UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física

UNIVERSITÉ BORDEAUX 1
École Doctorale des Sciences Physiques et de l'Ingénieur

Estrutura e dinâmica de DNA confinado entre membranas lipídicas não-catiônicas

Emerson Rodrigo Teixeira da Silva

Orientadores: Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira e Prof. Dr. Frédéric Nallet

Tese em cotutela apresentada ao Instituto de Física da USP e à École Doctorale des Sciences Physiques et de l'Ingénieur da Universidade Bordeaux 1 para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira (Orientadora, IFUSP)

Prof. Dr. Frédéric Nallet (Orientador, Université Bordeaux 1)

Dra. Laurence Navailles (Centre de Recherche Paul Pascal - CNRS)

Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini (IFUSP)

Prof. Dr. Yan Levin (Instituto de Física da UFRGS)

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira (Instituto de Química da UFRGS).

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Silva, Emerson Rodrigo Teixeira da

Estrutura e dinâmica de DNA confinado entre membranas
lipídicas não-catiônicas. – São Paulo - 2011.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.
Instituto de Física – Depto. de Física Experimental

Orientadores: Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira
e Frédéric Nallet

Área de Concentração: Física da Matéria Condensada

Unitermos: 1. Biomoléculas; 2. Nanoestruturas;
3. Física da Matéria Condensada; 4. Difusão.

USP/IF/SBI-096/2011

RESUMO

Um estudo experimental sobre os aspectos estruturais e dinâmicos de um complexo hidratado de fragmentos de DNA (150 pb) e fases lamelares de lipídios zwitteriônicos é apresentado. Variando-se a hidratação, é possível controlar o *confinamento* imposto por essa matriz hospedeira sobre os nucleotídeos inseridos na camada aquosa. O arranjo supramolecular do complexo é investigado por difração de raios X e técnicas de microscopia óptica e eletrônica. Um rico polimorfismo de mesofases é observado em função do confinamento. No regime mais hidratado, os fragmentos se distribuem segundo uma orientação nemática entre as membranas. À medida que a quantidade de água diminui, o confinamento das bicamadas sobre os nucleotídeos aumenta e correlações transmembranares aparecem, dando origem a fases altamente organizadas, com simetrias hexagonais 2D de DNA entre as lamelas. A incorporação completa de nucleotídeos é observada apenas quando grandes quantidades de DNA estão presentes. Esse fato aponta para importância maior de interações de volume excluído. Uma análise do parâmetro de Caillé mostra que as flutuações das membranas diminuem com a inserção de DNA. A partir dessas observações, é sugerido que a alteração das interações entre membranas, aliada à aparição de efeitos interfaciais entre DNA e membranas, é um mecanismo relevante no comportamento de fase. As propriedades dinâmicas dos nucleotídeos são investigadas através da técnica de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Um modelo recentemente desenvolvido para análise de difusão anisotrópica é testado com sucesso, demonstrando estreita correlação entre estrutura e dinâmica.

ABSTRACT

An experimental study on the structural and dynamical properties of a hydrated DNA-zwitterionic lipids complex is presented. By varying the water amount, it is possible to control the *confinement* imposed by this host matrix over the organization of the nucleotides inserted within the water layers. The supramolecular assembly is investigated by X-rays diffraction and techniques involving both optical and electron microscopy. A rich polymorphism of mesophases is observed as a function of confinement. In the more hydrated regime, the fragments are distributed according to nematic orientation in-between lamellae. As the water amount decreases, the confinement of bilayers over the particles increases and transmembrane correlations appear, giving raise to highly-ordered phases, with 2D-hexagonal symmetries of DNA embodied in the lamellar phase. The full incorporation of nucleotides by the lamellar phase is observed only in the presence of large amounts of DNA. This finding points to the major importance of excluded volume interactions. An analysis of the Caillé parameter shows that the insertion of DNA reduces the fluctuations of membranes. From these observations, it is suggested that changes in the interactions between bilayers, together with the appearance of interfacial effects between DNA and membranes, are a relevant mechanism for the phase behavior of these systems. The dynamical properties of nucleotides are investigated through the fluorescence recovery after photobleach (FRAP). A model recently developed for analyses of anisotropic diffusion is successfully tested, demonstrating a close relationship between structure and dynamics.

