José Maria Camilloto e Martha Peruch Camilloto, nasceu em João Neiva, Espírito Santo, em 10 de novembro de 1984.

Em maio de 2002, iniciou o Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em março de 2007.

Em março de 2007, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo Geral .....	3
2.2. Objetivos Específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Embalagens inteligentes .....	4
3.1.1. Sensores.....	5
3.1.1.1. Transdutores eletroquímicos.....	6
3.1.1.2. Transdutores térmicos.....	7
3.1.1.3. Transdutores óticos.....	8
3.2. Vesículas.....	9
3.2.1. Polidiacetileno.....	12
3.2.2. Estado da arte sobre vesículas de polidiacetileno .....	17
3.3. Lactato de cálcio e lactato de sódio.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.1. Delineamento experimental.....	34
4.2. Preparo das vesículas .....	34
4.3. Resposta colorimétrica das vesículas com lactato de cálcio .....	36
4.4. Determinação do pH.....	37
4.5. Determinação do tamanho das vesículas.....	37
4.6. Análise microcalorimétrica.....	38
4.7. Estudo da interação entre as vesículas e o lactato de cálcio .....	38
4.8. Avaliação das vesículas com lactato de sódio.....	39
4.9. Análise estatística dos resultados .....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
6. CONCLUSÃO .....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## RESUMO

CAMILLOTO, Geany Peruch, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Termodinâmica de interação entre lactato e vesículas nanoestruturadas de polidiacetileno.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Ana Clarissa dos Santos Pires.

Polidiacetilenos são polímeros conjugados que exibem propriedades cromáticas na presença de diferentes moléculas. Este trabalho teve com objetivos: I) desenvolver vesículas de ácido 10,12-pentacosadínico (PCDA) e diferentes lipídios (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG), esfingomielina (ES) e colesterol (CO)); II) avaliar a resposta colorimétrica das vesículas em função da concentração de lactato de cálcio e de lactato de sódio; III) avaliar o efeito da adição de lactato de cálcio e de lactato de sódio no pH das vesículas; IV) avaliar o efeito de diferentes lipídios e da adição de lactato cálcio e de lactato de sódio no tamanho das vesículas; V) quantificar a variação da energia livre de Gibbs e a variação da entalpia envolvida na interação entre as diferentes vesículas e lactato de cálcio e de sódio; VI) avaliar o efeito da adição de lactato de cálcio e de lactato de sódio na resposta colorimétrica, no pH e no tamanho das vesículas elaboradas em diferentes pHs. Observou-se que a incorporação de lipídeos nas nanoestruturas não impediu a polimerização dos monômeros de polidiacetileno uma vez que todas as vesículas apresentaram coloração azul intenso após a polimerização. As vesículas de PCDA, PCDA/DMPC, PCDA/DMPG e PCDA/ES/CO apresentaram diâmetro hidrodinâmico de  $106,12 \pm 0,06$ ;  $176,94 \pm 14,06$ ;  $213,36 \pm 5,82$  e  $361,51 \pm 51,41$  nm e pH de  $6,42 \pm 0,22$ ;  $6,13 \pm 0,15$ ;  $5,57 \pm 0,17$  e  $4,61 \pm 0,22$ ; respectivamente. Observou-se que a presença de lipídios nas nanoestruturas de polidiacetileno provocaram um aumento do diâmetro hidrodinâmico das vesículas e alteração no equilíbrio dos grupos carboxílicos presentes na superfície vesicular. Em pH de síntese e pH 7,0, todas as vesículas apresentaram transição colorimétrica na presença de lactato de cálcio e lactato de sódio, no entanto em pH 2,0 estas moléculas não

induziram à transição colorimétrica. O lactato de cálcio foi capaz de induzir uma maior resposta colorimétrica das vesículas de PCDA/DMPC e PCDA/ES/CO quando comparado ao lactato de sódio. A adição de lactato de cálcio induziu uma maior transição colorimétrica na vesícula de PCDA/DMPC quando comparada à de PCDA/ES/CO enquanto a adição de lactato de sódio provocou maior resposta colorimétrica na vesícula de PCDA puro. Observou-se que a variação da energia livre de Gibbs de interação ( $\Delta_{int}G$ ) entre as vesículas e lactato foi negativa nos pHs de síntese e 7,0, demonstrando que a interação entre as espécies foi termodinamicamente favorável. Por outro lado, em pH 2,0 esta interação não foi espontânea apresentando valor de  $\Delta_{int}G$  positivo. A partir de medidas microcalorimétricas, observou-se que a variação da entalpia de interação ( $\Delta_{int}H$ ) entre as vesículas e o lactato foi positiva e constante e que a interação entre as espécies e a transição colorimétrica são fenômenos endotérmicos governados entropicamente. A adição de lactato provocou aumento das nanoestruturas polidiacetilênicas, no entanto, o crescimento das vesículas foi associado à transição colorimétrica gerada pela mudança conformacional das moléculas polidiacetilênicas. Os resultados deste trabalho demonstraram que a presença de lactato provocou a transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo a interação entre as espécies dependente da composição das nanoestruturas vesiculares, da condição termodinâmica do meio (pH) e do contraíon da molécula de lactato.

## ABSTRACT

CAMILLOTO, Geany Peruch, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Thermodynamics of the interaction between lactate and nanostructured vesicles of polydiacetylene.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Ana Clarissa dos Santos Pires.

Polydiacetylenes are conjugated polymers that exhibit chromatic properties in the presence of different molecules. This work aimed: I) to develop vesicles of 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA) and different lipids (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DMPG), sphingomyelin (ES) and cholesterol (CO)); II) to evaluate the colorimetric responses of the vesicles as a function of calcium lactate and sodium lactate concentrations; III) to evaluate the effect of the addition of calcium lactate and sodium lactate on the pH of the vesicles; IV) to evaluate the effect of the addition of different lipids, calcium lactate, and sodium lactate on the size of the vesicles; V) to quantify Gibbs free energy and enthalpy changes related to the interaction between the different vesicles and sodium and calcium lactates; VI) to evaluate the effect of the addition of calcium lactate and sodium lactate on the colorimetric responses, pH, and size of vesicles prepared in different pHs. The incorporation of lipids into the nanostructures did not prevent the polymerization of the polydiacetylene monomers since all vesicles showed an intense blue color after polymerization. The vesicles of PCDA, PCDA/DMPC, PCDA/DMPG and PCDA/ES/CO showed hydrodynamic diameters of  $106.12 \pm 0.06$ ,  $176.94 \pm 14.06$ ,  $213.36 \pm 5.82$  and  $361.51 \pm 51.41$  nm, as well as pHs of  $6.42 \pm 0.22$ ,  $6.13 \pm 0.15$ ,  $5.57 \pm 0.17$  and  $4.61 \pm 0.22$ , respectively. The presence of lipids in the polydiacetylene nanostructures led to increased hydrodynamic diameters and changes in the balance of carboxyl groups on vesicle surfaces. In pHs of synthesis and 7.0, all vesicles showed colorimetric transitions in the presence of calcium lactate and sodium lactate, but in pH 2.0 such molecules did not induce colorimetric transitions. The calcium lactate caused higher colorimetric responses in the vesicles of PCDA/DMPC

and PCDA/ES/CO when compared to sodium lactate. The addition of calcium lactate induced higher colorimetric transition in the vesicles of PCDA/DMPC than in those of PCDA/ES/CO, whereas the addition of sodium lactate caused higher colorimetric responses in the vesicles of pure PCDA. The Gibbs free energy of interaction ( $\Delta_{\text{int}}G$ ) between the vesicles and lactate was negative in the pHs of synthesis and 7.0, demonstrating that the interaction between these species was thermodynamically favorable. Contrastingly, this interaction in pH 2.0 was not spontaneous, showing positive  $\Delta_{\text{int}}G$  values. From microcalorimetric measurements, it was observed that the changes in enthalpy of interaction ( $\Delta_{\text{int}}H$ ) between the vesicles and lactate was positive and constant, and that the interaction between the species and the colorimetric transition are endothermic phenomena entropically governed. The addition of lactate increased the size of the polydiacetylene nanostructures, though the growth of the vesicles was associated to the colorimetric changes due to conformational changes in polydiacetylene molecules. The outcomes of this work demonstrate that the presence of lactate induced colorimetric changes in polydiacetylene vesicles, and that the interaction between the species was dependent upon the composition of the vesicle nanostructures, the thermodynamic condition of the medium (pH), and the counterion of the lactate molecule.

## 1. INTRODUÇÃO

O monitoramento eficiente de compostos em alimentos que causam deterioração ou apresentam potencial risco a saúde do consumidor tem ganhado importância e atraído o interesse de pesquisadores visando atender as exigências dos consumidores modernos por alimentos seguros, de qualidade e mais próximos aos naturais. Dentre os compostos estudados destacam-se substratos microbianos, toxinas, aditivos sintéticos, ingredientes de plantas geneticamente modificadas e substâncias geradas na deterioração dos alimentos.

O desenvolvimento de sensores e biossensores eficientes para detecção de contaminantes na matriz de alimentos em tempo real tem se tornado objeto de estudo. Estes dispositivos são capazes de detectar rapidamente espécies químicas e, ou biológicas, tanto qualitativa como quantitativamente.

Polidiacetileno (PDA) é uma classe de polímeros conjugados derivados da polimerização, sob radiação ultravioleta, e via adição 1,4 de monômeros de diacetileno. Estes polímeros possuem propriedade cromática intensa variando do azul para o vermelho em resposta a estímulos externos. Essas mudanças colorimétricas podem ser facilmente percebidas pelo espectro de absorção no UV-visível, fluorescência ou até mesmo visualmente. Devido às propriedades colorimétricas do PDA estes compostos têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento sensores e biossensores.

Os PDAs podem se auto-organizar na forma de vesículas e filmes de Langmuir. A auto-organização na forma de vesícula tem sido intensamente investigada experimental e teoricamente devido às numerosas aplicações práticas destes agregados. Vesículas polidiacetilênicas têm mostrado ser um dispositivo promissor para detecção de vários compostos presentes em produtos alimentícios. No entanto, alimentos são matrizes complexas, que contêm moléculas de comportamentos diversos. Para serem amplamente empregados em sistemas inteligentes, os biossensores devem apresentar sensibilidade, especificidade, precisão, confiabilidade e baixo custo. Portanto, a

utilização de biossensores colorimétricos para alimentos exige a elucidação dos processos envolvidos na transição colorimétrica do polímero interagindo com diferentes moléculas em sistemas isolados. Além disso, a complexidade do comportamento vesicular exige estudos que auxiliem o entendimento do comportamento do processo molecular associado à transição colorimétrica destes sistemas.

Quando auto-organizados na forma de vesículas, os polidiacetenos têm se mostrado tolerantes à incorporação de moléculas receptoras como carboidratos, proteínas ou lipídeos. A presença de diferentes moléculas nas vesículas auxilia na especificidade deste agregado facilitando a identificação de uma grande variedade de compostos presentes na matriz alimentícia.

O lactato é uma molécula que pode estar presente nos alimentos de forma natural ou intencional. A presença de lactato pode ser desejável quando presentes em produtos fermentados ou indesejável quando sua produção caracteriza a deterioração de um produto. Como aditivo de alimentos, o lactato pode ser utilizado como estabilizante, espessante, conservante, adjuvante, entre outros.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de vesículas polidiacetilênicas incorporadas com diferentes lipídeos quando em presença de lactato de cálcio e lactato de sódio.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar termodinamicamente a interação entre vesículas de polidiacetileno e lactato de cálcio ou lactato de sódio, visando à determinação da força motriz responsável pela transição colorimétrica, bem como a obtenção de um sensor colorimétrico.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- a) Desenvolver vesículas de ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) e diferentes lipídios (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG), esfingomiéline (ES) e colesterol (CO));
- b) Determinar a resposta colorimétrica e o pH das vesículas em função da concentração de lactato de cálcio e de lactato de sódio;
- d) Avaliar o efeito de diferentes lipídios e da adição de lactato cálcio e de lactato de sódio no tamanho das vesículas;
- e) Quantificar a variação energia livre de Gibbs, a variação de entalpia e a variação de entalpia envolvidas na interação entre as diferentes vesículas e lactato de cálcio e de sódio;
- g) Avaliar o efeito da adição de lactato de cálcio e de lactato de sódio na resposta colorimétrica, no pH e no tamanho das vesículas com pH ajustado para 7,0 e 2,0.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Embalagens inteligentes**

Novas tecnologias de acondicionamento de alimentos estão sendo desenvolvidas com o objetivo de atender às exigências do consumidor ou as tendências de produção industrial para produtos alimentares com vida útil prolongada e qualidade controlada. Além disso, mudanças nas práticas de varejo, como a globalização do mercado, ou no modo de vida dos consumidores ofereceram grandes desafios para a indústria de embalagens de alimentos e agiram como forças motrizes para o desenvolvimento de novos conceitos de embalagem que prolonguem o prazo de validade, mantendo segurança e a qualidade dos alimentos (DAINELLI et al., 2008).

A embalagem inteligente é uma área da tecnologia de alimentos emergente que pode fornecer melhor conservação para os produtos e conveniência para os consumidores. Os sistemas de embalagens inteligentes visam melhorar a qualidade do produto, aumentar a segurança dos alimentos e, conseqüentemente, diminuir o número de reclamações dos consumidores e varejistas (HAN et al., 2005).

Segundo Rodrigues e Han (2003) as embalagens inteligentes podem ser divididas em dois grupos. As embalagens inteligentes simples contêm componentes que sentem o meio ambiente e comunicam as informações importantes para o adequado manuseio dos alimentos. As embalagens inteligentes de resposta ou interativas têm capacidade adicional, pois podem responder a mudança ambiental e, desse modo, impede a deterioração do produto (BRODY, 2000; KAREL, 2000).

Estes tipos de dispositivos podem ser divididos em três grupos. O primeiro tipo são os indicadores externos que são fixados fora da embalagem e incluem os indicadores tempo-temperatura e os indicadores de choque físico. O segundo tipo são os indicadores internos que são colocados *headspace* ou anexado à tampa no interior da embalagem. Indicadores de vazamento de

oxigênio e biossensores são exemplos deste tipo de embalagem (AHVENAINEN, 2003). O terceiro tipo de dispositivo são os indicadores que aumentam a eficiência do fluxo de informações e da comunicação eficaz entre o produto e o consumidor. Esses produtos incluem barra de códigos especiais que armazenam informações sobre os produtos, como a utilização, consumo e data expiração. Os dispositivos de rastreabilidade, anti-roubo, anti-falsificação, inviolabilidade dos produtos estão incluídos nesta categoria (DAY, 2003).

A variedade de indicadores que pertencem ao grupo de sistemas de inteligentes é de grande interesse para a cadeia de embalagem de alimentos. A maioria dos conceitos de embalagens inteligentes envolve o uso de sensores, indicadores e Identificação por Rádio Frequência (RFID).

### **3.1.1. Sensores**

Os sensores são dispositivos usados para detectar, localizar ou quantificar energia ou matéria, fornecendo um sinal de detecção ou medindo uma propriedade física ou química de resposta (KRESS-ROGERS, 1998a).

A maioria dos sensores contém duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. No receptor, informações físicas ou químicas são transformadas em uma forma de energia, que pode ser medida pelo transdutor. O transdutor é um dispositivo capaz de transformar a energia química ou física, que transportam as informações sobre a amostra, em um sinal analítico (KERRY et al., 2006).

Biossensores são dispositivos de análise que detectam, registram e transmitem as informações relativas à reações biológicas (YAM et al., 2005). Estes dispositivos consistem de um biorreceptor específico para um determinado alvo e um transdutor que converte sinais biológicos em resposta elétrica quantificável. Biorreceptores são materiais orgânicos, tais como enzimas, antígenos, microrganismos, hormônios e ácidos nucleicos. Os transdutores dependem do sistema e podem ser eletroquímicos, ópticos e calorimétricos (ALOCILJA E RADKE, 2003).

Os sensores químicos e os biossensores se desenvolveram rapidamente nos últimos anos. Os principais tipos de transdutores com potencial uso em sistemas de embalagem inteligentes são sinais eletroquímico, óptico ou térmico (KRESS-ROGERS, 1998a).

### **3.1.1.1. Transdutores eletroquímicos**

Abordagens eletroquímicas são amplamente utilizadas no desenvolvimento de sensores e biossensores. De acordo com o princípio de detecção, as técnicas eletroquímicas podem ser divididas em amperometria, condutimetria, potenciometria, voltametria e célula a combustível microbiana (SU et al., 2011).

A amperometria é operada a um dado potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência e a corrente sinal é gravada e correlacionada com a concentração da molécula alvo. Na detecção amperométrica, o sinal de corrente é gerado devido à redução ou oxidação de um produto ou intermediário metabólico eletroativo na superfície do eletrodo de trabalho (DING et al., 2008). Detectores amperométricos apresentam alta sensibilidade, são rápidos e econômicos, podendo ser facilmente utilizados dentro e fora do ambiente laboratorial (LEONARD et al., 2003).

A condutimetria é uma técnica que depende da mudança de condutividade em solução em função da produção ou consumo de espécies iônicas (LEI et al., 2006; SHULGA et al., 1994). A medida de condutividade é extremamente rápida e sensível, tornando biossensores condutimétricos muito atrativos. No entanto, todas as espécies carregadas resultam em mudança da condutividade, portanto, a seletividade de biossensores condutimétricos é relativamente baixa (MIKKELSEN e RECHNITZ, 1989)

A potenciometria envolve a medida de diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo referência e o sinal de potencial é dependente da concentração da molécula alvo. O transdutor empregado na técnica potenciométrica é, geralmente, um eletrodo sensor de gás ou um

eletrodo seletivo de ânions (BOBACKA et al., 2008; LEI et al., 2006). A sensibilidade e seletividade de biossensores potenciométricos são excelentes devido ao uso de eletrodos seletivos no sistema. No entanto, é necessário um eletrodo referência extremamente estável e preciso o que pode limitar a aplicação de biossensores potenciométricos.

A voltametria é a técnica mais versátil em análise eletroquímica. Tanto corrente quanto potencial podem ser medidos e registrados. A posição do pico de corrente está relacionada à um composto específico e a densidade do pico de corrente é proporcional à concentração das espécies correspondentes. A voltametria é capaz de detectar diferentes componentes que apresentam diferentes picos de potencial em um único experimento eletroquímico, ou seja, pode detectar simultaneamente diferentes compostos (WANG, 1985).

Célula a combustível microbiana (MFC – *cell fuel microbial*) convertem energia química em energia elétrica por meio da atividade metabólica de micro-organismos (RABAEY e VERSTRAETE, 2005). Como a produção de eletrecidade pode ser potencialmente alterada pelo consumo de componentes alvo por micro-organismos ou pela inibição de vias metabólicas por compostos tóxicos, MFC podem ser aplicadas como biossensores microbianos em análises *in situ* ou para o monitoramento de produtos químicos (SU et al., 2011).

### **3.1.1.2. Transdutores térmicos**

Nos biossensores com transdutores térmicos, o componente biológico, usualmente enzimas ou células microbianas imobilizadas, é empacotado em um pequena coluna próxima à um transdutor térmico, comumente um termistor. Esta técnica pode ser sensível a concentrações da molécula alvo de  $10^{-5}$  M. Uma vez que a maioria das reações catalizadas por enzimas ou micro-organismos são acompanhadas por considerável aumento de temperatura, este dispositivo apresenta maior aplicabilidade quando comparado à outros transdutores. Vários compostos relevantes no controle de qualidade de alimentos foram determinados utilizando transdutores térmicos, incluindo o ácido

ascórbico, lactato, glicose, triglicerídeos, colesterol, galactose, etanol, sacarose, penicilina e ácido oxálico. Além de enzimas e células microbianas, os anticorpos também já foram utilizados nestes dispositivos (LUONG et al., 1991).

### **3.1.1.3. Transdutores óticos**

A detecção ótica é outra técnica comumente utilizada em biossensores e é pode ser baseada na medida de luminescência, fluorescência, colorimétrica, entre outros.

A técnica de detecção por fluorescência é baseada na medida da intensidade de fluorescência, que por sua vez é proporcional à concentração da molécula alvo. A fluorescência pode ser detectada a um comprimento de onda maior após a excitação da substância fluorescente em um comprimento de onda menor. Biossensores fluorimétricos têm sido amplamente aplicado na química analítica devido a sua fácil construção usando técnicas de biologia molecular (IBRAHEEM e CAMPBELL, 2010). A detecção por fluorescência tem sido aplicada em biossensores microbianos que podem ser divididos em *in vivo* e *in vitro*. No biossensor microbiano *in vivo*, os micro-organismos são capazes de produzir a substância fluorescência sem a adição de um elemento fluorescente exógeno. No biossensor *in vitro*, a atividade metabólica de micro-organismos modifica o ambiente ao redor deles, resultando na mudança de emissão da luz devido à um elemento fluorescente exógeno (SUN et al., 2011).

A técnica de detecção por bioluminescência é muito utilizada em biossensores microbianos e baseia-se na detecção da mudança de luminescência emitida por micro-organismos vivos que respondem à uma molécula alvo de maneira dose-dependente. O gen *lux*, que codifica luciferase em micro-organismos, é o gene reportado mais popular em biossensores microbianos bioluminescentes (BORISOV e WOLFBEIS, 2008).

A técnica de detecção colorimétrica baseia-se na mudança de cor de um determinado composto que pode ser distinguida visualmente ou por um espectrofotômetro. Por ser um sistema simples e barato, a técnica colorimétrica

tem sido amplamente aplicada à fabricação de biossensores. Materiais que podem mudar de cor em virtude de estímulos externos têm despertado muito interesse de pesquisadores.

### **3.2. Vesículas**

A organização de moléculas anfifílicas na forma de vesículas tem sido intensamente pesquisada devido às numerosas aplicações práticas desses agregados multimoleculares (PIRES et al., 2010). Por exemplo, as vesículas são utilizadas para estudar o comportamento de fase, a interação proteína-ligante, a cristalização bidimensional, liberação de drogas, bem como são estruturas atraentes para aplicações em sensores (RINGS DORF et al., 1988).

Vesículas são estruturas fechadas, finas ( $< 10$  nm de espessura), frequentemente na forma esférica, que possuem em seu interior um volume de água ou outro solvente de aproximadamente  $10^5$ - $10^8$  nm<sup>3</sup>. As membranas das vesículas podem ser monocamada ou bicamada. As membranas monocamadas são formadas por moléculas anfifílicas que possuem duas cabeças hidrofílicas ligadas nas extremidades de um núcleo hidrofóbico. Membranas bicamadas possuem duas camadas independentes formadas por moléculas que apresentam uma parte hidrofílica ligada à extremidade de uma parte hidrofóbica (FUHRHOP E KÖNING, 1994).

Moléculas anfifílicas que não se organizam como micelas, geralmente se associam para formar vesículas ou bicamadas planas. Em geral, moléculas que apresentam duas cadeias alquílicas possuem unidades individuais cilíndricas, ou seja, área da secção transversal da cabeça hidrofílica igual à da cadeia alquílica, podendo formar bicamadas ou vesículas. Por outro lado, moléculas anfifílicas em forma de cone, com secção transversal da cabeça hidrofílica maior do que a da cadeia alquílica, formam micelas (Figura 1) (LEHNINGER, 1995).

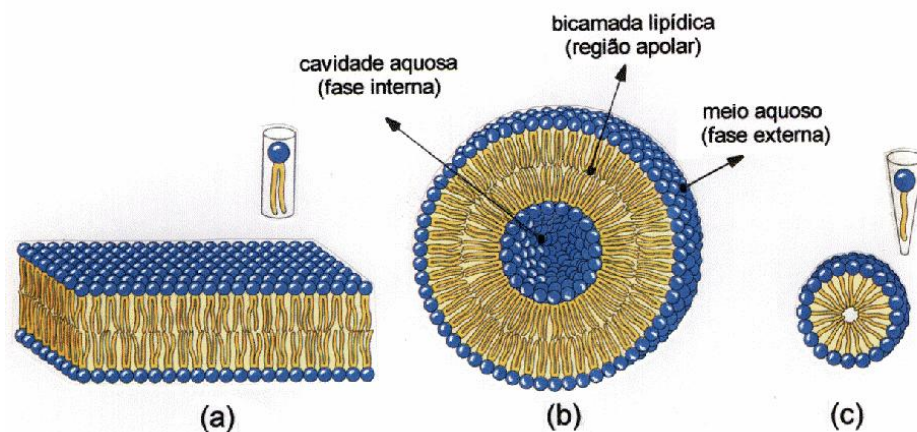


Figura 1 – Modelos de agregados supramoleculares de moléculas anfifílicas em meio aquoso (a) bicamada, (b) vesícula e (c) micela. Fonte: LEHNINGER, 1995.