RÉSUMÉ

Une étude expérimentale sur la structure et la dynamique d'un complexe hydraté de fragments d'ADN (150 pb) et des phases lamellaires de lipides zwitterioniques est présentée. Par la variation de l'hydratation, il est possible de contrôler le *confinement* imposé par cette matrice hôte sur les nucléotides insérés dans les couches aqueuses. L'organisation supramoléculaire du complexe est suivie par diffraction des rayons-X et des techniques de microscopie optique et électronique. Un riche polymorphisme de mesophases est observé en fonction du confinement. Dans le régime plus hydraté, les fragments se distribuent selon une orientation nématique. Dans la mesure où la quantité de l'eau diminue, le confinement des bicouches sur les nucléotides monte et des corrélations transmembranaires donnent origine à des phases hautement organisées, avec des symétries hexagonales (2D) d'ADN dans la phase lipidique. L'incorporation totale des nucléotides par la phase lamellaire est observée uniquement lorsque des grandes quantités d'ADN y sont présentes. Ce fait souligne une importance majeure des interactions de volume exclu. Une analyse du paramètre de Caillé montre que l'insertion des fragments diminue les fluctuations des membranes. À partir de ces observations, il est suggéré que la modification des interactions stériques entre des lamelles, associée à des effets interfaciaux ADN-membranes, est un mécanisme important dans le comportement de phases. Les propriétés dynamiques sont étudiées avec la technique de *retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)*. Un modèle développé récemment pour l'analyse de diffusion anisotrope est testé avec succès, démontrant une corrélation proche entre structure et dynamique.

A Elieste da Silva, meu pai, *in memoriam*.

“Hoje entendo bem o meu pai. Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é, que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”.

Amyr Klink, navegador

SUMÁRIO

Resumo	iii
Abstract	v
Résumé	vii
Sumário	xiii
Agradecimentos	xvii
Introdução geral	21
1 Fundamentos	25
1.1 Fosfolipídios	25
1.2 Fenômenos de auto-organização	26
1.3 Fases lamelares liotrópicas	29
1.3.1 Elasticidade e interações em fases lamelares	31
1.4 Algumas propriedades físicas do DNA	33
1.4.1 Interações entre moléculas de DNA	36
1.5 Complexos DNA-lipídios: estado da Arte	37
1.5.1 Liberação de contra-íons	42
1.5.2 Complexos DNA-lipídios neutros	43
1.6 Espalhamento de raios X por fases lamelares	44
1.6.1 O modelo de <i>Nallet et al.</i>	45
1.6.2 Efeitos de desordem em $\tilde{S}(q)$	48
1.7 Dinâmica de DNA em fases lamelares	51

1.7.1	Difusão Browniana anisotrópica	52
1.7.2	FRAP espacialmente resolvido	53
1.8	O modelo de Dobrindt	55
1.8.1	Problemas em análises de difusão dentro de fases lamelares	55
1.8.2	Forma modificada do perfil espacial de fluorescência	56
2	Materiais e métodos	61
2.1	Constituintes do sistema	61
2.1.1	Fragmentos de DNA	61
2.1.2	Parte lipídica	62
2.1.3	Solvente	64
2.2	Preparação de amostras	64
2.2.1	Procedimento para equilíbrio das formulações	65
2.3	Experimentos de raios X	66
2.3.1	A linha SWING no síncrotron SOLEIL	67
2.3.2	Fontes convencionais	70
2.3.3	Tratamento dos dados	72
2.4	Microscopias de fluorescência e luz polarizada	80
2.5	Criofratura e microscopia eletrônica	81
2.6	Experimentos de recuperação de fluorescência	82
2.6.1	Programa de análise	83
3	Resultados estruturais	87
3.1	Sistema lipídios-água: a fase hospedeira	88
3.1.1	Membranas com proporção PC-Simulsol 70:30	88
3.1.2	Membranas com proporção PC-Simulsol 50:50	111
3.1.3	Discussões	118
3.2	Sistemas DNA-lipídios: polimorfismo estrutural	121
3.2.1	Membranas com proporção PC-Simulsol 70:30	121
3.2.2	Membranas com proporção PC-Simulsol 50:50	157
3.3	Discussões	161
3.3.1	Variando a quantidade de DNA	161
3.3.2	Efeitos do DNA no ordenamento esmétrico de fases L_α	163
4	Resultados dinâmicos	167
4.1	Simulações	167
4.1.1	Caso isotrópico	167
4.1.2	Caso anisotrópico	168

4.2	Experimentos	171
4.2.1	Sistema DNA-água: difusão isotrópica	171
4.2.2	Complexos DNA-lipídio-água: difusão anisotrópica	172
Conclusões		183
A Protocolos		189
A.1	Dessalagem de DNA e sonicação	189
A.2	Marcação do DNA	190
A.3	Preparação de lipídios	190
B Comprimento de correlação		191
C Résumé en français		195
C.1	Motivations et objectives	195
C.2	Bases	196
C.2.1	Complexes d'ADN et lipides: état de l'Art	196
C.2.2	Diffusion des rayons X par des phases lamellaires	198
C.2.3	Diffusion de l'ADN dans des phases lamellaires	200
C.3	Matériaux et méthodes	201
C.3.1	Constituants du système	201
C.3.2	Expériences de rayons X	202
C.3.3	Microscopie d'épifluorescence et à lumière polarisée	202
C.3.4	Microscopie électronique et cryo-fracture	202
C.3.5	La technique de FRAP	203
C.4	Résultats structuraux	203
C.4.1	Système lipides-eau : la phase hôte	203
C.4.2	Complexes lipides-ADN : polymorphisme structural	208
C.5	Résultats dynamiques	217
C.5.1	Expériences de FRAP	217
C.6	Conclusions et perspectives	218
Referências		233

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta tese foi partilhado entre o Instituto de Física da USP e o Centre de Recherche Paul Pascal, unidade do CNRS ligada à Universidade Bordeaux 1. Assim sendo, o número daqueles que colaboraram para sua realização, direta ou indiretamente, é extenso e encontra-se dividido entre dois continentes. Qualquer tentativa de citá-los na íntegra será, portanto, reducionista e incompleta. Porém, mesmo correndo o risco esquecer personagens relevantes desta aventura, não posso deixar de me dirigir nominalmente a certas pessoas importantes para que eu vencesse mais esta etapa. Nesse sentido, quero agradecer de forma muito especial:

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À minha família. Particularmente, à minha querida esposa, Karina Alves. Além de mim mesmo, foi ela quem mais sacrifícios pessoais fez em nome deste trabalho. Por isso, ela terá sempre minha gratidão. Minha mãe, “Dona” Odete, e meu irmão, Elieste, também fazem parte desta “linha de frente” da minha vida. Não tenho palavras para me dirigir adequadamente a essas pessoas. Posso apenas dizer que os amo e que, independente de títulos, posições e circunstâncias, elas são um esteio com que sempre pude contar.

Aos meus orientadores. À Beth, por ter me apresentado esse fantástico campo de sistemas auto-organizados. Admiro profundamente sua tenacidade em um ambiente acadêmico que, por razões várias, frequentemente é desfavorável. Por toda minha carreira, ser-lhe-ei grato pela confiança em mim depositada para consolidar o fluxo de estudantes entre o Grupo de Flúidos Complexos e o CRPP. Ao Frédéric, pelo seu gigantismo intelectual e por sua humildade como pessoa. Estas qualidades fazem dele o Físico que um dia

almejo ser. À Laurence, por ter sido o grande motor na condução deste trabalho. Posso dizer com convicção que, de todos os mentores que tive a felicidade de encontrar ao longo da vida acadêmica, ela foi quem mais investiu de si em minha formação. Seguramente, os exemplos destes três me seguirão por toda minha caminhada, ainda que, por muitas vezes, eu tenha que lutar contra “moinhos de vento”.