Geralmente, moléculas que possuem pequenos grupos hidrofílicos e, ou grupos hidrofóbicos grandes e volumosos não são capazes de formar micelas e, portanto, se organizam na forma de vesículas (WACKLIN, 2007). A formação de vesículas pode, geralmente, ser aproximada à teoria de agregação de surfactantes (GRADZIELSKI, 2003; GUIDA, 2009) com base na simples consideração geométrica ser dependente da constituição molecular da molécula anfifílica parental. Em uma aproximação de primeira ordem, vesículas são formadas quando a razão do volume hidrofóbico ( $v_s$ ) pelo produto da área da cabeça hidrofílica ( $a_s$ ) e comprimento da cadeia ( $l_s$ ) é maior que  $\frac{1}{2}$  mas menor que 1. Esta razão, chamada parâmetro ou fator de empacotamento, determina a curvatura preferencial dos agregados e é descrita pela Equação 1:

$$P = \frac{v_s}{a_s \times l_s} \quad (1)$$

Estes três parâmetros ( $v$ ,  $l$ ,  $a$ ) dependem da conformação geométrica das moléculas, assim como das forças de atração e repulsão entre elas quando empacotadas no agregado (ZAPF et al., 2003). O volume ocupado por uma molécula no interior do agregado depende da competição entre forças atrativas

e forças repulsivas entre caudas hidrofóbicas e cabeças hidrofílicas, respectivamente (GIOKAS e VLESSIDIS, 2011).

A formação de vesículas ocorre quando os fosfolipídios são dispersos em meio aquoso, formando uma bicamada e separando o compartimento aquoso interno da fase aquosa externa. Nas vesículas, os grupos hidrofílicos ficam expostos às fases aquosas internas e externas, e as cadeias hidrocarbônicas voltadas para o interior do núcleo. As interações hidrofóbicas favorecem o empacotamento das caudas, minimizando o número de cadeias hidrocarbônicas expostas em meio aquoso. As interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre as cabeças hidrofílicas e as moléculas de água ajudam a estabilizar a estrutura vesicular (LEHNINGER, 1995). Desta forma, o conteúdo entálpico do sistema será reduzido (as interações entre água/água que são mais fortes serão mantidas) e a entropia do sistema será aumentada, já que as moléculas de água que não terão que interagir com a cauda hidrofóbica terão maior grau de liberdade translacional para alterar as configurações do sistema (PIRES, 2009).

A compreensão sobre as forças de interação intermoleculares e intramolecular das vesículas é fundamental para o entendimento do estado de agregação dessas estruturas, bem como da sua estabilidade física. As forças entre as membranas incluem forças de Van der Waals, interações eletrostáticas de longo alcance e hidratação de pequeno alcance (TASI et al., 2003). De acordo com Tanford (1973), forças de atração entre as caudas hidrofóbicas e forças repulsivas entre cabeças hidrofílicas determinam a forma geométrica e o tamanho das vesículas.

A formação de vesículas é favorável em termos de entalpia, pois diminui o contato entre cauda hidrofóbica e moléculas de água, sendo que essa contribuição para a redução da energia livre do sistema favorece a formação de grandes agregados. No entanto, a redução da entropia do sistema em virtude da existência de grandes vesículas tende a reduzir o tamanho dos agregados (BERGSTRÖM, 2001).

Recentemente, vesículas ancorados em suportes sólidos vêm sendo intensivamente estudados, principalmente, para o desenvolvimento de biossensores, que permitam a identificação simples e rápida de compostos de interesse (PIRES, 2009).

Os chamados materiais sintéticos “inteligentes” podem formar vesículas capazes de traduzir eventos biológicos de reconhecimento molecular que ocorrem na superfície do material em sinal mensurável (NEWNHAM E AMIN, 1999). Polímeros conjugados são exemplos de materiais “inteligentes”, uma vez que possuem propriedades eletrônicas e óticas versáteis.

Polímeros conjugados são promissores uma vez que possuem sensibilidade à estímulos externos, e podem sofrer mudanças significativas nas propriedades estrutural, química e física em resposta à flutuações nas condições ambientais, como por exemplo, temperatura, massa, luz, pH, estado de oxidação entre outros (SONG et al., 2002). Recentemente, estruturas moleculares contendo lipídeos sintéticos formadores de polímeros conjugados, como por exemplo, vesículas e filmes moleculares, oferecem uma linha atrativa para aplicação como biossensores (CHARYCH et al., 1996), uma vez que alguns sistemas conjugados podem reportar mudanças ambientais por meio de transição colorimétrica detectada fotometricamente ou visualmente em resposta à eventos de reconhecimento biomolecular específicos (SONG et al., 2002).

### **3.2.1. Polidiacetileno**

Polímeros conjugados tais como polianilina, polifenileno, polipirrol, politiofeno e polidiacetileno têm despertado atenção em função das suas atrativas propriedades elétrica e ótica. A estrutura eletrônica deslocalizada destes polímeros permite mobilidade dos carreadores de carga, bem como a forte absorção na faixa de UV-visível (SONG et al., 2002).

Agregados de polidiacetileno (PDA) compostos por blocos monoméricos como, o ácido pentacosaidinóico e o tricosaidinóico, vêm sendo amplamente estudados em função das suas propriedades colorimétricas específicas

(RINGSDORF et al., 1988; OKADA et al., 1998). Além disso, tais sistemas também têm atraído o interesse de pesquisadores em função da sua semelhança às estruturas biológicas organizadas.

Polidiacetileno (PDA) é uma classe de polímeros conjugados derivados da polimerização, sob radiação ultravioleta e via adição 1,4 de monômeros de diacetileno (Figura 1) (POTISATITYUENYONG et al., 2008). Após esta etapa, o polímero apresenta coloração azul, absorvendo a luz no comprimento de onda de 640 nm, devido à formação de uma estrutura com cadeia contendo dupla e tripla ligações alternadas (OKADA et al., 1998) (Figura 2).

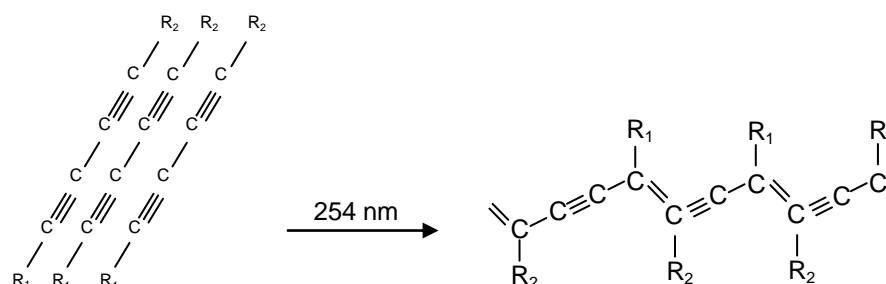


Figura 2 - Desenho esquemático da polimerização de monômeros de diacetileno a partir da radiação ultravioleta. Fonte: PIRES, 2009.

Polímeros, como o polidiacetileno, mudam suas propriedades estruturais, químicas e físicas em resposta às flutuações das condições ambientais (SONG et al., 2002), que podem ser exposição à luz (fotocromismo), ao estresse mecânico (mecanocromismo) (CARPICK et al., 2000), ao calor (termocromismo) (LEE et al., 2002) e às mudanças no ambiente químico e interação com moléculas químicas ou biológicas (afinocromismo/biocromismo) (CARPICK et al., 2004). Estas mudanças provocam uma transição colorimétrica rápida do polímero do azul para o vermelho, passando a absorver a luz no comprimento de onda de 540 nm (SONG et al., 2002).

A absorção óptica dos polidiacetilenos (PDAs) ocorre em consequência da transição eletrônica  $\pi - \pi^*$  dentro de uma estrutura  $\pi$  linear conjugada (POTISATITYUENYONG et al., 2008), sendo que o pico máximo de absorção da forma azul é observado próximo a 650 nm (banda de excitação) com um

pico menor em 590 nm (banda vibrônica). Quando a transição ótica ocorre, a forma vermelha é formada e o pico máximo de absorção encontra-se próximo a 550 nm, com a banda vibrônica em 500 nm (SU, 2005; KEW E HALL, 2006).

O polidiacetileno (PDA) pode se organizar na forma de vesículas ou filmes moleculares, conhecidos como filmes de Langmuir (Figura 3).

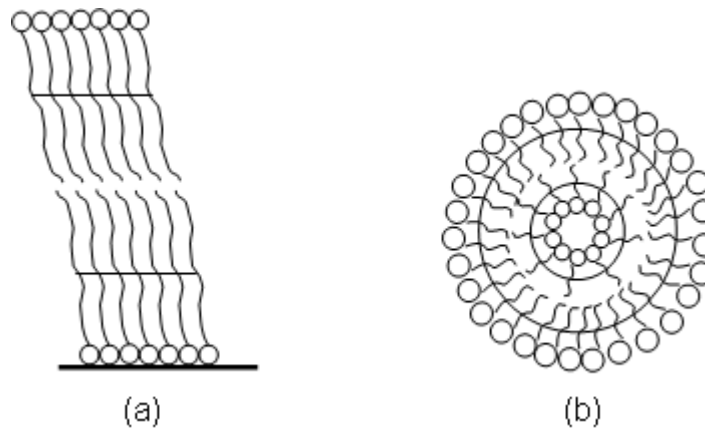


Figura 3 - Formas de organização do polímero polidiacetileno: (a) Filme ultrafino em suporte sólido, (b) Vesícula em solução. Fonte: PIRES, 2009.

Alguns autores sugerem que a mudança de coloração de azul para vermelho ocorre em função da mudança de estrutura de diacetileno para butatrieno (Figura 4), outros autores acreditam que a transição colorimétrica está relacionada ao grau de rotação dos grupos laterais em relação às ligações entre carbono-carbono na estrutura principal (CARPICK et al., 2004). Pires et al. (2010) propuseram que o mecanismo molecular envolvido na transição colorimétrica de vesículas de PDA está relacionada a um processo cooperativo em que grupos funcionais são submetidos à rotação ao redor das ligações carbono-carbono e, conseqüentemente, ocorre o aumento do número de moléculas na configuração *cis* de maior energia.



Figura 4 – Diagrama esquemático das duas estruturas de ressonância do polidiacetileno: (a) acetileno e (b) butatrieno.

A obtenção de vesículas biossensoras ideais exige, além de conveniência e praticidade, sensibilidade e especificidade. O ácido 10,12-pentacosadiinóico é um PDA mais resistente a fatores extrínsecos como temperatura e pH, sendo que somente mudanças mais bruscas nesses parâmetros podem interferir nas suas propriedades óticas (SU et al., 2004). Essas características tornam essa molécula uma boa opção para utilização como biossensores aplicados em alimentos.

De acordo com Song et al. (2002), as matrizes de PDA são muito tolerantes à incorporação de moléculas receptoras, que podem ser carboidratos, enzimas, proteínas ou anticorpos. Tais moléculas aumentam a especificidade dos agregados de PDA facilitando a identificação de uma grande variedade de compostos presentes na matriz alimentícia

Vesículas de PDA modificadas com diferentes moléculas receptoras têm sido estudadas para a identificação de uma grande variedade de moléculas biológicas (CHARYCH et al., 1993; REICHERT et al., 1995; PAN e CHARYCH, 1997). Estes estudos indicaram que a ligação de receptores biológicos aos blocos construtores do PDA não perturbam a estrutura e as propriedades cromáticas das vesículas polimerizadas. Além disso, a eficiência biológica dos receptores incorporados nestes sistemas é mantida.

Conforme discutido anteriormente, estudos com PDA tem demonstrado que estruturas modificadas são mais eficientes na detecção de moléculas biológicas. Estas estruturas modificadas apresentam, em geral, PDA conjugado na qual a fração hidrofílica foi quimicamente modificada a fim de exibir receptores biológicos na interface da vesícula (CHARYCH et al., 1993; REICHERT et al., 1995). A introdução de lipídeos naturais, tais como

esfigomielina, colesterol, fosfatidilcolina, na matriz de PDA tem sido considerada uma etapa importante para melhorar a aplicabilidade de materiais à base de PDA para utilizações biológicas e de diagnóstico. A incorporação de até 40% (fração molar) de lipídeos fisiológicos em vesículas de PDA não afetam o processo de polimerização ou a cor azul resultante dos agregados e apresentam uma variedade de promissoras aplicações de biossensoriamento destes sistemas (JELINEK et al., 1998; OKADA et al., 1999).

Recentemente, vesículas e filmes ultrafinos ancorados em suportes sólidos vêm sendo intensivamente estudados, principalmente, para o desenvolvimento de biossensores, que permitam a identificação simples e rápida de compostos de interesse. Uma quantidade considerável de pesquisas tem demonstrado a diversidade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de polidiacetilenos pra atuarem como moléculas receptoras de outras biomoléculas, detectando-as (4,17,22,23)

Su et al.<sup>73</sup> avaliaram o efeito da adição de etanol e 1-pentanol em vesículas de PDA. A resposta colorimétrica foi maior para vesículas adicionadas de 1-pentanol em função da sua maior hidrofobicidade comparado ao etanol. Os domínios hidrofóbicos da cadeia de PDA solubiliza moléculas mais hidrofóbicas. Ao contrário, moléculas mais hidrofílicas se dissolvem melhor na água do que nos domínios hidrofóbicos não alterando, assim, a conformação do PDA levando o sistema a uma menor resposta colorimétrica.

Solventes orgânicos têm sido associados à transição colorimétrica de vesículas e filmes de PDA. Fibras estabilizadas com polímeros embebidas com diferentes estruturas de PDA foram submetidas à exposição em diferentes solventes como clorofórmio, tetrahidofurano (THF), etil acetato (EA) e n-hexano. Observou-se que tanto o tipo de PDA quanto o de solvente influenciou na resposta colorimétrica das fibras. A alteração da cor de azul para vermelho foi atribuída ao solvatocromismo, conseqüente da perturbação do sistema provocada pela interação entre solvente e PDA.<sup>74</sup>

O efeito de etanol na transição de cor de vesículas de PDA também foi avaliado por Potisatityuenyong et al.<sup>1</sup> Em uma solução 45-50% de etanol, as

vesículas aparentaram coloração roxa, sendo que com mais de 55% do álcool houve transição completa e irreversível para vermelho.

Em outro trabalho, o solvatocromismo de agregados de PDA em solução também foi avaliado. PDAs contendo monômeros com diferentes comprimento de cadeias foram utilizados. Em clorofórmio, o PDA apresentou coloração amarela, entretanto, quando o clorofórmio foi misturado com hexano houve transição colorimétrica (Dei et al., 2008).

### **3.2.2. Estado da arte sobre vesículas de polidiacetileno**

Pesquisas envolvendo vesículas polimerizadas surgiram com o objetivo de elucidar a estrutura molecular e a dinâmica de membranas biológicas (RINGSDORF et al., 1988). Outro uso comum das vesículas foi como uma plataforma para testar o comportamento de polimerização e as propriedades de novas moléculas anfífilicas reativas em um ambiente supramolecular que pode ser facilmente acessível, mas tem um grau mais elevado de organização do que micelas e filmes de Langmuir (MILLER et al., 1999).

Ringsdorf (1981, 1988), Regen (1980), Chapman (1980) and O'Brien (1981) foram pioneiros no estudo de vesículas polimerizadas no final da década de 70 e início da década de 80, sintetizando uma variedade de lipídios com grupos reativos, tais como butadieno, diacetileno, vinil ou metacrilóil, localizados em vários pontos da molécula.

Os primeiros trabalhos envolvendo vesículas polidiacetilênicas foram realizados visando sintetizar fosfatidilcolinas contendo grupos diacetilênicos, estudar a estabilidade, a fotopolimerização e as propriedades físicas e espectrais dos agregados formados por essas moléculas (JOHNSTON et al., 1980a,b; HUB et al., 1980; O'BRIEN et al., 1981; LOPEZ et al., 1982; STOFFEL et al., 1982, JOHNSTON et al., 1983; HUPFER et al., 1983).

O primeiro relato de estudo envolvendo vesículas polidiacetilênicas surgiu na década de 80 por Hub et al. (1980) e Johnston et al. (1980a,b). Segundo Hub et al. (1980), a estabilização de vesículas por polimerização das

bicamadas lipídicas com manutenção da sua estrutura ocorre com fosfolipídios é efetuada análogos de fosfolipídios. Grupos diacetil estão presentes nas longas cadeias dos monômeros tornando fosfatidilcolinas mais reativas.

Johnston et al. (1980a) desenvolveram uma nova abordagem para estudos de biomembranas modelos e naturais a qual envolvia a síntese de fosfolipídios contendo grupos diacetilênicos por procedimentos organo-químicos convencionais ou pela incorporação de ácido graxo em micro-organismos. Os grupos diacetilênicos formavam ligações cruzadas após irradiação por luz ultravioleta. Segundo os autores, a polimerização ocorreu quando os lipídeos estão na fase cristalina, obtida por compressão em KBr, dispersão em água como lipossomos condicionados abaixo da temperatura de cristalização ou deposição na forma de multicamadas. A cadeia conjugada apresentou propriedades espectrais o que permite a produção de um polímero a ser detectado, sendo que pequenas concentrações do polímero conjugado de fosfolipídio pode ser disperso e detectado em uma outra estrutura lamelar de fosfolipídio. Estudos preliminares indicaram que células de *Acholeplasma laidlawii* podem incorporar ácidos graxos diacetilênicos em sua biomembrana e após a polimerização foram ligações cruzadas e polimerizam. O comportamento espectral foi similar ao observado com biomembranas modelos.

Posteriormente, as pesquisas exploraram a peculiar propriedade de transição colorimétrica de polidiacetenos (PDAs) em solução. Estudos realizados mostraram que em função da propriedade ótica dos PDAs, estes podem ser utilizados para monitorar qualquer parâmetro ambiental como exposição tempo-temperatura, pressão, exposição à radiação, exposição à gás, pH e umidade. Os PDAs começaram a ser utilizados em sistemas inteligentes acoplados aos códigos de barra indicando a dose de radiação ou tempo-temperatura por meio de mudança colorimétrica (CHU e XU, 1991).

Ahl et al. (1990) desenvolveram um método de incorporar a proteína bacteriorodopsina em bicamadas polimerizadas compostas de fosfatidilcolina diacetilênica e fosfolipídio não polimerizável. Os resultados sugeriram que

sistemas com misturas dos lipídeos podem melhorar a extensão da polimerização e a incorporação de proteínas em bicamadas polimerizadas.

Várias aplicações biológicas e biotecnológicas foram encontradas para os polímeros conjugados auto-organizados. Jelinek et al. (1998) desenvolveram uma membrana sintética à base de PDA auto-organizado que foram reponsáveis pela atividade enzimática de fosfolipases, uma classe ubiqüitária de enzimas que catalizam a hidrólise de fosfolipídios no interior de membranas celulares. Observou-se que fosfolipases apresentaram atividade em vesículas formadas de PDA e dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Além disso, a reação enzimática induziu a transição ótica na matriz de PDA. Os resultados indicaram que as mudanças colorimétrica e estrutural da matriz de PDA foram diretamente relacionadas à catálise interfacial pela fosfolipase. Este novo método biocatalítico de induzir a transição ótica em polímeros conjugados podem ajudar na triagem de novos compostos inibidores de enzimas.

A primeira demonstração das potenciais aplicações biológicas do PDA foi a detecção colorimétrica do vírus influenza por estruturas bicamadas polimerizada (CHARYCH et al., 1993, 1996; LINDSELL et al., 2000; REICHERT et al., 1995). Os autores incorporaram um análogo de ácido siálico, um receptor específico para hemaglutinina do vírus influenza, à camada de PDA e obtiveram sinais de transição colorimétrica em resposta à ligação do vírus na superfície do material. Desde então, vários pesquisadores têm estudado o desenvolvimento de estruturas à base de PDA para detecção da chave de interação proteína-proteína (KOLUSHEVA et al., 2001; TRESTER-ZEDLITZ et al., 2003).

A infecção provocada por *Vibrio cholerae*, por exemplo, é resultado da ingestão de água ou alimento contaminados, da sobrevivência desta bactéria às condições adversas impostas pelo organismo humano, da colonização do intestino pelo micro-organismos e, finalmente, da produção da toxina da cólera (CT). Esta toxina é do tipo A-B, sendo que a sub-unidade B é a responsável pela adesão ao gangliosídeo GM1 presente na célula hospedeira (SALYERS e WHITT, 1994). Com base no conhecimento da interação entre GM1 e CT, Pan et al. (1997) desenvolveram vesícula de PDA e GM1 visando à detecção

colorimétrica de CT. Segundo o mesmo princípio, Gangliosídeos GM1 e GTb1 foram incorporados em filmes de PDA visando à identificação de CT e toxina botulínica. A Figura 5 ilustra a transição colorimétrica do filme contendo GM1 na presença de CT. Estes resultados foram significativos uma vez que eles indicaram que o processo biológico ocorrendo na interface das vesículas de PDA podem induzir rearranjos estruturais dentro da rede de PDA conjugado resultando na mudança colorimétrica visual do azul para o vermelho. Portanto, a cadeia carbônica do polímero nestes sistemas pode reportar processos biológicos interfaciais.



Figura 5 – Dados colorimétricos para biossensor contendo GM1 como molécula receptora para toxina da cólera: (a) filme antes da presença da toxina e (b) filme após a presença da toxina (CHARYCH et al., 1996).

A estabilidade de vesículas de PDA funcionalizadas com aminoácidos foi avaliada por Cheng e Stevens (1998). Observou-se que à medida que o pH foi aumentado em função da adição de NaOH, ocorreu transição colorimétrica imediata de azul para vermelho.

Ma et al. (1998) desenvolveram vesículas polidiacetilênicas incorporadas com dioctadecil gliceriléter- $\beta$ -glicosidase como receptor. As vesículas apresentaram transição colorimétrica de azul para vermelho quando em contato com *Escherichia coli*, mas não exibiram sensibilidade a pequenos aminoácidos. Estes resultados mostraram que o potencial de utilização de estruturas lipídicas funcionalizadas com polidiacetileno como biossensores para diagnóstico de novas doenças.

Jonas et al. (1999) desenvolveram um lipídio diacetilênico contendo hidrazida como extremidade hidrofílica. Para testar o seu comportamento, os lípidios hidrazida foram polimerizados na forma de vesículas. Os autores descobriram que as vesículas sofrem uma alteração de cor reversível nunca observada quando o pH da solução aquosa circundante foi alterada de ácido para básico. Este comportamento foi atribuído à ligação de hidrogênio da hidrazida foi considerado um avanço significativo no desenvolvimento de sistemas de detecção reutilizável.

Spevak et al. (1995), Carych et al. (1996) e Pan e Charych (1997) mostraram que vesículas incorporadas com moléculas receptoras específicas para toxinas e vírus sofrem mudança colorimétrica do azul para vermelho em resposta à ligação do patógeno na interface.

Kolusheva et al. (2000) demonstraram que vesículas mistas, compostas de PDA, fosfolípidios e ionóforos (valinomicina e monesina), exibiram transição colorimétrica na presença de íons específicos ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  e  $\text{Cs}^+$ ). A transição colorimétrica, neste caso, foi induzida pela interação entre complexos íon-ionóforo e vesículas de PDA/fosfolípido. Os autores concluíram que a especificidade iônica foi determinada pela afinidade de moléculas ionóforas adicionadas nas vesículas permitindo, assim, a aplicação do sistema como sensor de íon seletivo.

Kolusheva et al. (2001) desenvolveram um novo sistema químico que utilizou vesículas de PDA com fosfatidilcolina para facilitar a detecção colorimétrica rápida de interação antígeno-anticorpo.