Aos colegas da equipe *A²B (Auto-Assemblage et Biomolécules)*, sou grato pelo ambiente científico maravilhoso. À Annie Février, por toda a ajuda com os protocolos e preparação dos componentes usados na formulação das amostras. Ao Eric Grelet, pelas discussões enriquecedoras. Ao Gilles Sigaud, pela ajuda nas interpretações de imagens de microscopia eletrônica. Ao François Dole, pelas discussões durante os seminários. À Emile Pouget, pela ajuda nas observações com o microscópio eletrônico. Agradeço de forma muito especial à Isabelle Ly, pelo preparo das réplicas de criofratura. Menciono ainda o Jens Dobrindt que, embora não o tendo conhecido pessoalmente, esteve presente nos estudos relacionados à dinâmica, seja propondo o modelo teórico empregado na análise, seja elaborando o programa para o tratamento dos dados.

Aos colegas que fiz no CRPP, pelo ambiente de grande convivialidade. A seus membros permanentes: Alain Pénicaud, Harald Bock, Carlos Drummont, Marie-France Achard, Corinne Amengual, Maryse Joli, Maryse Maugey, Jean-Yves Juanico, Jean-Luc Laborde, Jean-Cristophe Loudet, Philippe Barboteau, Ahmed Bentaleb, Brigitte Delord, Anne Facq, Sandrine Maillet, Joanna Giermanska... e tantos outros. A seus membros não-permanentes: Antonin Prévot, Nessim Arazam, Sylvain (Dauphin) Lannebère, Victoria Flexer, Miriam Materna, Andreas Schoepach, Nadja Mebner, Sonia Souakri, Frédéric Mondiot, Pratap Chandran, Giovanni Tonelli... e tantos outros. A seu diretor, Philippe Richetti, agradeço especialmente pela acolhida e por dar as condições para a realização do trabalho, além de ceder o studio do laboratório para que minha esposa e eu morássemos durante grande parte de nossa estadia em Bordeaux.

Aos meus colegas no Grupo de Fluídos Complexos do IFUSP. À Renata Bicev, Vivian Vieira, Carlos Bayer, Cássio Alves e Bruno Honda, que dividiram sala comigo ao longo desses quatro anos. As duas primeiras tornaram meu dia-a-dia no IFUSP “dez vezes mais feliz” enquanto, dos três últimos, levarei algumas das lembranças mais engraçadas dessa minha época de doutorando. O Cássio, além de ter se tornado um grande amigo, compartilhou comigo várias horas de microscópio confocal e momentos agradabilíssimos em Bordeaux, de modo que posso dizer que o sudoeste da França nunca mais foi o mesmo

após a passagem dele por lá! À Bárbara Gerbelli, agradeço pelas discussões e ajudas com os ajustes das curvas de espalhamento de raios X do sistema binário. À Sandra Nakamatsu, por ter me ensinado a preparar amostras logo no início do meu doutorado. O Rafael Rubim, o Pedro Osiero e o Eraldo Sales também proporcionaram uma motivação extra e um ambiente magnífico no meu retorno ao Brasil. Ao professor Cristiano L. P. de Oliveira, sou grato pelas discussões enriquecedoras e pelos vários esclarecimentos. Não deixo de mencionar ainda Fernando Batalioto, Alexander Duarte, Odair Gimenes, Igino Martins, Edneuma Oliveira, Ellen Binotto, Diogo Soga, Sara Alves, Amarildes Dantas, Cleidilane Sena, Messias de Souza, Thiago Gualberto, Celso Risi, Luiz Henrique da Silva, a Professora Suhaila Shibili e o Professor Antônio Figueiredo. Todos eles, cada um a seu modo, contribuíram para que o meu tempo no GFCx fosse um período de crescimento.

Ao pessoal administrativo nas duas Universidades. Na França, menciono Mmle. Brigitte Bordes que permitiu que, mesmo com o Atlântico nos separando, toda a documentação seguisse seu curso normalmente em Bordeaux. No Brasil, agradeço aos funcionários da comissão de pós-graduação do IFUSP, especialmente ao Cristiano Chaves e à Maria Izabel Cavalcante. Tenho plena consciência que, sem eles, o meu degaste com o arcaísmo burocrático da USP teria sido ainda maior.