Vesículas de PDA/lipídio foram utilizadas para estudar a ligação de indolicidina em membranas e a sua penetração relativa. As análises colorimétricas e de fluorescência mostraram que uma indolicidina análoga com um resíduo de prolina e de triptofano substituídos com lisinas apresentaram interação mais pronunciada com a superfície da vesícula quando compara à indolicidina e, particularmente, um indolicidina análoga com substituição de todas prolinas por resíduos alanina exibiram inserção mais profunda na bicamada lipídica. A incorporação de lipopolissacarídeos nas vesículas

permitiram maior interação e incorporação de peptídios na interface lipídio/água (HALEVY et al., 2003).

Rozner et al. (2003) descreveram aplicações de um ensaio colorimétrico baseado em vesículas de PDA/lipídio para análise e triagem de interações entre membranas e enzimas lipolíticas, peptídeos e íons e para estudo do efeito da composição lipídica nas propriedades da membrana. Os agregados de polímero-lipídio sofreram transição colorimétrica visível e quantificável após interação interfacial e perturbação por variados processos bioquímicos. Especificamente, os experimentos demonstraram que o ensaio colorimétrico pode ser ajustado para detecção seletiva de reações enzimáticas com diferentes espécies de lipídios.

Ahn et al. (2003) reportaram o efeito da temperatura e pH sobre o termocromismo reversível de filmes moleculares contendo PDA. Verificou-se que o filme produzido apenas com PDA não mostrou cromismo reversível após o estímulo da alteração do pH. De acordo com os autores, as ligações de H entre o PDA polimerizado não são fortes o suficiente para manter a organização molecular requerida para o cromismo reversível. A adição de outro grupo funcional pode aumentar a estabilidade das interações nos filmes, dando condições para a reversibilidade.

A interação entre surfactantes e vesículas de PDA foi estudada por Su et al. (2004). Foram utilizados surfactantes aniônico, catiônico e não iônico, sendo que houve diferentes respostas colorimétricas em função da estrutura dos compostos. Observou-se que a adsorção da molécula catiônica na vesícula de PDA foi favorecida por interações eletrostáticas. De acordo com os autores, o surfactante catiônico se inseriu nos domínios hidrofóbicos da vesícula, alterando a conformação do polímero e, conseqüentemente, provocando transição colorimétrica visível. No entanto, os compostos não iônico e aniônico exibiram baixa resposta colorimétrica, evidenciando a influência da estrutura no processo.

Sun et al. (2004) avaliaram a influência da presença de metais na interação específica entre *E. coli* K12 e derivado de manose. Foram estudados

os íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Zi}^{+2}$ . Observou-se que a presença de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Ag}^+$  aumentaram a resposta colorimétrica. Por outro lado,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  inibiram o reconhecimento molecular e  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Zi}^{+2}$  provocaram uma ligeira redução no biocromismo. Segundo os autores, alguns cátions podem servir como ponte para a interação molécula receptora/molécula alvo.

Vários trabalhos foram desenvolvidos visando à detecção de *E. coli* através da alteração da cor do PDA. Vesícula de PDA funcionalizada com glicolipídio foi capaz de detectar *E. coli* em suspensão com concentração aproximada de  $9 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>. Além disso, utilizou-se também no processo de formação da vesícula biossensora, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), um fosfolipídio. A interação entre bactéria e vesícula provavelmente foi intermediada pela pili tipo I presente em *E. coli* e em outras bactérias Gram-negativas (Su et al., 2005). De acordo com os autores, a presença de fosfolipídios favorece a transição colorimétrica, uma vez que eles auxiliam a mimetizar a superfície célula da mucosa, que é alvo na primeira etapa de processos infecciosos.

Vesícula composta por uma mistura de PDA, fosfolipídio e colesterol foi utilizada para detecção de streptolisina O (SLO), uma toxina formadora de poros na membrana, que é produzida por *Streptococcus pyrogenes*. A presença de colesterol na vesícula deve-se ao fato de que este é o primeiro alvo da toxina no organismo (MA e CHENG, 2005).

Kim et al. (2005) observaram forte interação entre  $\alpha$ -ciclodextrina (CD) e moléculas de PDA. As ciclodextrinas são conhecidas por formarem complexos com uma grande variedade de moléculas. Os autores avaliaram a interação entre vesículas de PDA e  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ciclodextrina antes e após a polimerização. Observou-se que a adição de  $\alpha$ -CD em vesículas não polimerizadas ocasionou a formação de precipitado formado por PDA +  $\alpha$ -CD, sugerindo a formação de complexos de inclusão. Também observou-se que vesículas adicionadas de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD adquiriram coloração azul após a polimerização com luz UV, o que não foi observado nas vesículas contendo  $\alpha$ -CD, indicando que esta molécula é

capaz de perturbar a organização da estrutura monomérica de PDA. Além disso, neste estudo avaliou-se a influência da adição das CDs em vesículas polimerizadas e verificou-se mudança dramática da cor das vesículas incorporadas com  $\alpha$ -CD, demonstrando a interação entre as duas estruturas.

Wang et al. (2006) utilizaram vesículas de PDA funcionalizadas com seqüências de oligonucleotídeos como indicador de transição colorimétrica e marcas de amplificação durante a detecção de oligonucleotídeos. O método descrito foi simples, rápido e apropriado pra detecção de oligonucleotídeos visualmente. A influência da presença de DMPC na mudança de cor das vesículas durante a detecção de oligonucleotídeos também foi avaliada. Os resultados demonstraram que a presença de DMPC nas vesículas é um fator crucial para uma maior sensibilidade do sensor à base de PDA.

Lee e Kim (2007) avaliaram a transição colorimétrica provocada por  $\alpha$ -CD em diferentes vesículas formadas por PDA funcionalizado e verificaram que a molécula só foi capaz de induzir a alteração de cor de azul para vermelho nas estruturas em que o efeito do termocromismo foi irreversível. Estes resultados mostram que interações fortes entre os grupos hidrofílicos do PDA, que conferem a reversibilidade do termocromismo, não são perturbadas pelas ciclodextrinas. Além disso, os autores também concluíram que a reação com  $\alpha$ -CD indica a irreversibilidade colorimétrica do PDA.

Lee et al. (2007) avaliaram o efeito do estresse mecânico em vesículas de PDA preparadas em diferentes soluções, poli(vinil álcool) (PVA) 2% + borato de sódio 1% (PVA/B); PVA 15% e ácido hialurônico 1% (HA). Verificou-se que o estresse mecânico provocou transição colorimétrica nas vesículas de PDA em solução de PVA/B. Não houve mecanocromismo nas vesículas em solução de PVA e HA. De acordo com os autores, a solução de PVA/B forma redes e estas redes dificultam o alinhamento das cadeias do polímero contra o fluxo de tensão. Desta forma, a solução de PVA/B promove um estresse muito maior do que o provocado pelas outras soluções.

Vesículas de PDA foram utilizadas para avaliar a transição termocrômica no intervalo entre 20 °C e 90 °C. Observou-se que com o aumento da

temperatura houve deslocamento hipsocrômico, do pico de máxima absorção referente à cor azul, que foi associado à movimentação das cadeias do polímero. Além disso, em temperaturas intermediárias, a solução vesicular adquiriu também coloração roxa que demonstrou ser reversível quando foram realizados ciclos de aquecimento/resfriamento das vesículas. No mesmo trabalho, a adição de NaOH em vesículas de PDA foi utilizada para o estudo do efeito do pH sobre o cromismo da estrutura. A solução vesicular mostrou coloração roxa para valores de pH entre 9,7 e 10,5 e tornaram-se vermelhas em pH maior do que 10,7, sendo que com a redução do pH as vesículas não voltaram à cor inicial. Desta forma, a cor roxa pode ser interpretada como uma combinação de vesículas azuis e vermelhas (POTISATITYUENYONG et al., 2008).

Guo et al (2007) estudaram o efeito da temperatura na intensidade de fluorescência de vesículas de PDA contendo BODIPY 558, um reagente fluorescente insensível à temperatura. A fluorescência do BODIPY foi consideravelmente reprimida em membranas diacetilênicas polimerizadas, mas foi recuperada pelo aumento da temperatura da solução vesicular. O mecanismo de repressão foi investigado e, os autores sugeriram que a repressão da fluorescência e a recuperação estão associadas com a conformação da cadeia de PDA conjugada.

Nagy et al. (2008) desenvolveram vesículas contendo gliconanopartículas de Galactose- $\alpha$ -1-galactose, como moléculas receptoras. A técnica mostrou-se rápida, sensível e altamente específica.

Boullanger et al. (2008) desenvolveram vesículas de PDA incorporadas com glicolipídios e observaram que na presença de proteínas (lecitina, IgG e vírus) ou micro-organismo (E.coli) capazes de se ligar ao glicolipídio, o reconhecimento na interface vesicular resultou na mudança de cor de azul para vermelho. A síntese de novos glicolipídios e o estudo da incorporação dos mesmos em estruturas de PDA permitiram a otimização do reconhecimento de parâmetros no que diz respeito à estrutura dos conjugados de PDA, idealidade das misturas PDA/glicolipídios, fração molar de PDA/glicolipídios, pH e tamanho

das vesículas. A rapidez e sensibilidade do fenômeno (usualmente visível) juntamente com a simplicidade de sua quantificação (espectro UV-visível) torna este sistema uma boa opção para o desenvolvimento de biossensores.

You et al. (2009) estudaram a reversibilidade colorimétrica de vesículas polimerizadas de diacetileno com fração substituída por p-nitro azobenzeno (PNADA) e de ácido 10,12-pentacosadinóico/PNADA sob estímulo térmico e fótonico. A forte interação intermolecular entre mesogens de azobenzeno dentro do agregado, vesículas de PNADA mostraram maior estabilidade e resposta termocrômica completamente reversível. Vesículas de ácido 10,12-pentacosadinóico/PNADA apresentaram reversibilidade parcial das propriedades cromáticas sob estímulos térmicos e fotônicos, o que proporcionou um novo sistema modelo para a compreensão do mecanismo de transição cromática de materiais polidiacetilênicos.

Chen et al. (2010) desenvolveram um novo modelo à base de PDA com intensidade de fluorescência com relação linearmente dependente em uma ampla faixa de temperatura, que pode ser aplicado como um preciso sensor de temperatura em ambientes biológicos ou químicos em função da biocompatibilidade de vesículas de PDA. A intensidade de fluorescência foi notavelmente melhorada após a adição de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e o sinal de fluorescência manteve-se linear e proporcional à temperatura na faixa de 25 °C a 80 °C. Além disso, a inclusão foto-controlada e a reação de exclusão das vesículas de PDA contendo azobenzeno com  $\beta$ -CD foram utilizadas para atuar como força motriz para induzir a mudança da intensidade de fluorescência das vesículas.

Gou et al. (2010) estudaram um novo e interessante tipo de sensor cromático tempo-temperatura à base de vesícula de PDA e polímero anfifílico. Na presença de polímeros anfifílicos, as vesículas de PDA puderam gradualmente transitar do azul para o vermelho. Este processo foi irreversível e regularmente dependente da temperatura, tempo e propriedades do polímero anfifílico, como concentração, peso molecular, estrutura molecular, hidrofobicidade e propriedade termossensível. Altas concentrações dos

polímeros anfífilos resultaram em menores temperaturas de transição colorimétrica sendo esta mais rápida. Além disso, a mudança de cor da matriz de PDA/polímero anfílico pode ter resultado da maior temperatura e da gradual inserção do polímero anfílico no PDA, sinergicamente perturbando a sua conformação. As vesículas de PDA/F127, PDA/F68, PDA/L35 e PDA/Tween-20 apresentaram potencial aplicação em sensores cromáticos tempo-temperatura entre 10 - 50 °C. Este trabalho forneceu um novo método para desenvolvimento de sensores tempo-temperatura.

Charoenthai et al. (2011) avaliaram o papel da cabeça hidrofílica e do comprimento da cauda hidrofóbica no comportamento de resposta colorimétrica de vesículas de PDA quando expostas a diferentes temperaturas, pHs e concentrações de etanol. As vesículas foram produzidas utilizando ácido 10,12-tricosadinóico (TCDA), ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) e N-(2-aminoetil)-10,12-pentacosadinamida (AEPCDA). Os autores observaram forte influência da cabeça hidrofílica e do comprimento da cauda hidrofóbica na resposta colorimétrica das vesículas para temperatura, etanol e pH. Cadeias menores (TCDA) apresentaram interações de dispersão inter e intramolecular mais fracas quando comparadas às cadeias de PCDA, o que resulta em uma transição colorimétrica mais rápida após a exposição a todos os estímulos. A mudança da cabeça hidrofílica em AEPCDA reduziu suavemente a temperatura de transição. A resposta colorimétrica das vesículas de AEPCDA quando adicionadas de etanol ocorreu em duas etapas, enquanto a resposta das vesículas de PCDA foi um processo de uma única etapa. A quantidade de etanol necessário para induzir a transição colorimétrica das vesículas de AEPCDA também foi muito maior (87% v/v) quando comparada às demais vesículas. O aumento do pH para 9 para 10 causou transição nas vesículas de TCDA e PCDA, respectivamente. Por outro lado, as vesículas AEPCDA mudaram de cor com a redução do pH pra 0.

Pires et al. (2011a) sintetizaram vesículas de ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) contendo N-[(2-tetradecanamida)-etil]-ribonamida (TDER) para determinar a resposta colorimétrica induzida por bactérias

patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *E. coli*). A adição dos sobrenadantes bacterianos causou uma transição colorimétrica nas vesículas de PCDA/TDER, mesmo em baixas concentrações, indicando que a interação química ocorre entre as vesículas de substratos bacterianos. Os substratos de *S. aureus* induziram uma maior mudança de cor quando comparados aos substratos de *E. coli*. A análise microcalorimétrica mostrou que a interação entre os substratos bacterianos e as vesículas foi exotérmica para ambos os sobrenadantes. As vesículas de PCDA/TDER mostraram grande potencial para serem utilizadas como biossensor para detectar patógenos veiculados por alimentos em embalagens inteligentes.

Pires et al. (2011b) também estudaram a termodinâmica de transição colorimétrica de vesículas de polidiacetileno induzida por diferentes solventes. Foram avaliadas vesículas de ácido 10,12-pentacosadínico (PCDA) e vesículas de PCDA + esfingomielina (ES) + colesterol (CO). A adição de  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e  $\text{CCl}_4$  causaram transição colorimétrica em ambas as vesículas. Pela técnica microcalorimétrica, os autores observaram uma mudança de entalpia associada com o processo de transição colorimétrica e com energia de interação entre as moléculas de solvente e as vesículas. Além disso, solventes cloreto induziu transição colorimétrica, mas o mecanismo termodinâmico foi diferente dos demais. A transição colorimétrica pelo  $\text{CHCl}_3$  foi governada entalpicamente, enquanto a transição induzida por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ou  $\text{CCl}_4$  foi governada entropicamente.

Rao et al (2012) desenvolveram um novo sistema supramolecular fotossensível no qual a agregação e desagregação de vesículas de PDA/prata (PDA/Ag) foi mediada por um processo de reconhecimento molecular fotossensível. As vesículas de PDA/Ag apresentam necessariamente propriedades óticas não lineares, a interação "host-guest" entre azobenzeno e ciclodextrina tornaram as vesículas de PDA/Ag suficientemente próximas umas das outras para aumentar a ressonância de superfície de plasma e um correspondente efeito ótico não linear. A alteração da ótica não linear das vesículas baseada nas interações "host-guest" foi realizada alternando a

irradiação da luz UV e visível, o que pode introduzir um novo método para preparo de materiais óticos não lineares inteligentes.

### **3.3. Lactato de cálcio e lactato de sódio**

Devido à grande variedade de aplicações do ácido láctico e seus derivados, estes compostos são amplamente utilizados nas indústrias químicas, na agricultura, indústria de alimentos, bem como em vários campos da medicina.

O ácido láctico, também designado por ácido  $\alpha$ -hidroxi-propanóico ou ácido 2-hidroxi-propanóico, é de um composto orgânico de fórmula molecular  $C_3H_6O_3$ , e estrutural  $CHCH(OH)COOH$ . Possui um átomo de carbono assimétrico, existindo, portanto, em duas formas isoméricas opticamente ativas, D-láctico e L-láctico e sob a forma de racemato (MORRISON e BOYD, 1990). O ácido láctico pode ser obtido por meio da fermentação de carboidratos ou por síntese química a partir de carvão, produtos derivados do petróleo, gás natural e de produtos naturais (LIPINSK e SINCLAIR, 1986). Possui características como moderada acidez, estabilidade química e térmica, biodegradabilidade e, é reconhecidamente não tóxico conforme certificado pela FDA (Food and Drug Administration) (DATTA et al., 1995). A presença dos grupos carboxílico e hidroxila possibilita uma grande variedade de transformações químicas conferindo-lhe, portanto, uma grande variedade de aplicações.

Os derivados do ácido láctico, ésteres e sais, são amplamente utilizados como solventes, emulsificantes e plastificantes. A maior procura por ácido láctico, cerca de 85 % do ácido produzido (DATTA et al., 1995), está associada a indústria de alimentos, onde possui vasta aplicação, sendo utilizado como acidulante, antioxidante, estabilizante e conservante naturais e como agente de limpeza (JU e VERMA, 1994; DANALEWICH et al., 1998).

O lactato de cálcio, cuja estrutura molecular é representada na Figura 6, é um sal do ácido láctico, na proporção de 2:1 (ânion:cátion), muito usado tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica. Trata-se de uma das mais

importantes fontes de cálcio e tem, em comparação com outros sais de cálcio orgânicos, uma boa solubilidade e biodisponibilidade. Como aditivo de alimentos, o lactato de cálcio pode ser utilizado como um adjuvante, suplemento nutricional fortificado de cálcio, agente de fermentação, estabilizante e espessante, além disso, ele aumenta a eficácia dos antioxidantes e impede a descoloração das frutas e vegetais.

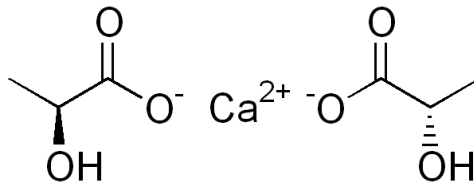


Figura 6 – Estrutura molecular do lactato de cálcio.

Além da utilização do lactato de cálcio para fortificação de produtos alimentícios com cálcio, este composto também apresenta propriedades antimicrobianas, sendo efetivo no controle da multiplicação de micro-organismos aeróbio e anaeróbios em carne. Além disso, a atividade anti-botulínica e anti-listeria do anion lactato têm sido estudadas (SHELEF, 1994)

Aran (2001) estudou o efeito de diferentes concentrações de lactato de cálcio e lactato de sódio (0, 1,5 e 3 % m/m) sobre a multiplicação de esporos de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* em guisado de carne pasteurizado, embalado à vácuo e acondicionado em diferentes temperaturas (10, 15 and 20 °C para *B. cereus* and 15, 20 and 25 °C para *C. perfringens*). O lactato de cálcio permitiu uma maior inibição de *B. cereus* e *C. perfringens* quando comparado ao lactato de sódio.

Lactato tem sido amplamente utilizado na indústria de carne fresca como um ingrediente não cárneo. A injeção de lactato em carne fresca aumenta a vida de prateleira pela inibição de micro-organismos (BREWER et al., 1995) e redução de defeitos de qualidade por oxidação, como descoloração da carne e desenvolvimento de sabores indesejáveis, principalmente, devido à oxidação da mioglobina e de lipídeos, respectivamente (KIM, et al., 2010; KIM et al, 2009). Bifes de carne bovina tratados com uma solução de lactato de cálcio 0,1 M

apresentaram melhores características de maciez e palatabilidade, além de uma coloração mais aceitável e inibição microbiana (LAWRENCE et al., 2003)

Outra aplicação do lactato de cálcio na indústria de alimentos é para aumentar a firmeza de produtos (LUNA-GUZMAN e BARRETT, 2000; ALZAMORA et al., 2005; MANGANARIS et al., 2007). O lactato de cálcio, assim como o propionato de cálcio e gluconato de cálcio, evitam algumas desvantagens provocadas por outros sais de cálcio, como o amargor e sabor residual (YANG e LAWSLESS, 2003). Além disso, a substituição do cloreto de cálcio por estes sais pode evitar a formação de compostos carcinogênicos, cloraminas e trihalometanos (MARTÍN-DIANA et al., 2007).

Sais de cálcio estão envolvidos na manutenção da textura de alimentos, pois os íons de cálcio formam ligações cruzadas ou pontes entre grupos carboxílicos livre das cadeias de pectina, resultando no reforço da parede celular e melhorando a integridade estrutural (GARCIA et al., 1996).

De acordo com Luna-Guzman e Barret (2000), o lactato de cálcio (2,5 % m/m) apresentou um efeito mais duradouro na manutenção da firmeza do que o cloreto de cálcio (2,5 % m/m) durante o armazenamento de melão minimamente processado.

Sais de cálcio também têm sido utilizados como controlador do desenvolvimento do escurecimento de frutas de vegetais minimamente processados, mantendo a aparência de produto fresco por mais tempo. O controle do escurecimento de frutas pelo uso de cálcio têm sido relatado em diferentes estudos, por exemplo, em pêssegos (MANGANARIS *et al.*, 2007) e abacaxi (HEWAJULIGE et al., 2003).

Na área médica, o lactato de cálcio auxilia a manter a densidade dos ossos e a força, e mantém a excitabilidade neuromuscular normal, sendo usado como antiácido e também no tratamento de doenças relacionadas com deficiências de cálcio, em especial em odontologia (ARAN, 2001; RIBEIRO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2010). Na indústria farmacêutica, o lactato de cálcio pode ser considerado como um excipiente promissor em comprimidos farmacêuticos (RITA, 2010).

O lactato de sódio, representado na Figura 7, é um sal derivado do ácido láctico amplamente utilizado na indústria de alimentos como umectante, conservante e regulador de acidez. Muito utilizado na indústria de produtos cárneos, pois promovem um ligeiro sabor salgado melhorando o sabor da carne, retêm a cor, contribui com a capacidade de retenção de água, aumenta o rendimento, melhora a suculência e estende a vida de prateleira destes produtos (TAN e SHALEF, 2006).

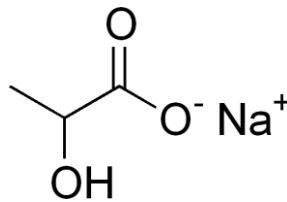


Figura 7 – Estrutura molecular do lactato de sódio.

Segundo Davidson (2005), o lactato de sódio é uma agente antimicrobiano que inibe o crescimento de um amplo número de bactérias gram-positivas e gram-negativas, deterioradoras e patogênicas.

Neste contexto, observa-se que o lactato de sódio (INS 325) bem como o lactato de cálcio (INS 326) são aditivos naturais amplamente utilizados pela indústria de alimentos. Segundo a ANVISA, 2012, esses dois aditivos não têm limites de utilização para produtos cárneos, no entanto o lactato de sódio pode ser utilizado em massas alimentícias frescas, respeitando o limite de 0,2 g/100g. De acordo com Reis et al. (2005), soluções de 1% de lactato de cálcio em conjunto com ácido ascórbico, também a 1%, foram suficientes para estender a vida de prateleira de minimilho em conservas. Botrel et al. (2010) mostraram que uma suspensão de amido contendo 2% de lactato de cálcio e 1,5% L-cisteína atuaram de forma significativa na inibição do escurecimento enzimático de peras. Rodrigues et al. (2000) demonstraram que, em linguiças frescas, 4% de lactato de sódio, utilizado como conservante, foram viáveis para aumentar a vida de prateleira do produto, bem como obtiveram uma melhora significativo nas características sensoriais. Roque-Specht et al. (2008)

demonstraram que o lactato de sódio, na concentração de 2% apresentaram ação anti-oxidante significativa em linguiças frescas de carne de frango. Como apresentado a concentração de lactato de cálcio ou de sódio, de maneira geral é de 2%, exceto quando seu uso é restringido pela legislação.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Físico-Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

### **4.1. Delineamento experimental**

Os experimentos foram conduzidos com 3 repetições, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo o tipo de vesícula, o contraíon do lactato e a concentração lactato os fatores estudados. Foram estudados quatro tipos de vesícula, dois contraíons e concentração de lactato variando entre 0 - 1,08 % para lactato de cálcio e 0 - 3,60 % para lactato de sódio.