Dirijo-me de forma especial àqueles que se dispuseram a ler este manuscrito, contribuindo com sugestões e correções. Agradeço à Professora Brigitte Pansu, da Université Paris-Sud XI, e ao Professor Cyrus R. Safinya, da Universidade da Califórnia, Santa Barbara, por serem os pareceristas da tese. À Professora Márcia Fantini, do IFUSP, ao Professor Yan Levin e à Professora Nadya Pesce da Siveira, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, agradeço gentilmente a participação na banca examinadora e as preciosas contribuições para a versão final do texto.

Por fim, agradeço àqueles que garantiam o meu pão de cada dia: à CAPES, ao programa CAPES-COFECUB (projeto 558/07) e ao programa de Bourses d'Excellence Eiffel-EGIDE, do ministério das relações exteriores da França.

A todos vocês, e àqueles que eventualmente esqueci, o meu muitíssimo obrigado.

São Paulo, 17 de novembro de 2011.

INTRODUÇÃO GERAL

Contexto científico

Sob condições adequadas, moléculas de tensoativos podem ser usadas para a preparação de materiais nanoestruturados graças a suas propriedades de auto-organização em arranjos líquido-cristalinos. Fases lamelares são particularmente atraentes para o preparo de estruturas compósitas em camadas uma vez que partículas coloidais podem ser intercaladas no interior das membranas ou entre as bicamadas de surfactantes. As propriedades finais do compósito podem ser controladas através da variação da constante de rigidez das membranas ou ainda pela distância de separação entre elas. O desenho e preparação de novos materiais compósitos abre um amplo horizonte para várias aplicações tecnológicas, cobrindo campos que vão da ciência dos materiais à biomedicina [1]. Por outro lado, do ponto de vista da pesquisa básica, estes sistemas oferecem inúmeros desafios para a compreensão de fenômenos de auto-organização em geometrias confinadas [2, 3].

O DNA é uma biopolímero semi-flexível que pode ser complexado com mesofases lipídicas. No caso particular em que ácidos nucleicos e tensoativos são misturados para formar complexos, tais sistemas surgem como uma alternativa sintética para vetorização em terapia gênica. Essencialmente, a idéia consiste na encapsulação de nucleotídeos pelas fases lipídicas com o objetivo de proteger a carga genética das intempéries do meio extracelular [4–6]. Evidentemente, a estrutura desses vetores também desempenha papel fundamental na liberação do DNA no interior das células, a qual deve ocorrer de forma progressiva e controlada. Portanto, sua eficiência depende do conhecimento preciso dos mecanismos envolvidos na formação dos complexos e de suas propriedades dinâmicas, seja para otimizar a quantidade de material a ser encapsulado, seja para proporcionar a liberação adequada dessa carga [7].

Ao longo das últimas duas décadas, as atividades de pesquisa em torno desses sistemas experimentaram um crescimento vigoroso. Experimentalmente, a estrutura de compostos DNA-lipídios tem sido exitosamente determinada através de difração de raios X e microscopia eletrônica [8–13]. Estes estudos têm apresentado uma grande diversidade de arranjos supramoleculares com um balanço intrincado entre estrutura e vários parâmetros envolvidos nos protocolos de preparação tais como quantidade de material, tempo de incubação e condições de mistura [14]. Graças ao papel desempenhado por interações eletrostáticas diretas entre cargas, lipídios catiônicos têm sido a escolha mais popular para a criação desses vetores [15]. No entanto, apesar dos bons resultados obtidos *in vitro*, estes complexos têm mostrado certo grau de toxicidade, limitando sua aplicação *in vivo*. Portanto, a busca por sistemas baseados em lipídios neutros, nos quais interações eletrostáticas diretas não são um candidato óbvio como ente ativo na complexação, aparece como uma temática atraente tanto para pesquisa fundamental quanto para aplicações.

Motivações e objetivos

A partir do cenário descrito acima, as razões do interesse em torno de complexos DNA-lipídios ficam evidentes. Nesse sentido, a presente tese busca contribuir para o estado da Arte ao apresentar um estudo experimental acerca de um complexo hidratado obtido a partir da mistura entre fragmentos de DNA e membranas lipídicas zwitteriônicas. Trata-se de um trabalho de pesquisa básica, focado nas propriedades fundamentais do complexo, estudando seu diagrama de fases.

A presumida ausência de atração eletrostática intensa entre cargas opostas de DNA e membranas abre uma janela experimental promissora para se avaliar o papel de outras interações, especialmente aquelas de origem termodinâmica (forças de hidratação e de flutuação, por exemplo), na formação e no comportamento de fase de complexos baseados em DNA e lipídios neutros [16]. Uma vez que o sistema lida com confinamentos em escala nanométrica, isto também oferece uma grande oportunidade para a exploração de interações de curto-alcance, tais como as forças de hidratação, as quais ainda não foram completamente elucidadas e são objeto de debate corrente na literatura [17,18]. Os maiores objetivos foram investigar os aspectos estruturais e identificar as mesofases presentes no complexo em função de sua composição e hidratação. A originalidade da abordagem aqui empregada consiste no uso das propriedades de diluição de uma fase lamelar liotrópica para controlar a largura dos canais aquosos entre as membranas. Em outras palavras, através do controle da hidratação do sistema, o *confinamento* exercido pela fase hospedeira sobre os nucleotídeos foi variado de forma controlada [19,20]. Com o objetivo de se obter

algumas informações acerca dos mecanismos envolvidos na estabilização do complexo, as condições iônicas do solvente e as propriedades elásticas das membranas foram moduladas, respectivamente, através da adição de sal monovalente e de co-surfactantes ao sistema.

Um conjunto de técnicas foi usado para atingir estes objetivos. A principal ferramenta experimental empregada ao longo da tese foi o espalhamento de raios X, desenvolvida tanto com uso de fontes convencionais quanto de instalações de luz síncrotron. Com a finalidade de se complementar esses dados de raios X, usou-se tanto microscopia óptica quanto eletrônica para a obtenção de visualização no espaço direto. Um pouco de modelagem, descrevendo os fatores de forma e de estrutura da fase hospedeira (sistema lipídio/água), foi realizado para fornecer subsídios para uma discussão acerca das forças intermembranares implicadas na complexação e no comportamento de fase.

Outra contribuição trazida pelo presente estudo concerne às propriedades dinâmicas. Estudos acerca da dinâmica de complexos DNA-anfifílicos são bastante raros na literatura [21, 22] e, até onde temos conhecimento, trabalhos apresentando medidas da difusão de nucleotídeos entre as membranas de fases lipídicas multilamelares jamais foram levados a termo fora dos grupos de pesquisa onde esta tese foi desenvolvida [23, 24]. Uma possível explicação para esta ausência pode estar relacionada a dificuldades para a análise de difusão anisotrópica em escala molecular. Aqui, a *recuperação de fluorescência após fotobranqueamento* (FRAP) é usada para testar um modelo recentemente proposto no CRPP para descrever o movimento Browniano de cilindros nas condições de contorno bastante particulares impostas por fases liotrópicas lamelares.

O manuscrito está estruturado da seguinte maneira: o próximo capítulo é dedicado à apresentação dos fundamentos teóricos. Informações disponíveis na literatura são apresentadas com o objetivo de fornecer uma breve revisão do estado da Arte. Atenção especial é dedicada aos modelos usados na descrição do espalhamento de raios X por fases lamelares e ao método utilizado na modelagem de difusão anisotrópica entre lamelas. No capítulo 3, os resultados estruturais são apresentados. Essa parte é iniciada com a caracterização da fase hospedeira, ou seja, do sistema binário lipídios/água. Duas taxas distintas entre lecitina e co-surfactantes são avaliadas, assim como o comportamento da periodicidade lamelar sob duas condições diferentes de força iônica. É observado que a fase hospedeira é estabilizada por um balanço híbrido entre forças de van der Waals, de hidratação e de flutuação, conforme atestado por uma análise cuidadosa do parâmetro de Caillé. Em seguida, o comportamento de fase do complexo ternário DNA-lipídios-água é apresentado. Um rico polimorfismo de mesofases é encontrado e a completa incorporação de nucleotídeos é observada apenas para grandes quantidades de DNA no sistema. Além disso, a inserção de bastões entre as membranas aumenta significativamente o grau de ordena-