### **4.2. Preparo das vesículas**

Foram preparadas vesículas de ácido 10,12-pentacosadínóico (PCDA) com e sem lipídios. Os lipídios utilizados foram 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG), esfingomielina (ES) e colesterol (CO), sendo estes dois últimos utilizados concomitantemente. As estruturas moleculares do PCDA e dos lipídios utilizados estão representadas na Figura 8.

Vesículas de PCDA com e sem lipídios foram preparadas de acordo com Jung et al. (2008), Ma e Cheng (2006), Pevzner et al. (2008) e Pires (2009), como descrito a seguir.

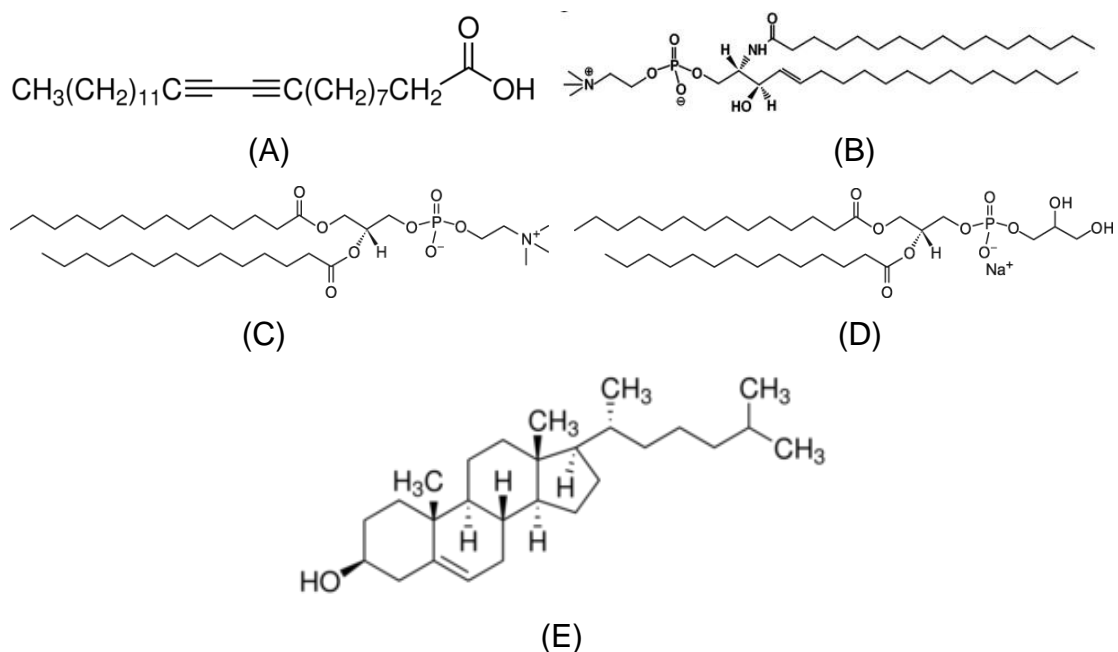


Figura 8 – Estrutura molecular do (A) ácido 10,12 – pentacosadinoico, (B) esfingomielina, (C) dimiristoilfosfatidilcolina, (D) domiristoilfosfatidilglicerol e (E) colesterol.

Para preparo das vesículas de PCDA, monômeros de PCDA foram solubilizados em clorofórmio (1 mM) sendo este removido por fluxo de nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se o volume necessário de água deionizada para que a concentração de PCDA fosse 1 mM. A suspensão resultante foi sonicada em um desruptor de células, com potência de 400 W, durante 14 min. Após sonicação, a suspensão foi filtrada usando um filtro de polifluoreto de vinilideno (PVDF) de 0.45  $\mu\text{m}$  (Milipore<sup>®</sup>) e armazenada a solução a 4 °C por, no mínimo, 10 horas. As vesículas foram polimerizadas pela exposição à radiação UV (Prodicil 110 v, 254 nm) por 10 min obtendo-se vesículas de PCDA de cor azul.

Para preparo das vesículas de PCDA com DMPC e com DMPG, prepararam-se soluções de 1 mM dos monômeros de PCDA e dos diferentes fosfolipídios em clorofórmio, separadamente. Misturaram-se as soluções de PCDA e dos fosfolipídios na proporção de 7:3. O clorofórmio foi removido por fluxo de nitrogênio e, posteriormente, adicionou-se o volume necessário de

água deionizada para que a concentração de PCDA com os fosfolípidios fosse 1 mM. A suspensão resultante foi sonicada em um disruptor de células com potência de 400 W por 14 min. Após sonicação, a suspensão foi filtrada usando um filtro de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$  (Milipore<sup>®</sup>) e armazenada a solução a 4 °C por, no mínimo, 10 horas. As vesículas foram polimerizadas pela exposição à radiação UV (Prodicil 110 v, 254 nm, 15 W) por 10 min obtendo-se vesículas de PCDA/DMPC e PCDA/DMPG de cor azul.

Para o preparo das vesículas de PCDA/ES/CO, solução de 1 mM de ES e de CO foi solubilizada em 10 mL de clorofórmio, sendo o solvente removido por fluxo de nitrogênio. Preparou-se uma solução de PCDA de 1 mM em 2 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) sendo a solução aquecida a 80 °C durante 15 minutos e adicionada ao filme lipídico formado por ES e CO. O volume foi completado para 10 mL com água deionizada. A suspensão resultante foi sonicada em um disruptor de células com potência de 400 W por 14 min. Após sonicação, a suspensão foi filtrada usando um filtro de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$  (Milipore<sup>®</sup>) e armazenada a solução a 4 °C por, no mínimo, 10 horas. As vesículas foram polimerizadas pela exposição à radiação UV (Prodicil 110 v, 254 nm) por 10 min obtendo-se vesículas de PCDA/ES/CO de cor azul.

### **4.3. Resposta colorimétrica das vesículas com lactato de cálcio**

Solução estoque de lactato de cálcio (5 % m/v), foi preparada em água deionizada. A partir da diluição desta solução foram preparadas soluções com concentrações de lactato de cálcio variando de 0 a 1,08 %. Água deionizada foi utilizada como controle.

Foram avaliadas as vesículas PCDA com e sem lípidos e com e sem ajuste de pH para 7,0 e 2,0. Para análise do efeito da concentração de lactato de cálcio nas vesículas foram preparadas suspensões de vesícula (0,25 mM de monômeros formadores da vesícula) com diferentes concentrações de lactato de cálcio.

O cromismo da vesícula foi avaliado pela resposta colorimétrica, por meio de espectro de absorção UV-visível. Após o contato da vesícula com diferentes concentrações de lactato de cálcio por 30 minutos à temperatura ambiente, foram obtidos os espectros de absorção entre 400 e 700 nm (Shimadzu UV-2550) de cada solução. A quantificação da transição colorimétrica (de azul para vermelho) foi determinada utilizando o parâmetro resposta colorimétrica (CR) conforme Okada et al (1998) (Equação 2).

$$RC = \left( \frac{\left( \frac{A_{\text{azul}}}{A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}} \right)_i - \left( \frac{A_{\text{azul}}}{A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}} \right)_f}{\left( \frac{A_{\text{azul}}}{A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}} \right)_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

Na equação, A é a absorvância para o componente azul (~650 nm) e para o componente vermelho (~540 nm) obtidos em um espectro de UV-visível. Os índices “azul” e “vermelho” referem-se à aparência do material e os “i” e “f” são as medidas de absorvância antes e após a adição do lactato de cálcio, respectivamente.

#### 4.4. Determinação do pH

Os valores de pH das vesículas produzidas e das suspensões das vesículas com diferentes concentrações de lactato de cálcio foram determinados por meio de um potenciômetro (Digimed) à 25 °C.

#### 4.5. Determinação do tamanho das vesículas

O tamanho médio das vesículas foi medido por meio da técnica espectroscópica de espalhamento a laser (Nanophox). As amostras foram colocadas em um suporte de amostra com temperatura controlada por, no mínimo, 5 min antes do início da medida. As medidas de espalhamento da luz

foram realizadas com um ângulo de 90° e a temperatura foi mantida à 25 °C. Todas as medidas de tamanho foram realizadas em triplicata.

#### **4.6. Análise microcalorimétrica**

Para determinar a variação da entalpia associada com a interação entre as vesículas e o lactato de cálcio utilizou-se microcalorímetro de titulação isotérmica (IT $\mu$ C) (Calorimetry Sciences Corp., modelo 4200). O sistema de reação utilizado foi o modo de titulação com células de aço inoxidável com volume de 1,82 mL, imersas em um banho termostaticado mantido à 25 °C. Para as medidas da variação da entalpia ( $\Delta H$ ), 1,82 mL de solução de lactato de cálcio (1,08 %) foram adicionados nas celas de amostra e de referência, que foram colocadas no IT $\mu$ C, sob agitação de 300 rpm. Quando o equilíbrio térmico entre as células e o banho foi alcançado, 10  $\mu$ L da suspensão vesicular (1 mM de monômeros formadores da vesícula) foi titulado na solução de lactato, com auxílio de micro-seringa Hamilton, em intervalos de 300 a 500 segundos. Todas as medidas calorimétricas foram realizadas em triplicata (Pires et al., 2010).

#### **4.7. Estudo da interação entre as vesículas e o lactato de cálcio**

O estudo da interação entre as vesículas e o lactato de cálcio foi realizado por meio da técnica de diálise no equilíbrio (VOLPE e SILVA FILHO, 1994).

O experimento foi realizado em um condutivímetro (Hanna instruments, modelo EC 215). Na cela do condutivímetro foram colocadas 25 mL da solução de lactato de cálcio (1,08%) e uma membrana de diálise contendo 1,25 mL da suspensão de vesícula (0,25 mM de monômeros formadores da vesícula). A condutividade elétrica da solução de lactato de cálcio foi determinada ao longo do tempo até sua estabilização.

A conversão da condutividade elétrica em concentração de lactato de cálcio foi realizada com auxílio de uma curva analítica previamente realizada.

Conhecendo-se a quantidade inicial total de vesícula e lactato de cálcio no sistema, no equilíbrio, a quantidade de lactato de cálcio ligado à vesícula foi determinada a partir da concentração do lactato de cálcio livre total usando a seguinte equação:

$$n = \frac{[\text{lactato}]_{\text{total}} - [\text{lactato}]_{\text{livre}}}{[\text{vesícula}]} \quad (3)$$

onde n é o número médio de moléculas de lactato de cálcio por molécula de vesícula.

A variação da energia livre de Gibbs envolvida da interação entre vesícula e lactato de cálcio foi calculada pela equação abaixo:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln k \quad (4)$$

onde R é a constante universal dos gases perfeitos, T é a temperatura em Kelvin e k é a constante de equilíbrio dada por:

$$k = \frac{[\text{vesícula-lactato}]}{[\text{lactato}]_{\text{livre}}^n \cdot [\text{vesícula}]} \quad (5)$$

onde [vesícula-lactato] é a concentração do complexo formada pela interação entre a vesícula e o lactato de cálcio.

#### 4.8. Avaliação das vesículas com lactato de sódio

As análises dos itens de **3.2** a **3.10** também foram realizadas utilizando lactato de sódio.

Nas análises de resposta colorimétrica, determinação do pH e do tamanho das vesículas, foram preparadas suspensões de vesícula (0,25 mM de monômeros formadores da vesícula) com diferentes concentrações de lactato de sódio, variando de 0 a 3,6 %.

No estudo da interação entre as vesículas e o lactato de cálcio por meio da técnica de equilíbrio de diálise, na cela do condutivímetro foram colocadas 25 mL da solução de lactato de sódio na concentração de 3,6 % (m/v).

Para as medidas da variação da entalpia ( $\Delta H$ ), 1,82 mL de solução de lactato de sódio (3,60 %) foram adicionados nas celas de amostra e de referência do IT $\mu$ C e 10  $\mu$ L da suspensão vesicular (0,25 mM de monômeros formadores da vesícula) foi titulado na solução de lactato em intervalos de 300 a 500 segundos (Pires et al., 2010).

#### **4.9. Análise estatística dos resultados**

Os resultados foram analisados por meio de Análise de Variância ao nível de 5% de probabilidade e análise de regressão ou teste de média Tukey, quando se aplicam, com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1 (Licenciado pela Universidade Federal de Viçosa).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 9 ilustra os espectros de absorção das diferentes suspensões vesiculares após polimerização. As vesículas de PCDA, PCDA/DMPC, PCDA/DMPG e PCDA/ES/CO apresentaram coloração azul intenso após a polimerização, com pico máximo de absorção entre 635 nm e 640 nm, com um ombro vibrônico entre 585 nm e 590 nm. Isto indica que a incorporação de lipídeos na estrutura polidiacetilênica não impediu a polimerização dos monômeros de ácido 10,12-pentacosadínico.

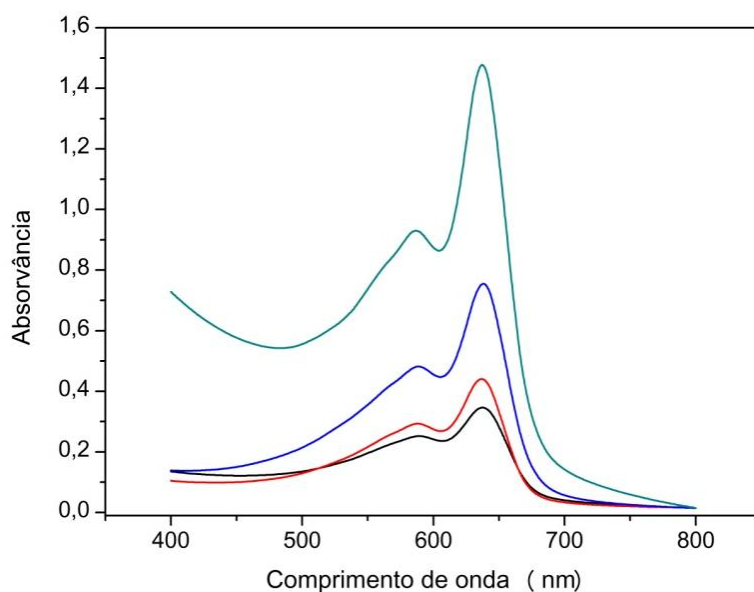


Figura 9 – Espectro de absorção em UV-visível de vesículas de PCDA (—), PCDA/ES/CO (—), PCDA/DMPG (—) e PCDA/DMPC (—).

Observou-se que a intensidade da cor azul da vesícula de PCDA/ES/CO foi muito maior quando comparada às demais, o que pode ser verificado pela maior absorvância entre 635 nm e 640 nm. Esta diferença ocorre, pois a incorporação de ES e CO em estruturas polidiacetilênicas forma microdomínios no interior das vesículas (ROZNER et al., 2003) permitindo uma maior aproximação e empacotamento dos monômeros de ácido 10,12-pentacosadínico aumentando, assim, o grau de polimerização durante a

irradiação e, conseqüentemente, intensificando a coloração azul. Pires (2009), ao estudar vesículas de PCDA e PCDA/ES/CO também verificou que a incorporação de ES e CO proporcionou maior intensidade de absorção em comparação com a vesícula formada apenas por PCDA. Os demais lipídios, DMPC e DMPG, apresentaram pequena variação na intensidade da coloração azul em relação à vesícula de PCDA puro, o que pode ser explicado pela intercalação dos mesmos entre os monômeros de ácido 10,12-pentacosadinóico reduzindo o grau de polimerização do PCDA nas estruturas. Segundo Wang et al. (2006), DMPC não participa da polimerização de polidiacetileno, sendo as moléculas inseridas na estrutura por meio da atração hidrofóbica entre as caudas apolares.

A Tabela 1 apresenta os valores de diâmetro hidrodinâmico e de pH das suspensões vesiculares. Observou-se que a incorporação de lipídios nas vesículas provocou um aumento do tamanho das estruturas e redução do pH das suspensões.

Tabela 1 – Diâmetro hidrodinâmico e pH das suspensões das diferentes vesículas.

Vesícula	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	pH
PCDA	106,12 <sup>d</sup> ± 0,06	6,42 <sup>a</sup> ± 0,22
PCDA/DMPC	176,94 <sup>c</sup> ± 14,06	6,13 <sup>b</sup> ± 0,15
PCDA/DMPG	213,36 <sup>b</sup> ± 5,82	5,57 <sup>c</sup> ± 0,17
PCDA/ES/CO	361,51 <sup>a</sup> ± 51, 41	4,61 <sup>d</sup> ± 0,22

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade.

O maior tamanho das vesículas de PCDA/ES/CO pode ser explicado pela formação de microdomínios volumosos de ES e CO no interior das estruturas vesiculares aumentando o tamanho das mesmas. A incorporação de DMPC e DMPG em estruturas polidiacetilênicas, provocaram aumento de tamanho quando comparado às vesículas de PCDA puro, pois estes lipídeos ficam intercalados entre os monômeros de ácido 10,12-pentacosadinóico o que reduz o empacotamento molecular e causa o aumento de tamanho das

vesículas. Segundo Rozner et al. (2003), a incorporação de outras moléculas na estrutura polidiacetilênica, formando microdomínios, promove o aumento no tamanho das vesículas. De acordo com Okada et al. (1998), os diâmetros encontrados, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, para vesículas contendo PCDA varia entre 50 e 300 nm. Charoenthai et al. (2011) determinaram o tamanho de vesículas de PCDA e encontraram valores variando entre 20 e 170 nm.

A incorporação de lipídios nas vesículas provocou a alteração no equilíbrio dos grupos carboxílicos presentes na superfície vesicular promovendo mudança na concentração hidrogeniônica da suspensão vesicular. Provavelmente, a presença de lipídeos provoca o afastamento dos grupos carboxílicos localizados na superfície da vesícula, o que reduz a densidade das ligações de hidrogênio entre estes grupos e facilita a ionização dos mesmos levando à redução do pH.

As Figuras 10 e 11 mostram os espectros eletrônicos das vesículas de PDA/ES/CO em presença de lactato de cálcio e lactato de sódio, respectivamente, nos três valores de pH estudados. A adição de lactato de cálcio e lactato de sódio provocou a transição colorimétrica das vesículas de PCDA/ES/CO em pH 4,61 e pH 7,0. O aumento da concentração de lactato de cálcio reduziu o pico máximo de absorção referente à cor azul (635 – 640 nm) e aumentou o pico máximo de absorção na região do vermelho (535 – 540 nm). Em pH 2,0, o lactato de cálcio não foi capaz de induzir a mudança de cor das vesículas, ou seja, as vesículas se mantiveram azuis, com pico máximo de absorção entre 635 e 640 nm. O mesmo comportamento foi observado para as vesículas de PCDA, PCDA/DMPG e PCDA/DMPC, isto é, os copolímeros obtidos nas vesículas com lipídios apresentaram as mesmas propriedades de transição colorimétrica dos polímeros de PCDA puro.

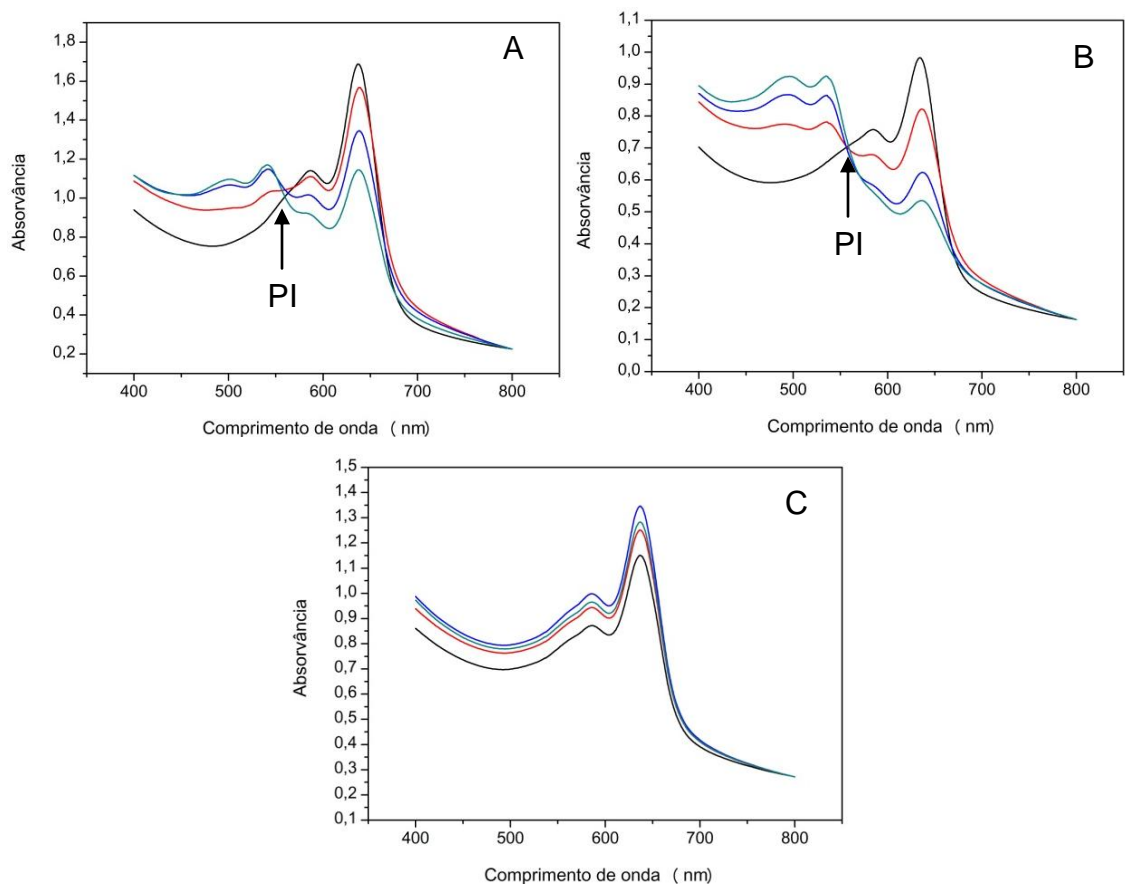


Figura 10 – Espectros de absorção em UV-visível de vesículas de PCDA/ES/CO em pH 4,6 (A), pH 7,0 (B) e pH 2,0 (C) com  $0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (—),  $0,0165 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (—),  $0,0330 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (—) e  $0,0495 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (—) de lactato de cálcio. PI: Ponto isobéptico

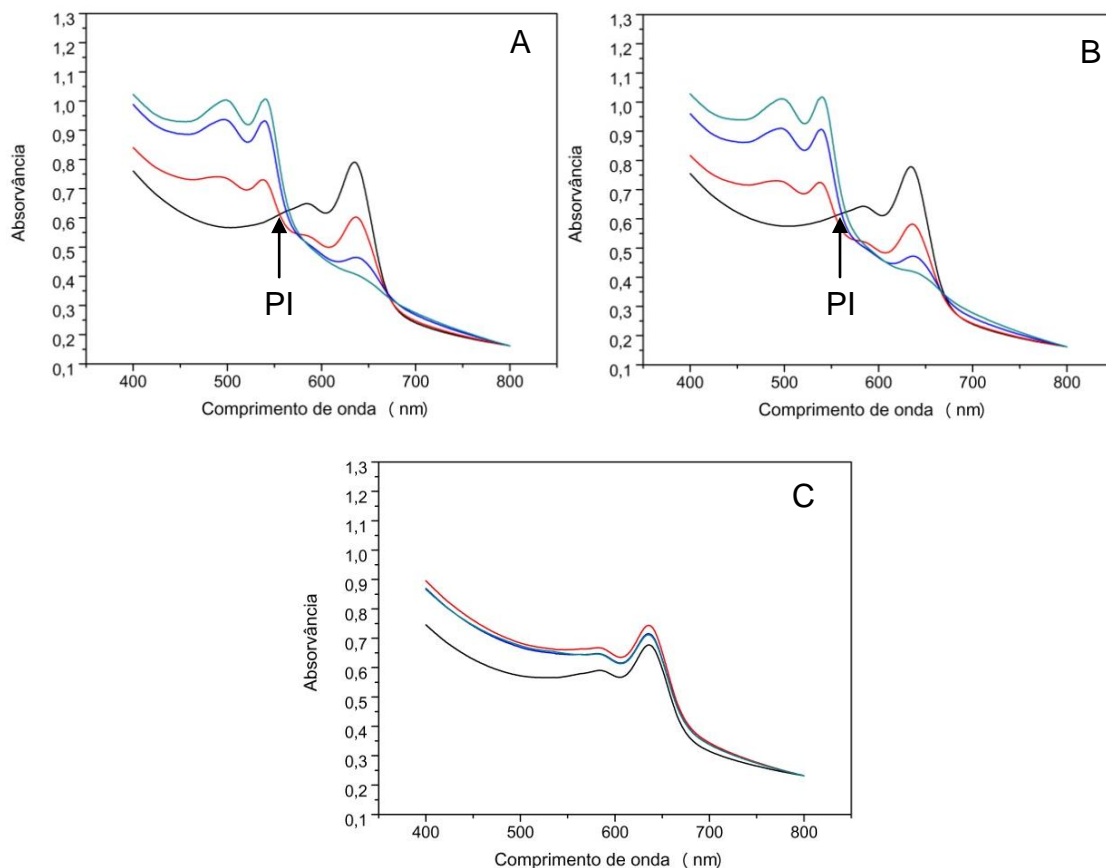


Figura 11 – Espectros de absorção em UV-visível de vesículas de PCDA/ES/CO em pH 4,6 (A), pH 7,0 (B) e pH 2,0 (C) com 0 mol·L<sup>-1</sup> (—), 0,1071 mol·L<sup>-1</sup> (—), 0,2142 mol·L<sup>-1</sup> (—) e 0,3212 mol·L<sup>-1</sup> (—) de lactato de sódio. PI: Ponto isobéstico.

A presença de um único ponto isobéstico indica a presença de apenas duas espécies químicas diferentes (ou pelo menos conformacionalmente diferentes) que são responsáveis pelas respectivas transições eletrônicas, demonstrando assim que a conversão entre as duas espécies ocorre via mecanismo de dois estados, Azul → Vermelho, com a ausência de espécies químicas intermediárias (KEW e HALL, 2006). De acordo com Potisatityuenyong et al. (2008), o espectro eletrônico associado à coloração roxa da suspensão vesicular é uma combinação entre os espectros eletrônicos das vesículas que ainda estão na forma azul e os espectros eletrônicos das vesículas que já se alteraram para a cor vermelha.

Todas as vesículas apresentam transição colorimétrica após a adição de lactato de cálcio e lactato de sódio (Figuras 12 e 13), no entanto, a

desestabilização das vesículas de PCDA e PCDA/DMPG na presença de lactato de cálcio provocou a floculação e sedimentação das vesículas impedindo a realização do estudo. Provavelmente, a desestabilização destas vesículas ocorre devido à troca das espécies positivas  $H^+$  e  $Na^+$  das vesículas de PCDA e PCDA/DMPG, respectivamente, pelo  $Ca^{++}$  do lactato e,ou interação do  $Ca^{++}$  do lactato com os grupos carboxílicos das moléculas de PCDA o que neutraliza a carga negativa superficial das vesículas induzindo a agregação e desestabilização do sistema.

Segundo Wilschut et al. (1985), vesículas fosfolipídicas são estruturas estáveis que não se desestabilizam espontaneamente. A repulsão eletrostática de longo alcance evita a agregação e fusão de vesículas carregadas negativamente. No entanto, a ligação de cátions divalentes em vesículas carregadas negativamente reduz a repulsão eletrostática induzindo a agregação das mesmas.

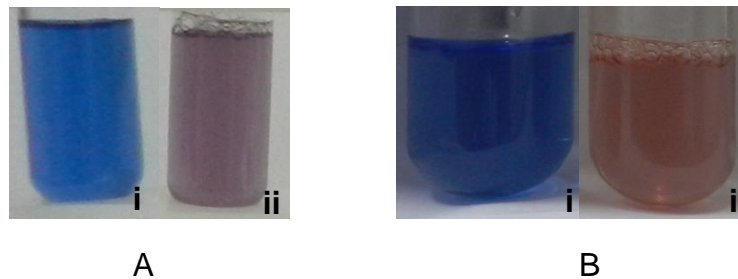


Figura 12 – Vesículas de (A) PCDA/ES/CO e (B) PCDA/DMPG com 0 (i) e (ii)  $0,0998 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, proveniente do sal de cálcio.

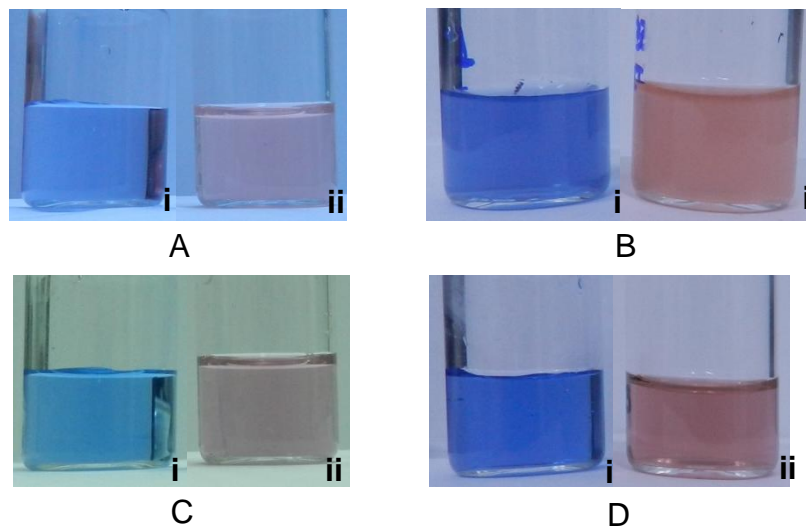


Figura 13 – Vesículas de (A) PCDA, (B) PCDA/ES/CO, (C) PCDA/DMPC e (D) PCDA/DMPG com 0 (i) e (ii)  $0,3192 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, proveniente do sal de sódio.

As Figuras 14 e 15 mostram a resposta colorimétrica das vesículas de PCDA/DMPC e PCDA/ES/CO, respectivamente, em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de cálcio, em diferentes pHs. A resposta colorimétrica expressa a porcentagem das moléculas de PCDA que sofreram a transição de azul para vermelho.

Para a vesícula de PCDA/DMPC em pH 6,13 e 7,0, observou-se uma relação direta entre a resposta colorimétrica e a concentração de lactato não havendo diferença entre as curvas destes pHs. Nestes pHs, pode-se dividir a curva em três partes: (I) entre 0 e  $0,0222 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, onde o aumento da resposta colorimétrica é pequeno; (II) entre  $0,0222$  e  $0,0610 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, onde o aumento da RC torna-se mais acentuado e (III) entre  $0,0610$  e  $0,0998 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, onde o aumento da resposta colorimétrica se torna novamente pequeno. Este resultado pode ser numericamente expresso pelas inclinações dos segmentos de reta nas partes I, II e III que foram de 329,64; 738,19 e  $369,54 \text{ \%}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectivamente.

Para a vesícula de PCDA/ES/CO quanto maior o pH das vesículas, maior foi a resposta colorimétrica. Para os pHs 4,61 e 7,0, observou-se uma relação direta entre a resposta colorimétrica e a concentração de lactato com inclinação

média de 253,35 e 395,22  $\% \cdot L \cdot mol^{-1}$ , respectivamente, o que mostra o maior aumento da resposta colorimétrica em pH 7,0 do que em pH 4,61.

Em pH 2,0, não houve aumento da resposta colorimétrica em função do aumento da concentração de lactato para ambas as vesículas

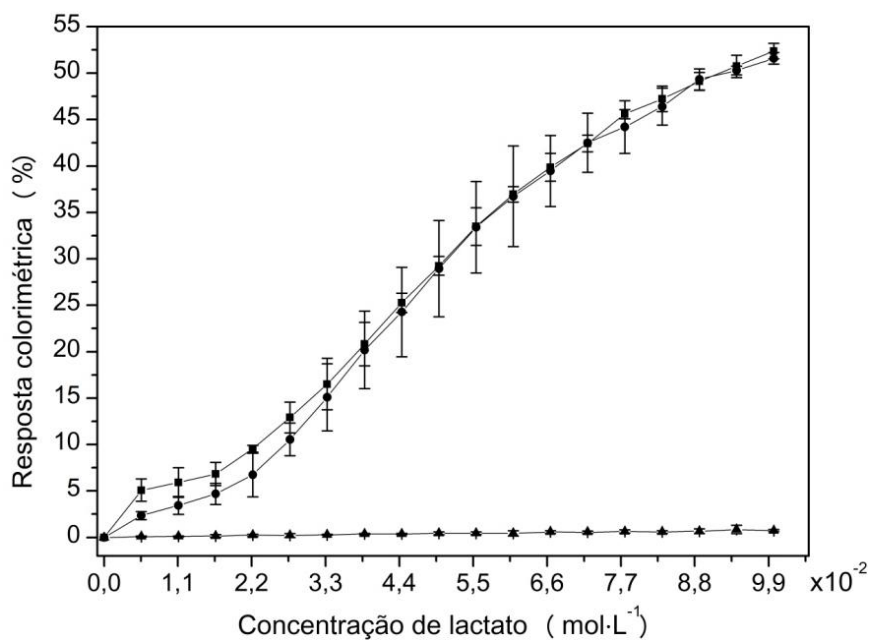


Figura 14 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de cálcio, para vesículas de PCDA/DMPC em (■) pH 6,13, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

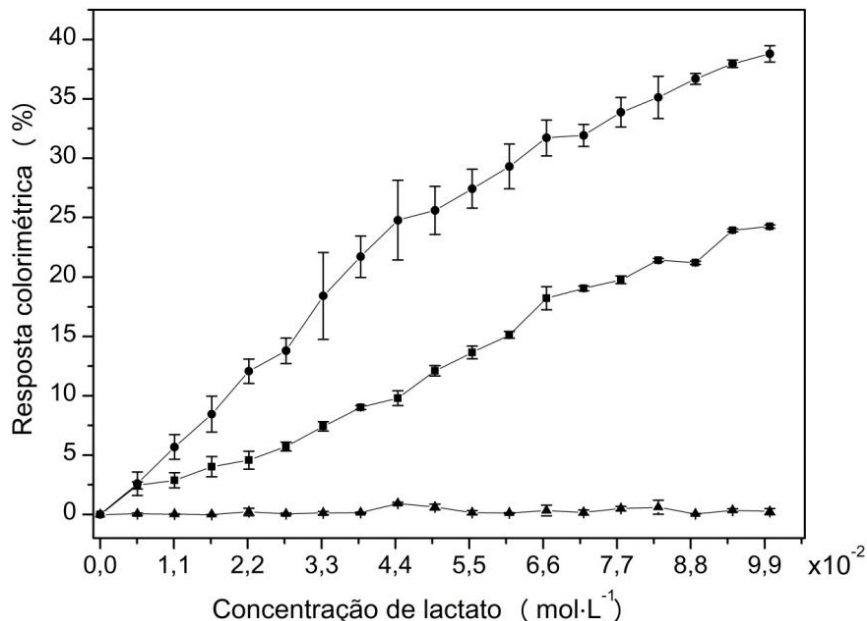


Figura 15 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de cálcio, para vesículas de PCDA/ES/CO em (■) pH 4,61, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

A maior resposta colorimétrica das vesículas de PCDA/ES/CO em pH 7,0 quanto comparada à vesícula em pH 4,61 pode ser explicada pelo deslocamento do equilíbrio de ionização do grupo carboxílico na superfície da vesícula em pH 7,0, favorecendo a ionização dos mesmos o que impede a formação de ligações de hidrogênio na superfície. A redução da densidade de ligações de hidrogênio desestabiliza a superfície da vesícula facilitando a interação da mesma com ânions lactato. Esta maior interação permite uma maior transição de cor, aumentando, assim, a resposta colorimétrica. Segundo Kew e Hall (2006), a adição de íon hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) em soluções aquosas de vesículas de PCDA altera a interação entre as cabeças hidrofílicas da superfície. Os íons  $\text{OH}^-$  adicionados retira os prótons dos grupos carboxílicos levando ao rompimento das ligações de hidrogênio na superfície das vesículas, o que causa a desestabilização das mesmas.

As Figuras 16, 17, 18 e 19 ilustram a resposta colorimétrica das vesículas de PCDA, PCDA/ES/CO, PCDA/DMPC e PCDA/DMPG, respectivamente, em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de sódio, nos diferentes pHs. Em pH de síntese e pH 7,0, observou-se

uma relação direta entre a resposta colorimétrica e a concentração de lactato não havendo diferença entre as curvas destes pHs. Em pH 2,0, não houve aumento da resposta colorimétrica em função do aumento da concentração de lactato para todas as vesículas avaliadas.

Para a vesícula de PCDA, entre 0 e  $0,1598 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  houve um acentuado crescimento da resposta colorimétrica em função da concentração de lactato, com inclinação média de  $507,50 \text{ }\%\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Posteriormente, não houve efeito da concentração na resposta colorimétrica, sendo estabilizada em, aproximadamente, 72 %. Provavelmente, nesta concentração de lactato, todos os sítios ativos das vesículas já haviam sido ocupados pelo lactato e, portanto, concentrações maiores não levariam ao aumento da resposta colorimétrica.

Para a vesícula de PCDA/ES/CO em pH 4,61 e 7,0, observou-se um crescimento acentuado da resposta colorimétrica das vesículas até a concentração de  $0,2128 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato com inclinação média de  $204,00 \text{ }\%\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A partir desta concentração, a inclinação foi reduzida para  $75,25 \text{ }\%\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Para a vesícula de PCDA/DMPC nos pHs 6,13 e 7,0, pode-se dividir as curvas destes pHs em três partes: (I) entre 0 e  $0,0531 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, onde o aumento da resposta colorimétrica é pequeno; (II) entre  $0,0531$  e  $0,2128 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, onde o aumento da RC torna-se mais acentuado e (III) entre  $0,2128$  e  $0,3192 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, onde o aumento da resposta colorimétrica torna-se novamente pequeno. A inclinação média dos segmentos de reta nas partes I, II e III foi de 95,07, 304,48 e  $92,02 \text{ }\%\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectivamente.

Para a vesícula de PCDA/DMPG nos pHs 5,57 e 7,0, observou-se que, inicialmente, ocorre um pequeno aumento da resposta colorimétrica em função do aumento da concentração de lactato com inclinação média de  $29,25 \text{ }\%\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , no entanto, a partir da concentração de  $0,0798 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato, a relação torna-se mais acentuada aumentando a inclinação média para  $237,19 \text{ }\%\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

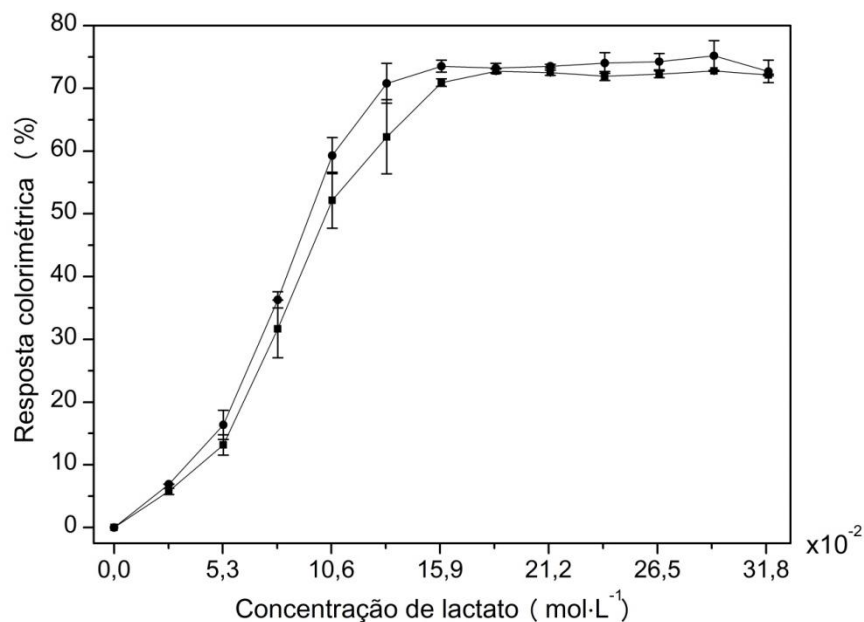


Figura 16 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de sódio, para vesículas de PCDA em (■) pH 6,42 e (●) pH 7,0.

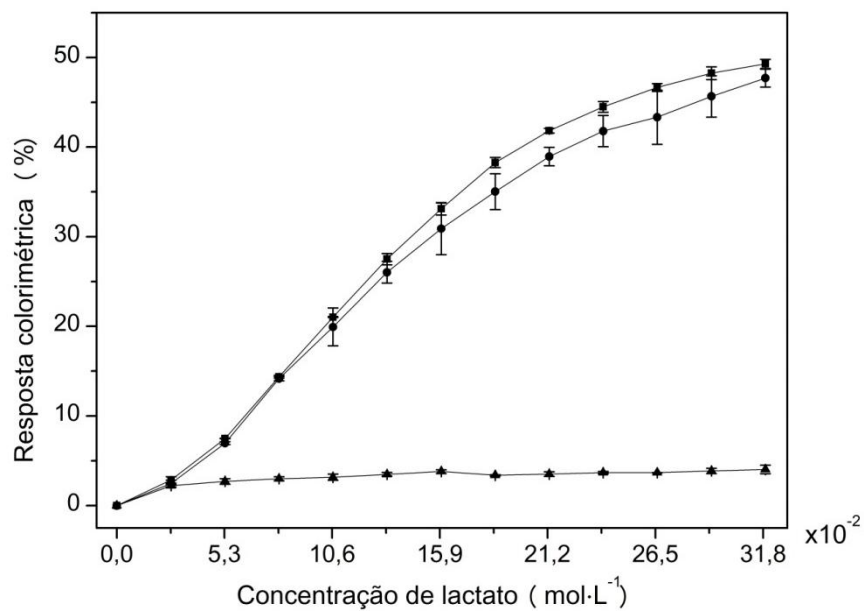


Figura 17 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de sódio, para vesículas de PCDA/ES/CO em (■) pH 4,61, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

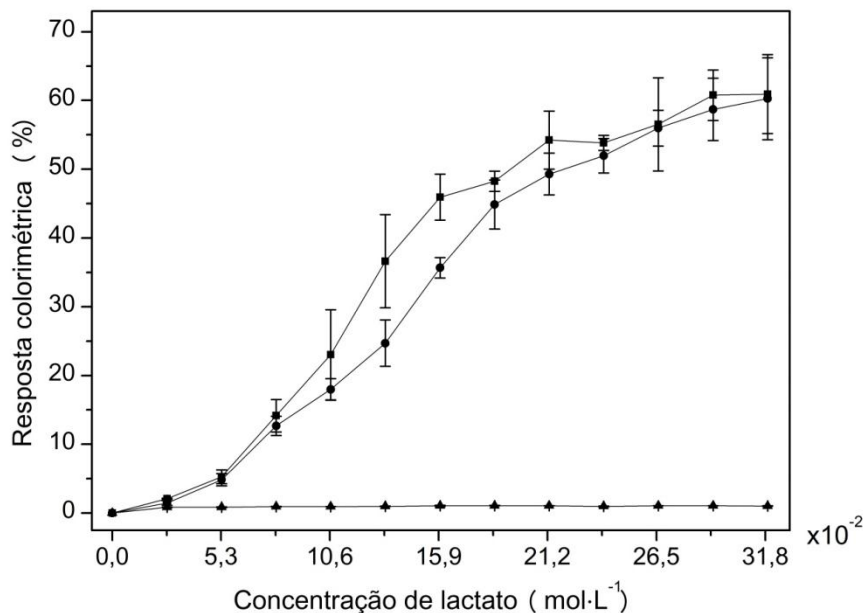


Figura 18 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de sódio, para vesículas de PCDA/DMPC em (■) pH 6,13, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

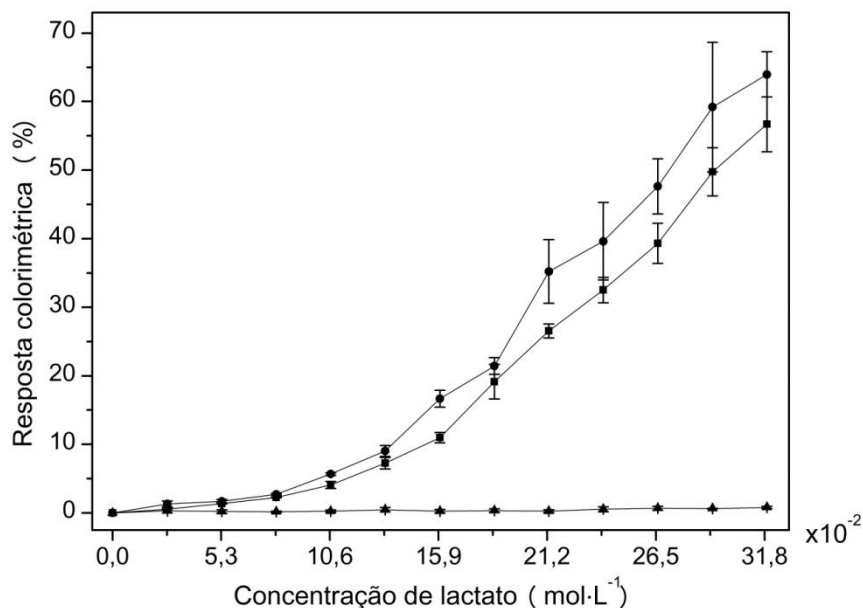


Figura 29 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de sódio, para vesículas de PCDA/DMPG em (■) pH 5,57, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

O estudo da vesícula de PCDA em pH 2,0 não foi realizado, pois neste pH ocorreu a floculação da vesícula. Este resultado pode ser explicado pelo deslocamento do equilíbrio de ionização dos grupos carboxílicos presentes na

superfície da vesícula favorecendo a formação de vesículas com grupos carboxílicos não ionizados o que neutraliza a superfície vesicular (Figura 20). Esta neutralização rompe a repulsão eletrostática entre as nanoestruturas o que permite a aproximação e agregação das mesmas com formação de grandes flocos (Figura 21).

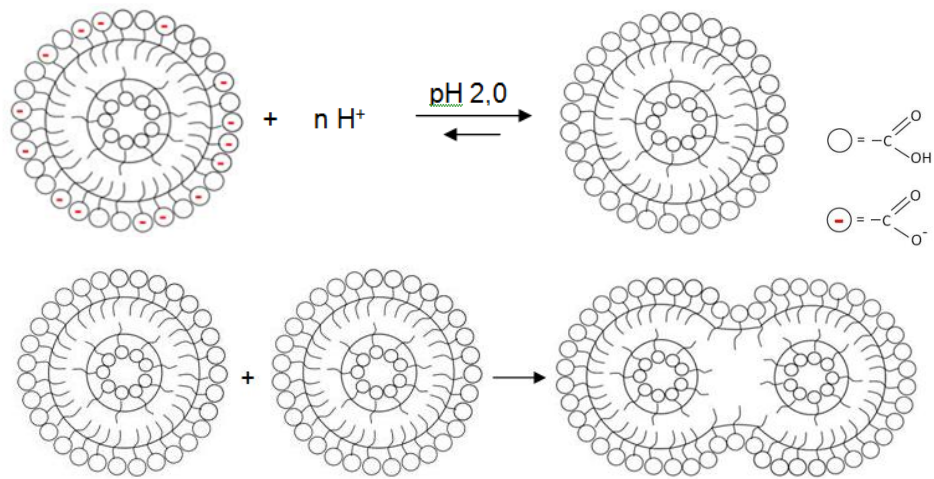


Figura 20 – Modelo de agregação das vesículas de PCDA em pH 2,0.



Figura 21 – Vesículas de PCDA flocculadas pela redução do pH.

A diferença na resposta colorimétrica das vesículas de PCDA, PCDA/DMPC, PCDA/DMPG e PCDA/ES/CO em diferentes pHs, sugere que a transição colorimétrica das vesículas é provocada pelo ânion lactato. Em pH mais elevado, onde ocorre maior resposta colorimétrica, o equilíbrio entre ácido láctico, lactato<sup>-</sup> e H<sup>+</sup> é deslocado, favorecendo a formação de lactato<sup>-</sup> e H<sup>+</sup>. Em pH mais baixo, o equilíbrio é deslocado favorecendo a formação de ácido láctico, e nesta situação não observa-se mudança de cor das vesículas, comprovando a participação do ânion lactato na transição colorimétrica. Provavelmente, a interação entre o ânion lactato e a vesícula ocorre via formação de ligações de hidrogênio entre o oxigênio do lactato e o hidrogênio do grupo carboxílico não ionizado do ácido 10,12-pentacosadinoico.