mento esmético, sugerindo um papel preponderante de forças estéricas na complexação e comportamento de fase. Em todas as análises descritas acima, raios X, microscopia eletrônica e microscopia óptica são usadas de forma complementar. O capítulo 4 traz os resultados relacionados às propriedades dinâmicas do complexo. Aqui, o termo “propriedades dinâmicas” diz respeito à difusão de fragmentos de DNA no interior dos canais aquosos da fase hospedeira. Coeficientes de difusão anisotrópicos, paralelo e perpendicular à orientação do diretor da fase nemática local, são obtidos com sucesso mostrando uma íntima relação entre estrutura e dinâmica. Na última parte, os principais resultados são sumarizados e apresentados juntamente com as conclusões gerais do trabalho.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS

1.1 Fosfolipídios

Os lipídios formam uma ampla classe de materiais orgânicos, geralmente obtidos a partir de óleos e gorduras, que não encontram uma definição precisa ou consensual. Uma tentativa de classificar essas substâncias é descrevê-las em termos de suas propriedades de solubilidade. Por exemplo, pode-se denotar como lipídios aquelas substâncias que são altamente solúveis em líquidos apolares e pouco solúveis em água [25]. A maioria desses compostos são dotados de propriedades anfifílicas, apesar de alguns tipos importantes, como os colesterolis, não terem esta característica. Lipídios de interesse biológico, incluindo aqueles usados neste trabalho, pertencem majoritariamente ao grupo dos **fosfolipídios**, sendo formados em torno de uma estrutura comum composta por um grupo fosfato e um glicerol.

Ácidos graxos se unem a ambos os terminais do grupo glicerol através de ligações tipo éster. Estes ácidos possuem uma cadeia hidrocarbônica longa, tipicamente composta de 14 a 24 átomos, que podem ter uma ou mais insaturações [26]. No outro extremo da molécula, o grupo fosfato se une a outros grupos polares, usualmente nitrogenados, constituindo a parte hidrofílica do lipídio. Essencialmente, é essa cabeça polar que determina as propriedades da molécula e, portanto, diferencia as várias classes desses compostos.

Entre os ácidos graxos comumente envolvidos na formação de fosfolipídios, encontram-se os ácidos oleico e palmítico, bem como seus derivados. Um dos grupos polares mais comuns é o grupo **colina**. Fosfolipídios formulados a partir de colinas são também chamados **fosfatidilcolinas** (PCs) ou **lecitinas**. Estas moléculas têm um fator de empacotamento $p \approx 1$ - mais detalhes a seguir, na Seção 1.2 -, e aparecem frequentemente auto-estruturados

em bicamadas. Lecitinas compartilham o mesmo grupo polar e diferem entre si de acordo com os ácidos graxos de suas caudas hidrocarbônicas [25].

Dependendo das propriedades elétricas de seu grupo hidrofílico, os fosfolipídios podem ser classificados em catiônicos, aniônicos ou **zwitteriônicos**. Nos dois primeiros tipos, a carga elétrica líquida é diferente de zero. Os zwitteriônicos são globalmente neutros. Entretanto, o arranjo espacial das diferentes funções ionizadas no interior da cabeça polar dá origem a um momento dipolar fraco. Alguns dos lipídios mais abundantes são PCs zwitteriônicas, onde o dipolo $P^- - N^+$ aparece orientado de forma quase paralela ao plano das membranas [27]. A estrutura geral das fosfatidilcolinas, o principal grupo lipídico usado neste trabalho, é exibida na Fig. 1.1.