A baixa resposta colorimétrica para vesículas em pH 2,0 pode estar relacionada à alteração do equilíbrio dos grupos carboxílicos da vesícula e, ou do lactato. Em pH baixo, o equilíbrio entre ácido láctico, lactato<sup>-</sup> e H<sup>+</sup> é deslocado, favorecendo a formação de ácido láctico que não seria capaz de interagir com as vesículas provocando a transição colorimétrica. Além disso, a alteração do equilíbrio dos grupos carboxílicos presentes na superfície vesicular favorece a formação de vesícula com grupos carboxílicos não ionizados o que permite a maior formação de ligações de hidrogênio na superfície vesicular, estabilizando-a e impedindo sua interação com o lactato.

As Figuras 22 e 23 apresentam a resposta colorimétrica em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de cálcio ou de sódio, das diferentes vesículas em pH de síntese, pH 7,0 e pH 2,0 respectivamente.

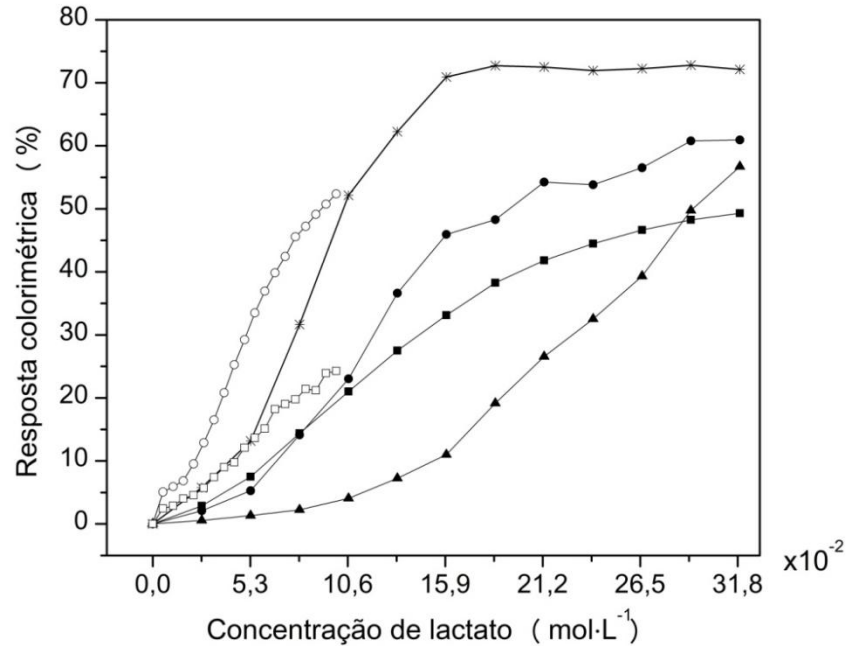


Figura 22 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de cálcio (símbolos vazios) ou lactato de sódio (símbolos cheios), para vesículas de PCDA (asterisco), PCDA/ES/CO (quadrado), PCDA/DMPC (círculo) e PCDA/DMPG (triângulo) em pH de síntese.

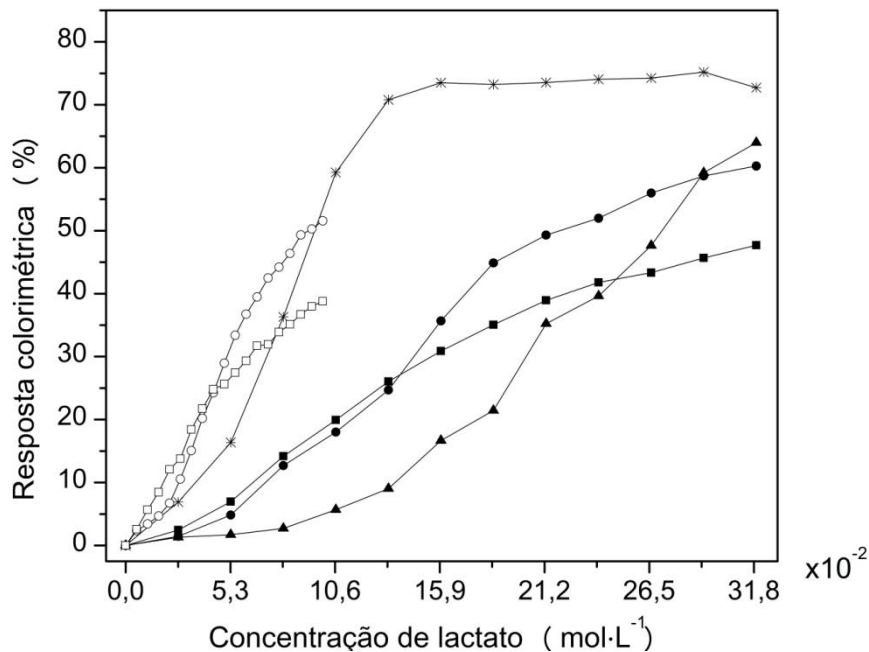


Figura 23 – Resposta colorimétrica em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de cálcio (símbolos vazios) ou lactato de sódio (símbolos cheios), para vesículas de PCDA (asterisco), PCDA/ES/CO (quadrado), PCDA/DMPC (círculo) e PCDA/DMPG (triângulo) em pH 7,0.

Segundo Charych et al. (1993), uma resposta colorimétrica maior ou igual a 15% usualmente é visível aos olhos do ser humano. Para pH de síntese e pH 7,0, observou-se que as vesículas de PCDA/DMPC e PCDA/ES/CO, com uma determinada concentração de lactato, apresentaram maior resposta colorimétrica quando o lactato foi proveniente do sal de cálcio. Isto ocorre pela maior contribuição do cálcio em relação ao sódio na transição colorimétrica. Provavelmente, o cálcio se complexa com o grupo carboxílico ionizado gerando uma carga positiva na superfície da vesícula que provoca um afastamento das cadeias polidiacetilênicas causando uma mudança na sua conformação destas cadeias e, conseqüentemente, a transição colorimétrica.

A resposta colorimétrica das vesículas de PCDA/ES/CO e PCDA/DMPC, em pH de síntese e em pH 7,0, adicionadas de lactato de cálcio e de lactato de sódio foram diferentes na faixa de concentração de lactato testada. Uma das possíveis causas deste comportamento é que a presença das moléculas de CO e ES promovem interações intermoleculares distintas daquelas presentes com DMPC, promovendo uma maior estabilidade ao sistema PCDA/ES/CO. Holopainen et al. (2004) estudando vesículas formadas por colesterol, esfingomielina e fosfatidilcolinas, demonstraram que a presença de ES e CO se dá na forma de microdomínios e é capaz de estabilizar os nanoagregados formados. Kim et al. (2008), que também incorporaram um fosfolípido (dimiristoilfosfatidilcolina – DMPC) em vesículas de PCDA, observaram que com concentrações crescentes de DMPC, a resposta colorimétrica das estruturas tornou-se mais rápida, o que foi atribuído ao enfraquecimento das ligações de H, pela presença do fosfolípido. No entanto, de acordo com Massey (2001), a esfingomielina, quando comparada com as fosfatidilcolinas são mais saturadas e assimétricas, devido à ligação amida das cadeias longas de ácidos graxos e estão mais propensas a formar ligações de hidrogênio intermoleculares.

Para as vesículas em pH de síntese e pH 7,0 adicionadas de lactato de sódio, observou-se que a maior resposta colorimétrica obtida foi para a vesícula

de PCDA puro. Este resultado pode ser explicado pela maior estabilidade interna da vesícula quando esta é incorporada com lipídios. A presença de lipídios aumenta a interação entre as cadeias hidrofóbicas localizadas no interior da vesícula necessitando de uma maior concentração de lactato de cálcio para romper a barreira de energia potencial necessária para provocar a mudança conformacional das moléculas polidiacetilênicas levando à transição colorimétrica. Em vesículas de PCDA puro, as interações entre as cadeias hidrofóbicas são mais fracas possuindo uma menor energia potencial para mudança conformacional o que resulta em uma maior resposta colorimétrica.

A necessidade de maiores concentrações de lactato, quando proveniente do sal de sódio, para permitir aumento da resposta colorimétrica das vesículas de PCDA/DMPG em relação às demais vesículas é explicada pela presença de hidroxilas na cabeça hidrofílica do DMPG o que permite a formação de ligações de hidrogênio com os grupos carboxílicos do PCDA. O aumento da densidade de ligações de hidrogênio na superfície vesicular a torna mais estável, sendo, portanto, uma maior quantidade de ânions lactato para desestabilizar a superfície e, conseqüentemente, para permitir a mudança conformacional da estruturas de PCDA e transição colorimétrica das vesículas.

Segundo Charoenthai et al. (2001), a resposta colorimétrica de vesículas polidiacetilênicas está relacionada com a força das interações hidrofóbicas entre as caudas presentes na bicamada do interior vesicular, sendo que quanto mais forte forem as interações, menor será a resposta colorimétrica. Além disso, a carga dos grupos carboxílicos presentes na superfície da vesícula podem causar interação ou repulsão entre os mesmos, afetando o rearranjo dos segmentos de PDA e, conseqüentemente, influenciando na resposta colorimétrica.

As Tabelas 2 e 3 mostram os parâmetros termodinâmicos de interação vesícula-lactato de cálcio e vesícula-lactato de sódio, respectivamente. Observou-se que a variação da energia livre de Gibbs de interação ( $\Delta_{int}G$ ) entre as vesículas e lactato foi negativa nos pHs de síntese e 7,0, demonstrando que a interação entre as espécies foi termodinamicamente favorável. Por outro lado,

em pH 2,0 esta interação não foi espontânea apresentando valor de  $\Delta_{\text{int}}G$  positivo. Estes resultados explicam o que foi observado nos experimentos de resposta colorimétrica, onde se verificou a transição colorimétrica apenas nos pHs de síntese e 7,0.

Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos de interação vesícula-lactato de cálcio.

Amostras	$\Delta_{\text{int}}G$ (kJ/mol)	$\Delta_{\text{int}}H$ (kJ/mol)	$T\Delta_{\text{int}}S$ (kJ/mol)
PCDA/ES/CO	pH 4,61	-0,67	20,35
	pH 7,0	-8,19	nd
	pH 2,0	6,71	20,04
PCDA/DMPC	pH 6,13	-15,8	18,52
	pH 7,0	-6,08	nd
	pH 2,0	10,51	-2,56

nd: não determinado

Tabela 3 – Parâmetros termodinâmicos de interação vesícula-lactato de sódio.

Amostras	$\Delta_{\text{int}}G$ (kJ/mol)	$\Delta_{\text{int}}H$ (kJ/mol)	$T\Delta_{\text{int}}S$ (kJ/mol)
PCDA/ES/CO	pH 4,61	-13,83	nd
	pH 7,0	-10,98	nd
	pH 2,0	0,28	71,70
PCDA/DMPC	pH 6,13	-5,59	4,45
	pH 7,0	-7,84	nd
	pH 2,0	0,02	-0,20
PCDA/DMPG	pH 5,57	-8,34	nd
	pH 7,0	-16,96	nd
	pH 2,0	21,94	nd
PCDA	pH 6,42	-8,24	nd
	pH 7,0	-4,8	nd

nd: não determinado

A variação da energia livre de Gibbs é determinada por duas componentes. Uma é a energia de interação entre pares potenciais, componente entálpica, e outra é dada pelo número de configurações do sistema, componente entrópica (Equação 5). As medidas de calorimetria foram feitas para determinar estas duas componentes.

$$\Delta_{\text{int}}G = \Delta_{\text{int}}H - T\Delta_{\text{int}}S \quad (6)$$

sendo  $\Delta_{int}G$  a variação da energia livre de Gibbs de interação;  $\Delta_{int}H$  a variação da entalpia de interação e  $\Delta_{int}S$  a variação da entropia de interação.

A partir de medidas microcalorimétricas, observou-se que a variação da entalpia de interação ( $\Delta_{int}H$ ) entre as vesículas e o lactato foi positiva e constante (Figura 24). Verifica-se também que a interação entre as espécies, lactato e vesículas em pH de síntese (PCDA/ES/CO e PCDA/DMPC), e a transição colorimétrica são fenômenos endotérmicos governados entropicamente. Este resultado pode ser explicado pelo efeito hidrofóbico, em que moléculas de lactato e as vesículas interagem entre si liberando as moléculas de água que as solvavam provocando assim, um aumento da entropia do sistema.

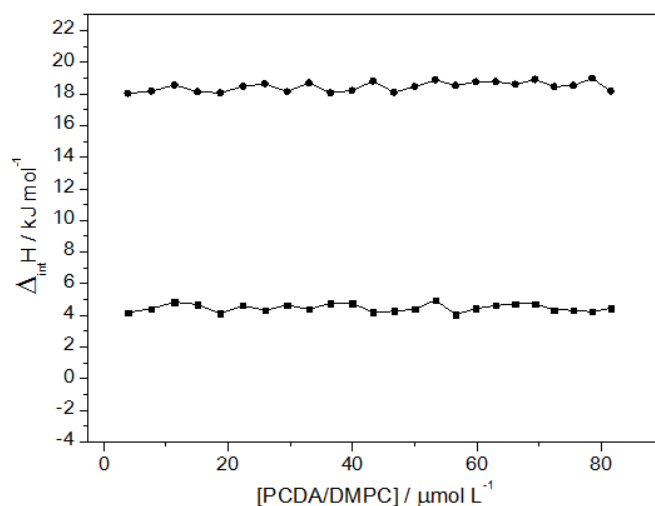


Figura 24 - Variação da entalpia de interação ( $\Delta_{int}H$ ) de vesículas de PCDA/DMPC em função da adição de lactato de cálcio (■) e lactato de sódio (●)

Para a vesícula de PCDA/DMPC em pH 2,0, a interação com lactato de cálcio e sódio foi entalpicamente favorável, no entanto, a liberação de energia entálpica não compensou a perda entrópica. Provavelmente, a pequena redução de entalpia ocorre porque poucas moléculas são capazes de interagir com a vesícula neste pH em função da presença de poucos sítios ativos

presentes na superfície vesicular, uma vez que a maioria dos grupos carboxílicos polidiacetilênicos encontram-se neutralizados neste pH. Desta forma, um grande número de moléculas de lactato e de vesículas está sendo solvatada pela água provocando assim, uma redução da entropia do sistema. Para a vesícula de PCDA/ES/CO em pH 2,0, a interação com o lactato foi entropicamente favorável mas não capaz de compensar o aumento de entalpia causado por esta interação. Neste pH, esta vesícula possui um maior número de grupos carboxílicos ionizados permitindo a maior interação dos mesmos com o lactato, no entanto esta interação provoca um aumento da entalpia que não é compensando pelo aumento da entropia do sistema causado pela liberação das moléculas de água que solvatam as vesículas e o lactato.

Segundo Pires et al. (2010a) as energias associadas à transição colorimétrica reforçam a hipótese de que a mesma ocorre em virtude de alterações conformacionais devido à rotação de grupos funcionais ao redor de ligações simples carbono-carbono presentes nas cadeias de PCDA.

A Tabela 4 apresenta os valores de diâmetro hidrodinâmico das diferentes vesículas em pH de síntese, 7,0 e 2,0. Observou-se que o diâmetro das vesículas variou em função da composição e da condição termodinâmica do meio (pH). A incorporação de lipídeos provocou o aumento do diâmetro hidrodinâmico das vesículas em função da redução do empacotamento molecular causada pelo DMPC e DMPC e da formação de microdomínios de ES e CO.

Tabela 4 – Diâmetro hidrodinâmico das vesículas de PCDA, PCDA/ES/CO, PCDA/DMPC e PCDA/DMPG em pH de síntese, pH 7,0 e pH 2,0.

pH	PCDA	PCDA/ES/CO	PCDA/DMPC	PCDA/DMPG
Síntese	106,12 <sup>a</sup> ± 0,06	361,51 <sup>b</sup> ± 51,41	176,94 <sup>b</sup> ± 14,10	213,36 <sup>a,b</sup> ± 5,82
7,0	106,21 <sup>a</sup> ± 0,13	339,39 <sup>b</sup> ± 5,87	190,36 <sup>b</sup> ± 1,45	188,28 <sup>b</sup> ± 5,42
2,0	nd	1311,75 <sup>a</sup> ± 173,18	223,99 <sup>a</sup> ± 2,03	255,85 <sup>a</sup> ± 69,7

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade.

As Figuras 25 e 26 mostram o comportamento do diâmetro hidrodinâmico das vesículas de PCDA/DMPC e PCDA/ES/CO, respectivamente, em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de cálcio, em diferentes pHs. O aumento da concentração de lactato provocou um aumento do diâmetro hidrodinâmico das vesículas, sendo este efeito mais pronunciado para vesículas em pH 7,0.

Em pH 6,13 e pH 7,0, as vesículas de PCDA/DMPC aumentaram bruscamente de tamanho até a concentração de 0,0166 e 0,0332 mol.L<sup>-1</sup> de lactato, respectivamente e, posteriormente, o tamanho permaneceu inalterado ( $p > 0,05$ ). Em pH 2,0, as vesículas apresentaram um ligeiro aumento de tamanho.

Nas vesículas de PCDA/ES/CO em pH de síntese e pH 7,0 o aumento da concentração de lactato provocou um aumento do diâmetro hidrodinâmico, no entanto, em pH 7,0, as vesículas tiveram seu diâmetro estabilizado em, aproximadamente, 3400 nm após a concentração de 0,0498 mol.L<sup>-1</sup> de lactato. Em pH 2,0, o tamanho inicial das vesículas foi maior ( $p < 0,05$ ) em função da agregação das vesículas neste pH, que ocorre pois a superfície das vesículas encontra-se neutralizada, facilitando a aproximação e agregação das mesmas.

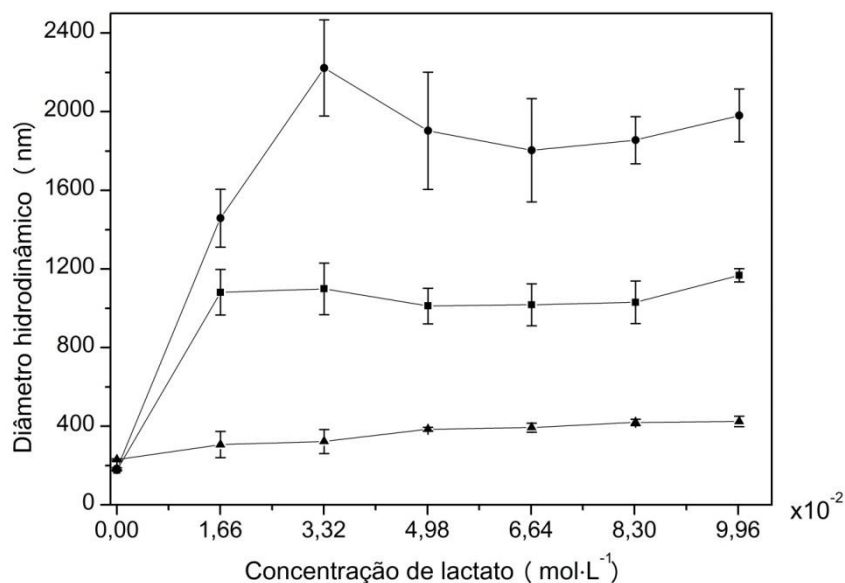


Figura 25 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das vesículas de PCDA/DMPC em função da concentração de lactato, proveniente lactato de cálcio, em (■) pH 6,13, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.



Figura 26 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das vesículas de PCDA/ES/CO em função da concentração de lactato, proveniente lactato de cálcio, em (■) pH 4,61, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

As Figuras 27, 28, 29 e 30 mostram o diâmetro hidrodinâmico das vesículas de PCDA, PCDA/ES/CO, PCDA/DMPC e PCDA/DMPG, respectivamente, em função da concentração do ânion lactato, proveniente do lactato de sódio, em diferentes pHs.

Em pH de síntese e pH 7,0, as vesículas aumentaram seu diâmetro com o aumento da concentração de lactato, no entanto, em pH 7,0 o aumento de tamanho foi mais pronunciado, exceto para as vesículas de PCDA/DMPG.

As vesículas de PCDA/ES/CO em pH 2,0, apresentaram maior diâmetro hidrodinâmico inicial ( $p < 0,05$ ) em função da agregação das vesículas. Neste mesmo pH, as vesículas de PCDA/DMPC e PCDA/DMPG aumentaram de tamanho com a elevação da concentração do lactato.

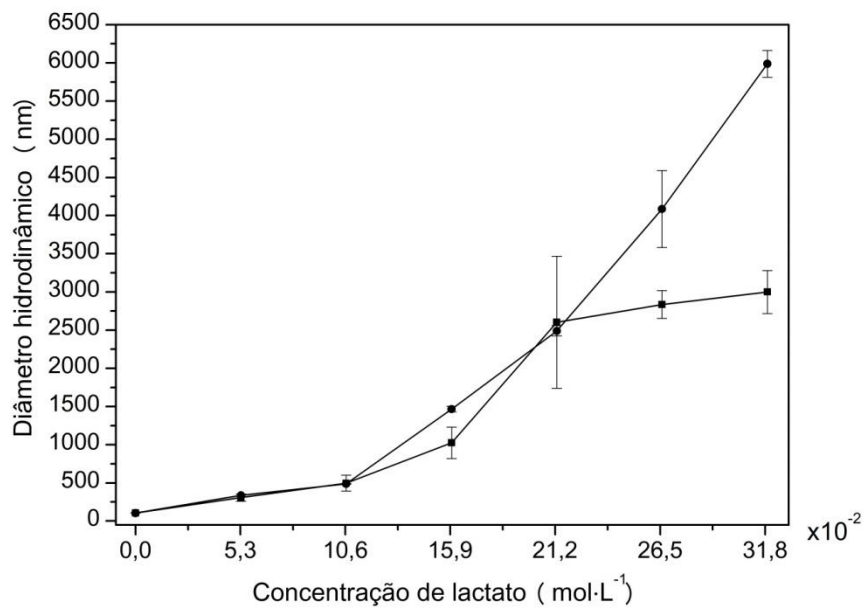


Figura 27 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das vesículas de PCDA em função da concentração de lactato, proveniente lactato de sódio, em (■) pH 6,42 e (●) pH 7,0.

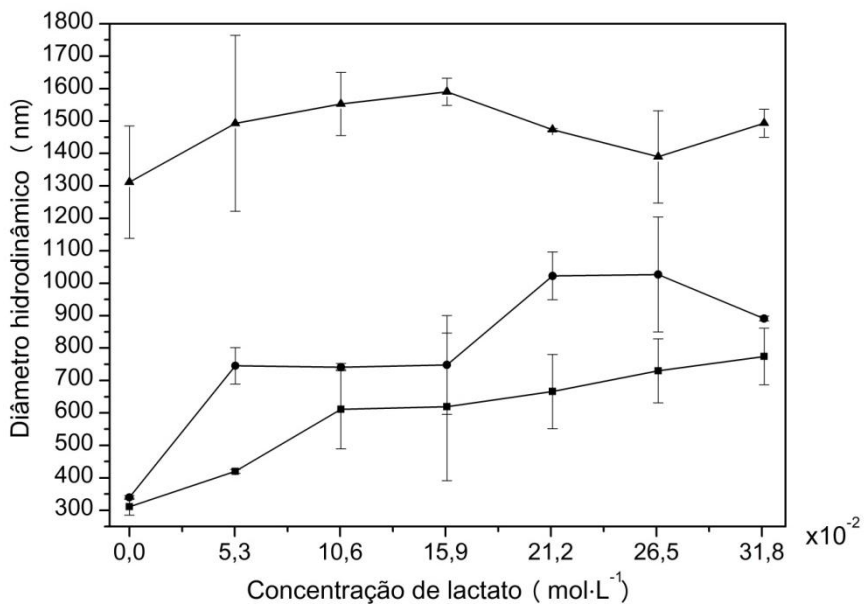


Figura 28 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das vesículas de PCDA/ES/CO em função da concentração de lactato, proveniente lactato de sódio, em (■) pH 4,61, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

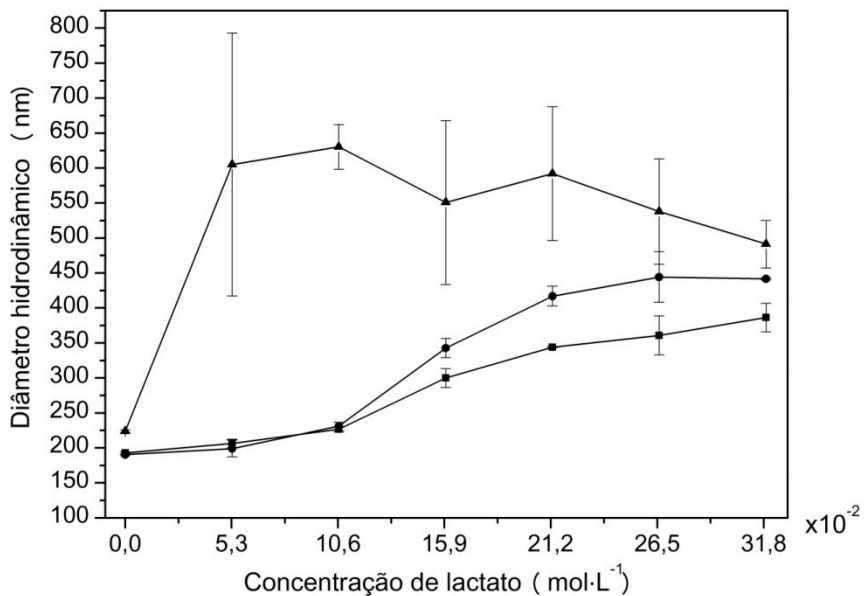


Figura 29 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das vesículas de PCDA/DMPC em função da concentração de lactato, proveniente lactato de sódio, em (■) pH 6,13, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

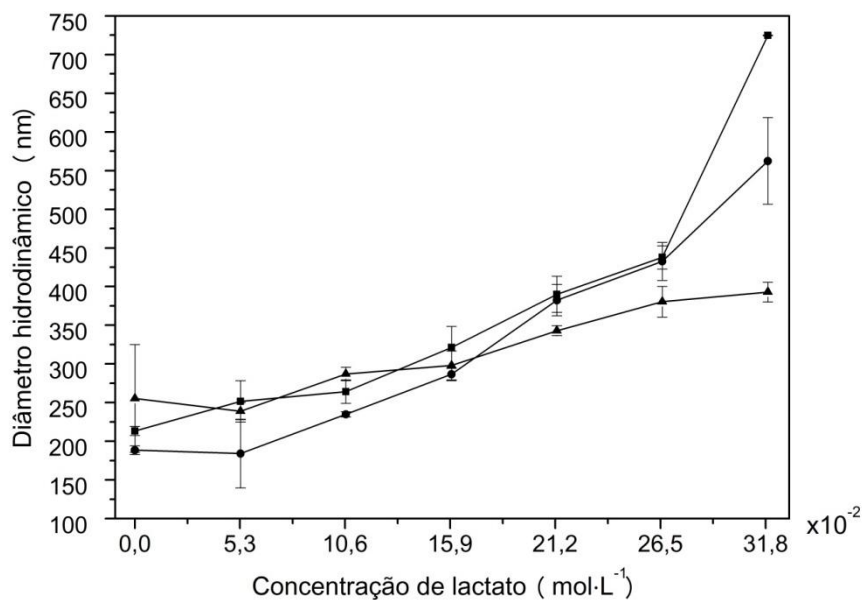


Figura 30 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das vesículas de PCDA/DMPG em função da concentração de lactato, proveniente lactato de sódio, em (■) pH 5,57, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

Pela avaliação do diâmetro das vesículas em função da concentração de lactato, provenientes do lactato de cálcio ou se sódio, observa-se que o crescimento das vesículas não está relacionado com a transição colorimétrica

gerada pela mudança conformacional das moléculas polidiacetilênicas uma vez que vesículas que não sofreram mudança de cor apresentaram aumento do diâmetro hidrodinâmico e, além disso, as maiores respostas colorimétricas não estão associadas ao maior tamanho de vesícula. Portanto, o crescimento das vesículas não provoca mudança no empacotamento das moléculas no interior das mesmas.

Provavelmente, o crescimento das vesículas está relacionado à desestruturação da superfície das mesmas. Dois mecanismos podem estar envolvidos no crescimento das vesículas. O primeiro trata-se do crescimento vesicular por coalescência. Este mecanismo ocorre pela neutralização das cargas da superfície das vesículas pelo  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Na}^+$  dos sais de lactato, rompendo a repulsão eletrostática entre as vesículas que inicialmente apresentavam superfície carregada negativamente. A ausência de carga na superfície vesicular permite a aproximação e colisão das vesículas, que podem se unir por coalescência, resultando em vesículas maiores. O segundo mecanismo trata-se da difusão de moléculas de polidiacetileno entre as vesículas pelo fenômeno de maturação de Ostwald, fazendo com que as vesículas maiores aumentem de tamanho e reduzindo o tamanho das menores até o seu desaparecimento.

Observou-se também que foi necessária uma maior concentração de lactato de sódio em comparação ao lactato de cálcio para aumentar o tamanho das vesículas na mesma magnitude. Este fato está relacionado à maior proporção de cargas positivas fornecidas pelo cálcio em relação ao sódio. Desta forma, menos cátions são necessários para neutralizar as cargas negativas presentes na interface vesicular, favorecendo a coalescência com menores concentrações de lactato de cálcio.

As vesículas em pH 7,0 apresentaram maior crescimento em relação às vesículas em pH de síntese. A maior ionização dos grupos carboxílicos do PCDA desestabiliza a superfície vesicular e, conseqüentemente, o interior hidrofóbico da vesícula, deixando-a menos estável, isto é, com um maior

conteúdo de energia. O tamanho da vesícula é aumentado buscando reduzir seu conteúdo de energia, tornando-a, portanto mais estável.

A Figura 31 mostra o comportamento do pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de cálcio, das vesículas de PCDA/DMPC nos diferentes pHs avaliados. Para as vesículas que inicialmente apresentavam pH de 6,13, 7,0 e 2,0 sofreram mudanças nos valores de pH após sua diluição em água deionizada, sendo o pH final de  $6,52 \pm 0,07$ ,  $6,77 \pm 0,18$  e  $2,42 \pm 0,01$ , respectivamente. As vesículas em pH 6,13 e 7,0, apresentaram pequenas mudanças no pH com o aumento da concentração de lactato e, o pH foi estabilizado em, aproximadamente, 6,6. Para vesículas em pH 2,0, o aumento da concentração de lactato provocou um aumento do pH do sistema, tendendo à estabilização.

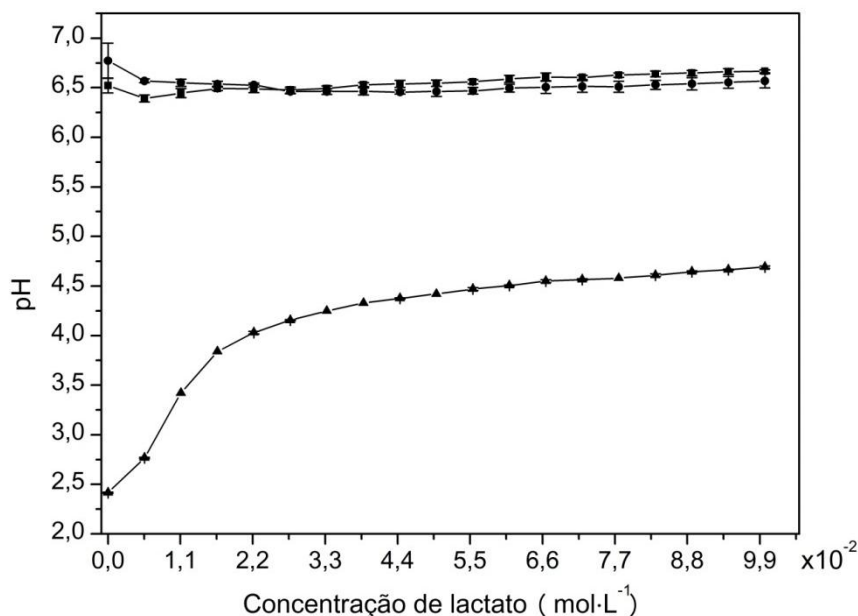


Figura 31 – Valores de pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de cálcio, das vesículas de PCDA/DMPC em (■) pH 6,13, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

A Figura 32 mostra o comportamento do pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de cálcio, das vesículas de PCDA/ES/CO nos diferentes pHs avaliados. Para as vesículas que inicialmente apresentavam pH de 4,61, 7,0 e 2,0 sofreram mudanças nos valores de pH após sua diluição em

água deionizada, sendo o pH final de  $5,86 \pm 0,34$ ,  $6,91 \pm 0,04$  e  $2,41 \pm 0,01$ , respectivamente. As vesículas em pH 7,0, apresentaram ligeira redução do pH enquanto as vesículas em pH 4,61 apresentaram pequeno aumento do pH com o aumento da concentração de lactato e, ambas tiveram o pH estabilizado em, aproximadamente, 6,4. Para vesículas em pH 2,0, o aumento da concentração de lactato provocou um aumento do pH do sistema, tendendo à estabilização.

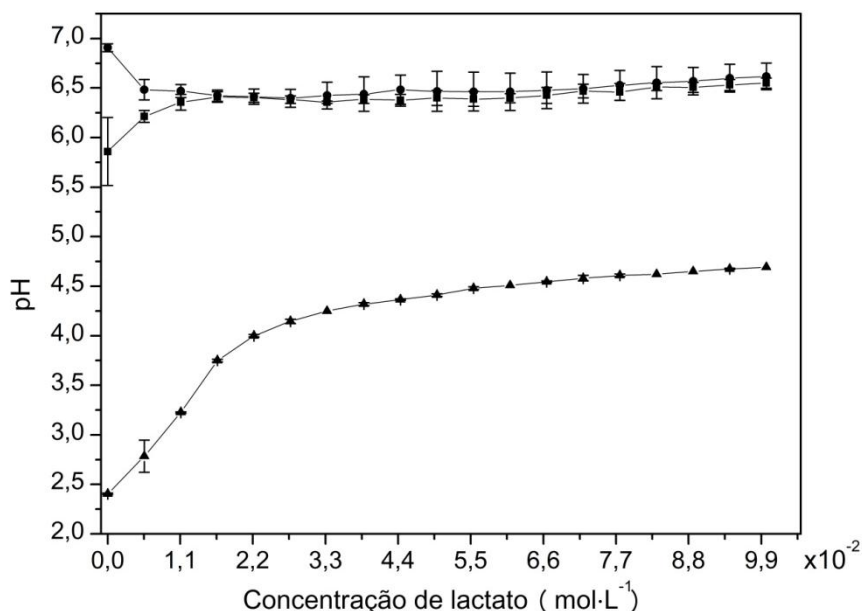


Figura 32 – Valores de pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de cálcio, das vesículas de PCDA/ES/CO em (■) pH 4,61, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

A redução do pH das vesículas de PCDA/DMPC em pH 6,13 e pH 7,0 e da vesícula de PCDA/ES/CO em pH 7,0 em função do aumento da concentração de lactato, ocorre, provavelmente, em função da ligação do  $\text{Ca}^{++}$  na interface da vesícula liberando  $\text{H}^+$  dos grupos carboxílicos. O aumento do pH da vesícula de PCDA/ES/CO em pH 4,61 e pH 2,0 e da vesícula de PCDA/DMPC em pH 2,0 em função do aumento da concentração de lactato pode estar relacionado à hidrólise do lactato associada à hidrólise da água. Provavelmente, o ânion lactato reage com o íon  $\text{H}^+$  da água formando ácido láctico e  $\text{OH}^-$ , levando ao aumento do pH. O ácido láctico gerado forma um tampão com o lactato de cálcio o que explica a estabilização do mesmo.

A Figura 33, 34, 35 e 36 apresentam o comportamento do pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de sódio, das vesículas de PCDA, PCDA/ES/CO, PCDA/DMPC e PCDA/DMPG nos diferentes pHs avaliados, respectivamente. O pH inicial das vesículas foi alterado pela diluição das mesmas em água. As vesículas com pH de síntese e com pH 7,0, apresentaram pH final entre 6,0 e 7,0, enquanto as vesículas com pH 2,0, apresentaram pH final entre 2,0 e 3,0. Para todas as vesículas no diferentes pHs, o aumento da concentração de lactato provocou uma elevação do pH das suspensões vesiculares. No entanto, a elevação do pH das vesículas em pH de síntese e pH 7,0 foi suave, enquanto as vesículas em pH 2,0 apresentaram um aumento acentuado do pH tendendo à estabilização.

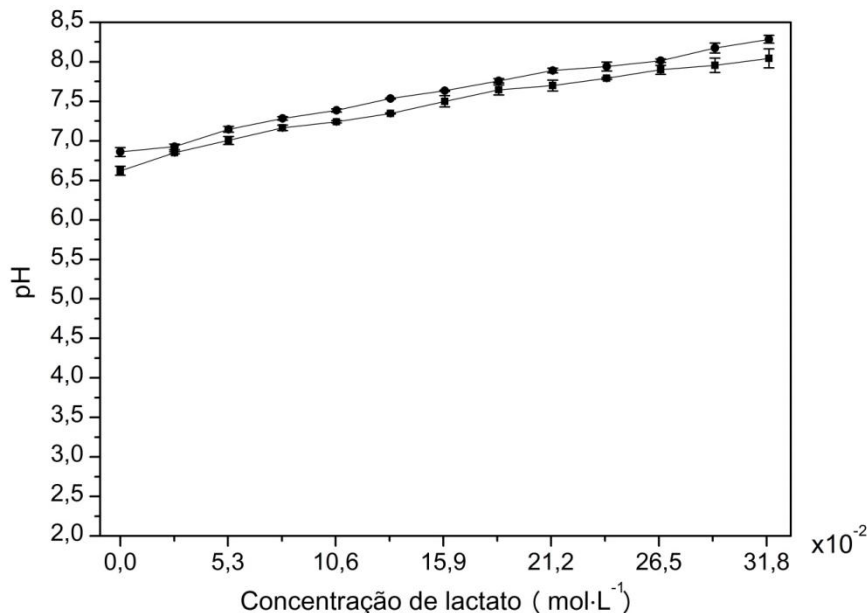


Figura 33 – Valores de pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de sódio, das vesículas de PCDA em (■) pH 6,42 e (●) pH 7,0.

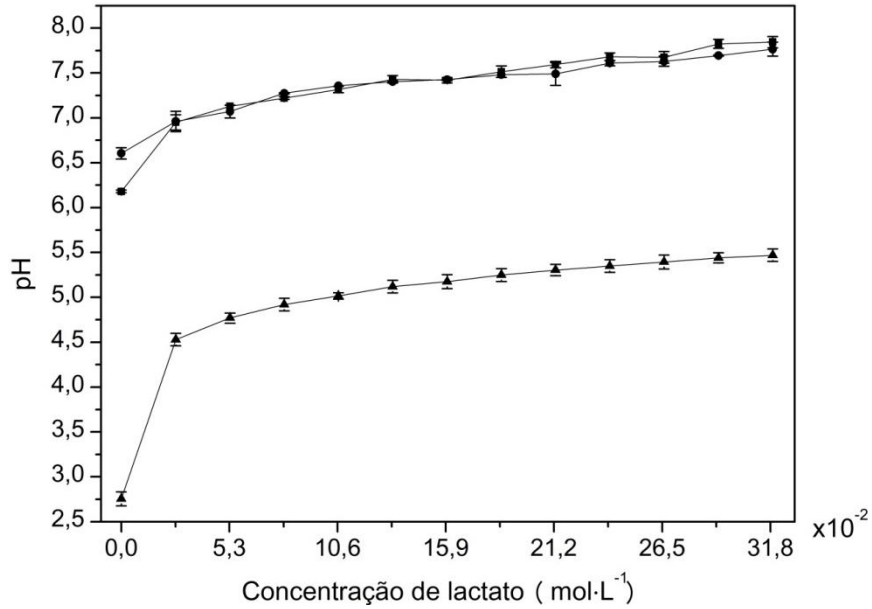


Figura 34 – Valores de pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de sódio, das vesículas de PCDA/ES/CO em (■) pH 4,61, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

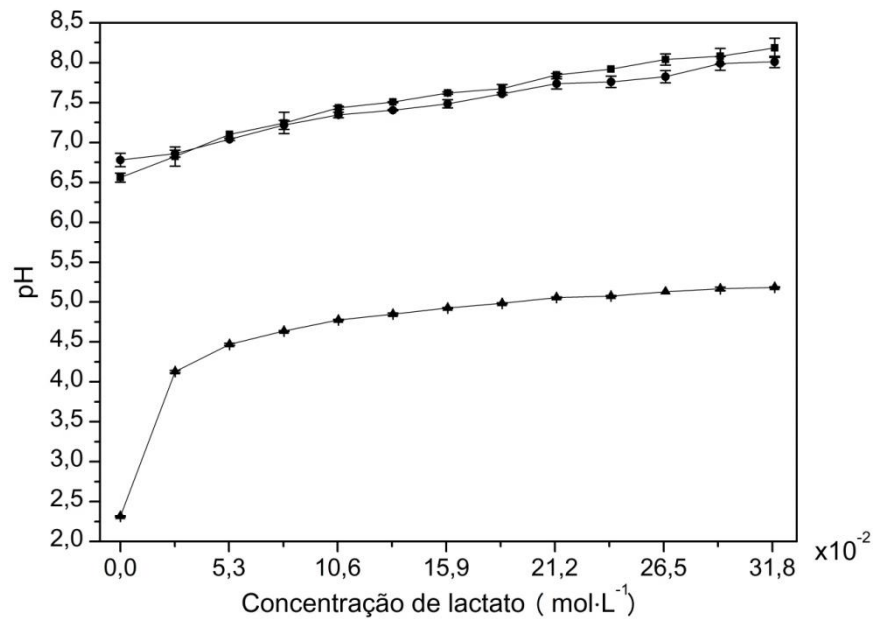


Figura 35 – Valores de pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de sódio, das vesículas de PCDA/DMPC em (■) pH 6,13, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

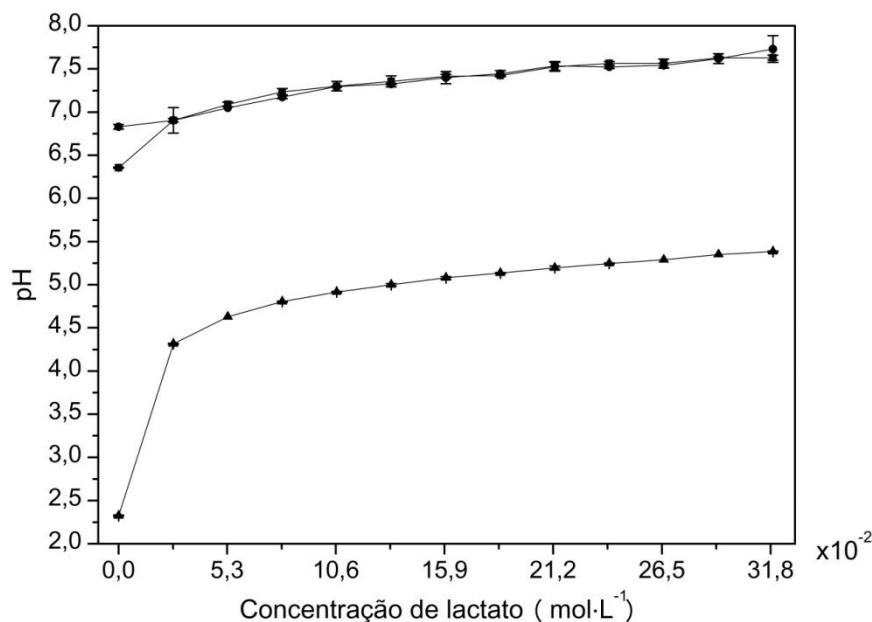


Figura 36 – Valores de pH em função da concentração de lactato, proveniente do lactato de sódio, das vesículas de PCDA/DMPG em (■) pH 5,57, (▲) pH 2,0 e (●) pH 7,0.

O aumento do pH das suspensões vesiculares em função do aumento da concentração de lactato também pode estar relacionado à hidrólise do lactato associada à hidrólise da água. Provavelmente, o ânion lactato reage com o íon  $H^+$  da água formando ácido láctico e  $OH^-$ , levando ao aumento do pH. O aumento da concentração de lactato pode estar relacionado à hidrólise do lactato associada à hidrólise da água. Provavelmente, o ânion lactato reage com o íon  $H^+$  da água formando ácido láctico e  $OH^-$ , levando ao aumento do pH. Em pH 2,0, o ácido láctico gerado forma um tampão com o lactato de sódio o que explica a estabilização do mesmo.

## 6. CONCLUSÃO

A presença de lactato provocou a transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo a interação entre as espécies dependente da composição das nanoestruturas vesiculares, da condição termodinâmica do meio (pH) e do contraíon da molécula de lactato. Estes resultados apontam a potencialidade do uso destas nanoestruturas como sensores para íons lactato em diferentes sistemas.

A análise termodinâmica permitiu determinar a força motriz responsável pela transição colorimétrica dos polidiacetilenos, sendo o processo endotérmico o que demonstra que a energia necessária para desidratar as vesículas e o lactato torna o processo entalpicamente desfavorável. Por outro lado, a variação da energia livre de Gibbs de interação entre as vesículas de polidiacetileno e o lactato demonstrou que a transição colorimétrica é um fenômeno termodinamicamente favorável nos pHs de síntese e 7,0, sendo, portanto, governado pelo aumento da entropia do sistema.

O tamanho das nanoestruturas de polidiacetileno demonstrou estar relacionado com a estabilidade interfacial e dos núcleos hidrofóbicos das vesículas, não estando condicionado à mudança de conformação das cadeias polidiacetilênicas e, conseqüentemente, à transição colorimétrica.

Este trabalho auxiliou no entendimento do comportamento do processo molecular associado à transição colorimétrica das vesículas e, além disso, serviu de base para uma futura aplicação das vesículas como sensores ou biossensores colorimétricos em alimentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHL, P.L., PRICE, R., SMUDA, J., GABER, B.P., SINGH, A. Insertion of bacteriorhodopsin into polymerized diacetylenic phosphatidylcholine bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1028, p. 141-153, 1990.

AHN, D.J., CHAE, E.H., LEE, G.S., SHIM, H.Y., CHANG, T.E., AHN, K.D., KIM, J.M. Colorimetric reversibility of polydiacetylene supramolecules having enhanced hydrogen-bonding under thermal and pH stimuli. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 8976-8977, 2003.

AHVENAINEN, R. Active and intelligent packaging. In: AHVENAINEN, R. **Novel Food Packaging Techniques**. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 4-20, 2003.

AKIMOTO, A., DORN, K., GROS, L., RINGSDORF, H., SCHUPP, H. Polymer Model Membranes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 20, p. 90-91, 1981.

ALOCILJA, E. C., RADKE, S. M. Market analysis of biosensors for food safety. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 841–846, 2003.

ALZAMORA, S.M., SALVATORI, D., TAPIA, M.S., LOPEZ-MALO, A., WELTI-CHANGES, J., FITO, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 205–214, 2005.

ARAN, N. The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in a 'sous-vide' beef goulash under temperature abuse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 117–123, 2001.

BERGSTRÖM, M. Thermodynamics of unilamellar vesicles: Influence of mixing on the curvature free energy of a vesicle bilayer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 294-306, 2001.

BOBACKA, J., IVASKA, A., LEWENSTAM, A. Potentiometric ion sensors. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 329–351, 2008.

BORISOV, S.M., WOLFBEIS, O.S. Optical biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 423–461, 2008.

BOTREL, D.A., SOARES, N.F.F., CAMILLOTO, G.P., FERNANDES, R.V.B. Revestimento ativo de amido na conservação pós-colheita de pêra Williams minimamente processada. **Ciência Rural**, v.40, p. 1814-1820, 2010

BOULLANGER, P., LAFONT, D., BOUCHU, M-N, JIANG, L., LIU, T., LU, W., GUO, C.X., LI, J. The use of glycolipids inserted in color-changeable

polydiacetylene vesicles, as targets for biological recognition. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, p. 43-60, 2008.

BRASIL. Compêndio da legislação brasileira de aditivos alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, Brasília, DF, 2011. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6809d8047457a1c86c0d63fbc4c6735/Compendio\\_marco\\_2011.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6809d8047457a1c86c0d63fbc4c6735/Compendio_marco_2011.pdf?MOD=AJPERES).

BREWER, M.S., ROSTOGI, B.K., ARGOUDELIS, L., SPROULS, G.K. Sodium lactate/ sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 58–62, 1995.

BRODY, A.L. Smart packaging becomes intellipac™. **Food Technology**, v. 54, p. 104–107, 2000.

CARPICK, R.W., SASAKI, D.Y., BURNS, A.R. First observation of mechanochromism at the nanometer scale. **Langmuir**, v. 16, p. 1270-1278, 2000.

CARPICK, R.W., SASAKI, D.Y., MARCUS, M.S., ERIKSSON, M.A., BURNS, A.R. Polydiacetylene films: a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **Institute of Physics Publishing: Condensed Matter**, v.16, p. 679-697, 2004.

CHAROENTHAI, N., PATTANATORNACHAI, T., WACHARASINDHU, S., SUKWATTANASINITT, M., TRAIHOL, R. Role of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, p. 565-573, 2011.

CHARYCH, D., CHENG, Q., REICHERT, A., KUZIEMKO, G., STROH, M., NAGY, J.O., SPEVAK, W., STEVENS, R.C. A 'litmus test' for molecular recognition using artificial membranes. **Chemistry and Biology**, v. 3, p. 113-120, 1996.

CHARYCH, D.H., NAGY, J.O., SPEVAK, W., BEDNARSKI, M.D. Direct colorimetric detection of a receptor–ligand interactions by a polymerized bilayer assembly. **Science**, v. 261, p. 585–588, 1993.

CHEN, X., JIANG, H., WANG, Y., ZOU, G., ZHANG, Q.  $\beta$ -Cyclodextrin-induced fluorescence enhancement of a thermal-responsive azobenzene modified polydiacetylene vesicles for a temperature sensor. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, p. 36–40, 2010.

- CHENG, Q., STEVENS, R.C. Charge-Induced Chromatic Transition of Amino Acid-Derivatized Polydiacetylene Liposomes. **Langmuir**, v. 14, p. 1974-1976, 1998.
- CHU, B., XU, R. Chromatic Transition of Polydiacetylene in Solution. **Accounts of Chemical Research**, v. 24, p. 384-389, 1991.
- DAINELLI, D., GONTARD, N., SPYROPOULOS, D., ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN, E., TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, p. S103-S112, 2008.
- DANALEWICH, J.R., PAPAGIANNIS, T.G., BELYEA, R.L., TUMBLESÓN, M.E., RASKIN, L.M. Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal. **Water Research**, v. 32, p. 3555-3568, 1998.
- DATTA, R., TSAI, S.-P., BONSIGNORE, P., MOON, S.-H., FRANK, J.R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.
- DAVIDSON, M. **Antimicrobials in food: Lactates**, 3<sup>a</sup> Ed. Florida, CRC Press, 2005. 685 p.
- DAY, B.P.F. Active Packaging of Food. In: KERRY, J., BUTLER, P. **Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods**. John Wiley and Sons Ltd., pp. 1-18, 2008.
- DEI, S., MATSUMOTO, A., MATSUMOTO, A. Thermochromism of polydiacetylenes in the solid state and in solution by the self-organization of polymer chains containing no polar group. **Macromolecules**, v. 41, p. 2467, 2008.
- DING, L., DU, D., ZHANG, X.J., JU, H.X. Trends in cell-based electrochemical biosensors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3160–3170, 2008.
- FUHRHOP, J.-H., KÖNING, J. **Membranes and molecular assemblies: The synkinetic approach**. , Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1994.
- GARCIA, J.M., HERRERA, S., MORILLA, A. Effects of postharvest dips in calcium chloride on strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 30–33, 1996.
- GIOKAS, D.L., VLESSIDIS, A.G. Synthetic membranes (vesicles) in inorganic ion analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 683, p. 156-169, 2011.
- GOU, M.L., GUO, G., ZHANG, J., MEN, K., SONG, J., LUO, F., ZHAO, X., QIAN, Z.Y., WEI, Y.Q. Time–temperature chromatic sensor based on

polydiacetylene (PDA) vesicle and amphiphilic copolymer. **Sensors and Actuators B**, v. 150, p. 406–411, 2010.

GRADZIELSKI, M. Vesicles and vesicle gels - structure and dynamics of formation. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 15, p. R655-R697, 2003.

GUIDA, V. Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 161, p. 77-88, 2010.

GUO, C., ZHANG, R., JIANG, L., LIU, T. Investigation on the temperature effect of a mixed vesicle composed of polydiacetylene and BODIPY 558. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 41–45, 2007.

HALEVY, R., ROZEK, A., KOLUSHEVA, S., HANCOCK, R.E.W., JELINEK, R. Membrane binding and permeation by indolicidin analogs studied by a biomimetic lipid/polydiacetylene vesicle assay. **Peptides**, v. 24, p. 1753-1761, 2003.

HAN, J.H., HO, C.H.L., RODRIGUES, E.T. Intelligent packaging. In: HAN, J. **Innovations in food packaging**. Elsevier Science & Technology Books, pp. 138-155, 2005.

HEWAJULIGE, I.G.N., WILSON-WIJERATNAM, R.S., WIJESUNDERA, R.L.C., ABEYSEKERE, M. Fruitcalcium concentration and chilling injury during low temperature storage of pineapple. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1451–1454, 2003.

HOLOPAINEN, J.M., METSO, A.J., MATTILA, J.P., JUTILA, A., KINNUNEN, P.K.J. Evidence for the Lack of a Specific Interaction between Cholesterol and Sphingomyelin. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 1510–1520, 2004.

HUB, D.-C.H.-H., HUPFER, D.-C.B., KOCH, D.-C., RINGSDORF, H. Polymerizable Phospholipid Analogues—New Stable Biomembrane and Cell Models. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 19, p. 938-940, 1980.

HUPFER, B., RINGSDORF, H., SCHUPP, H. Liposomes from polymerizable phospholipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 33, p. 355-374, 1983.

IBRAHEEM, A., CAMPBELL, R.E. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 30–36, 2010.

JELINEK, R., OKADA, S.Y., NORVEZ, S., CHARYCH, D.H. Interfacial catalysis by phospholipases at conjugated lipid vesicles: colorimetric detection and NMR spectroscopy. **Chemistry and Biology**, v. 5, p. 619-629, 1998.

JOHNSTON, D.S., McLEAN, L.R., WHITTAM, M.A., CLARK, A.D., CHAPMAN, D. Spectra and physical properties of liposomes and monolayers of polymerizable phospholipids containing diacetylene groups in one or both acyl chains? **Biochemistry**, v. 22, p. 3194-3202, 1983.

JOHNSTON, D.S., SANGHERA, S., MANJON-RUBIO, A., CHAPMAN, D. The formation of polymeric model biomembranes from diacetylenic fatty acids and phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 602, 213-216, 1980b.

JOHNSTON, D.S., SANGHERA, S., PONS, D., CHAPMAN, D. Phospholipid polymers – Synthesis and spectral characteristics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 602, p. 57-69, 1980.

JONAS, U., SHAH, K., NORVEZ, S., CHARYCH, D.H. Reversible color switching and unusual solution polymerization of hydrazide-modified diacetylene lipids. **Journal of American Chemical Society**, v. 121, p. 4580–4588, 1999.

JONG, A.R., BOUMANS, H., SLAGHEK, T., VAN VEEN, J., RIJK, R., VAN ZANDVOORT, M. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 10, p. 975–979, 2005.

JU, L., VERMA, A. Characteristics of Lactic Acid Transport in Supported Liquid Membranes. **Separation Science and Technology**, v. 29, p. 2299-2315, 1994.

JUNG, Y.K., KIM, T.W., JUNG C., CHO, D.Y., PARK, H.G. A polydiacetylene microchip based on a biotin-streptavidin interaction for the diagnosis of pathogen infections. **Small**, v. 4, p. 1778-1784, 2008.

JUNG, Y.K., PARK, H.G., KIM, J.M. Polydiacetylene (PDA)-based colorimetric detection of biotin–streptavidin interactions. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21 p. 1536–1544, 2006.

KAREL, M. Tasks of food technology in the 21st century. **Food Technology**, v. 54, p. 56–64, 2000.

KERRY, J.P., O'GRADY, M.N., HOGAN, S.A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, p. 113–130, 2006.

KEW, S.J.; HALL, A.H. Structural effect of polymerisation and dehydration on bolaamphiphilic polydiacetylene assemblies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, p. 2039-2047, 2006.

KIM, J.M., LEE, Y.B., YANG, D.H., LEE, J.S., LEE, G.S., AHN, D.J. Polydiacetylene-Based Fluorescent Sensor Chip. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 17580-17581, 2005.

- KIM, K.W., CHOI, H., LEE, G.S., AHN, D.J., OH, M.K. Effect of phospholipids insertion on arrayed polydiacetylene biosensors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 213-217, 2008.
- KIM, Y.H., HUFF-LONERGAN, E., SEBRANEK, J.G., LONERGAN, S.M. Effects of lactate/phosphate injection enhancement on oxidation stability and protein degradation in early postmortem beef cuts packaged in high oxygen modified atmosphere. **Meat Science**, v. 86, p. 852–858, 2010.
- KIM, Y.H., KEETON, J.T., SMITH, S.B., MAXIM, J.E., YANG, H.S., SAVELL, J.W. Evaluation of antioxidant capacity and colour stability of calcium lactate enhancement on fresh beef under highly oxidizing condition. **Food Chemistry**, v. 115, p. 272–278, 2009.
- KOLUSHEVA, S., KAFRI, R., KATZ, M., JELINEK, R. Rapid colorimetric detection of antibody-epitope recognition at a biomimetic membrane interface. **Journal of American Chemistry Society**, v. 123, p. 417–422, 2001.
- KOLUSHEVA, S., SHAHAL, T., JELINEK, R. Cation-selective color sensors composed of ionophore–phospholipid–polydiacetylene mixed vesicles. **Journal of American Chemical Society**, v. 122, p. 776-780, 2000.
- KRESS-ROGERS, E. Chemosensors, biosensors and immunosensors. In: KRESS-RODGERS, E. **Instrumentation and sensors for the food industry**. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 581–669, 1998b.
- KRESS-ROGERS, E. Terms in instrumentation and sensors technology. In: KRESS-RODGERS, E. **Instrumentation and sensors for the food industry**. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 673–691, 1998a.
- LAWRENCE, T.E., DIKEMAN, M.E., HUNT, M.C., KASTNER, C.L., JOHNSON, D.E. Effects of calcium salts on beef longissimus quality. **Meat Science**, v. 64, p. 299–308, 2003.
- LEE, S., KIM, J.M.  $\alpha$ -Cyclodextrin: A Molecule for Testing Colorimetric Reversibility of Polydiacetylene Supramolecules. **Macromolecules**, v. 40, p. 9201, 2007.
- LEE, S.S., CHAE, E.H., AHN, D.J., AHN, K.H., YEO, J.K. Shear-induced color transition of PDA (polydiacetylene) liposome in polymeric solutions. **Korea-Australia Rheology Journal**, v. 19, p. 43-47, 2007.
- LEE., D.C., SAHOO, S.K., CHOLLI, A.L., SANDMAN, D.J. Structural Aspects of the Thermochromic Transition in Urethane-Substituted Polydiacetylenes. **Macromolecules**, v. 35, p. 4347-4355, 2002.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. I., COX, M. **Princípios de Bioquímica**, 2<sup>a</sup> ed., Editora Sarvier, Rio de Janeiro, 1995.

LEI, Y., CHEN, W., MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, p. 200–210, 2006

LEONARD, P., HEARY, S., BRENNAN, J., DUNNE, L., QUINN, J., CHARKRABORTY, T., O'KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 3-13, 2003.

LINDELL, W.E., MURRAY, C., PRESTON, P.N., WOODMAN, T.A.J. Synthesis of 1,3-diyne in the purine, pyrimidine, 1,3,5-triazine and acridine series. **Tetrahedron**, v. 56, p. 1233–1245, 2000.

LIPINSKI, E.S., SINCLAIR, R.S. Is a lactic acid a commodity chemical. **Chemical and Engineering Progress**, v. 82, p. 26-32, 1986.

LOPEZ, E., O'BRIEN, D.F., WHITESIDES, T.H. Structural effects on the photopolymerization of bilayer membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 305-307, 1982.

LUNA-GUZMAN, M.C., BARRETT, D.M. Comparison of calcium chloride and calcium lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes. **Postharvest in Biology Technology**, v. 19, pp. 61-72, 2000.

LUONG, H.H.T., GROOM, C.A., MALE, K.B. The potential role of biosensors in the food and drink industries. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 6, p. 547-554, 1991.

MA, G., CHENG, Q. Manipulating FRET with polymeric vesicles: development of a "mix-and-detect" type fluorescence sensor for bacterial toxin. **Langmuir**, v. 22, p. 6743-6745, 2006.

MA, G., CHENG, Q. Vesicular Polydiacetylene Sensor for Colorimetric Signaling of Bacterial Pore-Forming Toxin. **Langmuir**, v. 21, p. 6123-6126, 2005.

MA, Z., LI, J., LIU, M., CAO, J., ZOU, Z., TU, J., JIANG, L. Colorimetric detection of Escherichia coli by polydiacetylene vesicles functionalized with glycolipid. **Journal of American Chemical Society**, v. 120, p. 12678-12679, 1998.

MANGANARIS, G.A., VASILAKAKIS, M., DIAMANTIDIS, G., MIGNANI, I. The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes, incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruits. **Food Chemistry**, v. 4, p. 1385–1392, 2007.

MARTÍN-DIANA, A.B., RICO, D., FRÍAS, J.M., BARAT, J.M., HENEH, G.T.M., BARRY-RYAN, C. Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 210-218, 2007.

MASSEY, J.B. Interaction of ceramides with phosphatidylcholine, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1510, p. 167-184, 2001.

MIKKELSEN, S.R., RECHNITZ, G.A. Conductometric Transducers for Enzyme-Based Biosensors. **Analytical Chemistry**, v.61, p. 1737–1742, 1989.

MORRISON, R.T., BOYD, R.N. Química Orgânica. Lisboa, Fund. Calouste Gulbenkian, 152-200, 1990.

NAGY, J.O., ZHANG, Y., LIU, E.Y.X., MOTARI, E., SONG, J.C., LEJEUNE, J.T., WANG, P.G. Glycopolymers as a chromatic biosensor to detect Shiga-like toxin producing Escherichia coli O157:H7. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 700–703, 2008.

NEWNHAM, R.E., AMIN, A. Smart Systems: Microphones, Fish Farming, and Beyond. **Chemtech**, v. 29, p. 38-47, 1999.

NORDE, W. **Colloids and interfaces in life sciences**. New York, USA: Marcel Dekker, 2003.

O'BRIEN, D.F., WHITESIDES, T.H., KLINGBIEL, R.T. The photopolymerization of lipid-diacetylenes in bimolecular-layer membranes. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**, v. 19, p. 95-101, 1981.

OKADA, S., PENG, S., SPEVAK, W., CHARYCH, D. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. **Acc. Chemistry Research**, v. 31, p. 229-239, 1998.

PAN, J., CHARYCH, D. Molecular Recognition and Colorimetric Detection of Cholera Toxin by Poly(diacetylene) Liposomes Incorporating GM1 Ganglioside. **Langmuir**, v. 13, p. 1365-1367, 1997.

PEVZNER, A., KOLUSHEVA, S., ORYNBAYEVA, Z., JELINEK, R. Giant Chromatic Lipid/Polydiacetylene Vesicles for Detection and Visualization of Membrane Interactions. **Advanced Functional Materials**, v. 18, p. 242-247, 2008.

PIRES, A.C.S. **Avaliação da transição colorimétrica de nanoestruturas de polidiacetileno provocada por diferentes moléculas**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2009. 134p.

PIRES, A.C.S., SOARES, N.F.F., da SILVA, L.H.M., da SILVA, ALMEIDA, M.V., LE HYARIC, M., SOARES, R.F., MAGESTE, A.B., REIS, S.G. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. **Sensors and Actuators B**, v. 153, p. 17–23, 2011.

PIRES, A.C.S., SOARES, N.F.F., da SILVA, L.H.M., da SILVA, M.C.H., MAGESTE, A.B., SOARES, R.F., TEIXIERA, A.V.N.C., ANDRADE, N.J. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 13365–13371, 2010a.

PIRES, A.C.S., SOARES, N.F.F., SILVA, L.H.M., ANDRADE, N.J., SILVEIRA, M.F.A., CARVALHO, A.F. Polydiacetylene as a biosensor: Fundamentals and applications in the food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 172-181, 2010b.

POTISATITYUENYONG, A., ROJANATHANES, R., TUMCHARERN, G., SUKWATTANASINITT, M. Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions of polydiacetylene vesicles. **Langmuir**, v. 24, p. 4461-4463, 2008.

RABAEY, K., VERSTRAETE, W. Microbial fuel cells: novel **biotechnology** for energy generation. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 291–298, 2005.

REGEN, S.L., CZECH, B., SING, A. Polymerized vesicles. **Journal of American Chemical Society**, v. 102, p. 6638-6640, 1980.

REICHERT, A., NAGY, J.O., SPEVAK, W., CHARYCH, D. Polydiacetylene liposomes functionalized with sialic acid bind and colorimetrically detect influenza virus. **Journal of American Chemistry Society**, v. 117, p. 7301–7306, 1995.

REIS, K.C., PEREIRA, J., LIMA, L.C.O., VON PINHO, R.G., MORAIS, A.R. Aplicação de lactato de cálcio e ácido ascórbico na conservação de minimilho minimamente processado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 338-345, 2005.

RIBEIRO, A.C.F, BARROS, M.C.F., TELES, A.S.N., VALENTE, A.J.M., LOBO, V.M.M., SOBRAL, A.J.F.N., ESTESO, M.A. Diffusion coefficients and electrical conductivities for calcium chloride aqueous solutions at 298.15 K and 310.15 K. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 192–196, 2008.

RIBEIRO, A.C.F., BARROS, M.C.F. LOBO, V.M.M., QUINTENILLA, G., ESTESO, M.A. Diffusion Coefficients of the Ternary System Calcium Chloride–Caffeine–Water at (25 and 37) °C. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 897–900, 2010.

RINGSDORF, H., SCHLARB, B., VENZMER, J. Molecular architecture and function of polymeric oriented systems: models for the study of organization, surface recognition, and dynamics of biomembranes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 27, p. 113-158, 1988.

RITA, M.B.B.J. **Propriedades de transporte de lactato de cálcio em solução aquosa: efeito da temperatura e da presença de  $\beta$ -ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010. 54p.

RODRIGUES, E.T., HAN, J.H. Intelligent packaging. In: HELDMAN, D.R. **Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering**. New York, USA: Marcel Dekker, pp. 528–535, 2003.

RODRIGUES, R.A., TERRA, N.N., FRIES, L.M. Lactato de sódio: um conservante natural no processamento de lingüiça frescal. **Higiene alimentar**, v. 14, p. 56-61, 2000.

ROQUE-SPECHT, V.F., DELAI VANIN, B. Avaliação do comportamento antioxidante de sais orgânicos (acetato, citrato e lactato), em produtos cárneos frescos. **Higiene alimentar**, v. 22, p. 66-70, 2008.

ROZNER, S., KOLUSHEVA, S., COHEN, Z., DOWHAN, W., EICHLER, J., JELINEK, R. Detection and analysis of membrane interactions by a biomimetic colorimetric lipid/polydiacetylene assay. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 96–104, 2003.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. 418p.

SCINDIA, Y., SILBERT, L., VOLINSKY, R., KOLUSHEVA, S., JELINEK, R. Colorimetric detection and fingerprinting of bacteria by glass-supported lipid/polydiacetylene films. **Langmuir**, v. 23, p. 4682-4687, 2007.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 445-450, 1994.

SHULGA, A.A., SOLDATKIN, A.P., ELSKAYA, A.V., DZYADEVICH, S.V., PATSKOVSKY, S.V., STRIKHA, V.I. Thin-film conductometric **biosensors** for glucose and urea determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, p. 217–223, 1994.

SMOLANDER, M., HURME, E., AHVENAINEN, R. Leak indicators for modified-atmosphere packages. **Trends in Food Science and Technology**, v. 4, p.101-106, 1997.

SONG, J., CHENG, Q., ZHU, S., STEVES, R.C. "Smart" materials for biosensing devices: cell-mimicking supramolecular assemblies and colorimetric detection of pathogen agents. **Biomedical Microdevices**, v. 3, n. 4, p. 213-221, 2002.

SPEVAK, W., NAGY, J.O., CHARYCH, D.H. Molecular assemblies of functionalized polydiacetylenes. **Advanced Materials**, v. 7, p. 85-89, 1995.

STOFFEL, W., SALM, K-P., M. MULLER. Syntheses of phosphatidylcholines, sphingomyelins and cholesterol substituted with azido fatty acids. Photocrosslinking with nearest neighbouring lipids in liposomes. **Hoppe-Seyler's 2. Physiological Chemistry**, v. 363, p. 1 – 18, 1982.

SU, L., WENZHAO, J. HOUB, C., LEIA, Y. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 1788–1799, 2011.

SU, Y.L. Assembly of polydiacetylene vesicles on solid substrates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, p. 271-276, 2003.

SU, Y.L., LI, J.R., JIANG, L. Biosensor signal amplification of vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of Escherichia coli. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 114–119, 2005.

SU, Y.L., LI, J.R., JIANG, L. Effect of amphiphilic molecules upon chromatic transitions of polydiacetylene vesicles in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, p. 113-118, 2004.

SUN, C., ZHANG, Y., FAN, Y., LI, J. Mannose–Escherichia coli interaction in the presence of metal cations studied in vitro by colorimetric polydiacetylene/glycolipid liposomes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 925–930, 2004.

TAN, M., SHALEF, S. Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. **Meat Science**, v. 74, p. 319-328, 2006.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect**. NewYork, USA: Wiley-Interscience, 1973.

TASI, L. M., LIU, D. Z., CHEN, W. Y. Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, p. 7–14, 2003

TRESTER-ZEDLITZ, M., KAMADA, K., BURLEY, S.K., FENYO, D., CHAIT, B.T., MUIR, T.W. A modular cross-linking approach for exploring protein

interactions. **Journal of American Chemistry Society**, v. 125, p. 2416–2425, 2003.

VOLPE, P.L.O., SILVA FILHO, E.A. Estudo da interação proteína surfactante pelo método do equilíbrio de diálise. **Química nova**, v. 17, p. 199-203, 1994.

WACKLIN, H.P., THOMAS, R.K. Spontaneous Formation of Asymmetric Lipid Bilayers by Adsorption of Vesicles. **Langmuir**, v. 23, p. 7644-7651, 2007.

WANG, C., MA, Z., SU, Z. Facile method to detect oligonucleotides with functionalized polydiacetylene vesicles. **Sensors and Actuators B**, v. 113, p. 510-514, 2006.

WANG, J. **Stripping Analysis: Principles, Instrumentation, and Applications**. VCH Publishers: Deerfield Beach, FL, 1985.

WILSCHUT, J., NIR, S., SCHOLMA, J., HOEKSTRA, D. Kinetics of Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles: Correlation between vesicle aggregation, bilayer destabilization, and fusion. **Biochemistry**, v. 24, p. 4630-4636, 1985.

WOLFBEIS, O. S., LIST, H. **Method for quality control of packaged organic substances and packaging material for use with this method**. US Patent 5407829, 1995.

YAM, K. L., TAKHISTOV, P. T., MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 1–10, 2005.

YANG, H.H., LAWSLESS, H.T. Descriptive analysis of divalent salts. **Journal of Sensory Studies**, v. 20, p. 97–113, 2003.

YOU, X., CHEN, X., ZOU, G., SU, W., ZHANG, Q., HE, P. Colorimetric response of azobenzene-terminated polydiacetylene vesicles under thermal and photic stimuli. **Chemical Physics Letters**, v. 482, p. 129–133, 2009.