Figura 1.1: Fórmula estrutural geral de fosfatidilcolinas (esquerda) e um correspondente modelo de espaço preenchido. Os átomos de carbono e hidrogênio, representados por esferas verdes e brancas no modelo tridimensional, foram omitidos na representação 2D.

1.2 Fenômenos de auto-organização

Fenômenos de auto-organização têm importância crucial em uma variedade de processos biológicos, incluindo a formação de membranas. Na base destes fenômenos, encontram-se os *anfifílicos*. O termo “anfifílico” encontra suas raízes no grego *amphi*, que significa *ambos*, e *philos*, que significa *amizade*. Esta nomenclatura explicita a natureza ambígua destas moléculas, que possuem simultaneamente propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (ou lipofílicas) [28]. Este comportamento dúbio em relação à água desempenha um papel

chave nas propriedades de auto-organização dessas substâncias em solução. Na Fig. 1.2, o esquema de uma molécula anfifílica é exibido.

Figura 1.2: Desenho esquemático de uma molécula anfifílica.

A molécula pode ser dividida em duas partes distintas: uma cabeça polar e uma cauda carbônica. Na presença de água (ou de outro solvente polar), o contato entre o grupo polar hidrofílico e o solvente é favorecido termodinamicamente, enquanto a cauda alifática sofre intenso efeito **hidrofóbico**, minimizando a superfície de contato com o entorno. Esta propriedade faz com que moléculas anfifílicas sejam capazes de formar interfaces separando meios polares e apolares. Por esta razão, esta classe de materiais é também conhecida como *surfactantes* (do inglês, *surface active agents*) [3].

Em concentrações bastante baixas, estas moléculas podem se encontrar dispersas no solvente. Entretanto, acima de uma determinada concentração, a concentração micelar crítica (CMC), a formação de agregados moleculares dá origem a uma variedade de estruturas estáveis. A forma desses agregados depende de uma série de variáveis termodinâmicas, tais como temperatura e concentração. O mecanismo termodinâmico envolvido na formação de estruturas auto-organizadas em soluções aquosas é justamente o efeito hidrofóbico. A presença de hidrocarbonetos induz a formação de cavidades nas vizinhanças das caudas apolares, dando origem a um fenômeno de estruturação da água nessas regiões. Este incremento de ordem nas proximidades das cadeias implica na diminuição da entropia local. Quando as moléculas se arranjam lado a lado, ocorre fusão das cavidades e expulsão da água localizada na interface, levando então ao aumento da entropia e ao surgimento de estruturas altamente estáveis [29].

Na Fig. 1.3, as estruturas mais comumente encontradas em misturas água/surfactantes são apresentadas. Com o objetivo de se avançar na discussão, é útil definir o parâmetro de empacotamento $p = \nu/a_0 l_c$, onde ν é o volume da parte hidrofóbica, a_0 é a área da cabeça polar e l_c , o comprimento da cauda. Considerações geométricas simples sobre o empacotamento das moléculas permite prever a conformação final dos agregados formados [26]. O parâmetro de empacotamento determina se os anfifílicos vão se arranjar em micelas esféricas ($p < 1/3$), micelas não-esféricas ($1/3 < p < 1/2$), vesículas ou bicamadas ($1/2 < p < 1$) ou estruturas inversas ($p > 1$) [26]. Evidentemente, as fronteiras destes domínios não são precisamente definidas e os valores acima apresentados têm caráter meramente indicativo.

$p < \frac{1}{3}$			Spherical micelles
$\frac{1}{3} < p < \frac{1}{2}$			Non-spherical micelles
$\frac{1}{2} < p < 1$			Vesicles
$p \sim 1$			Bilayers
$p > 1$			Inverted micelles

Figura 1.3: Estruturas formadas a partir da auto-organização de anfifílicos. Na primeira coluna, os valores do parâmetro de empacotamento são apresentados. Na segunda coluna, as formas geométricas das moléculas são mostradas. Na última coluna, os arranjos supramoleculares dos agregados são exibidos.

Micelas e bicamadas são tipos fundamentais de agregados de anfifílicos. Em função da concentração (ou da temperatura), essas entidades podem se rearranjar e formar superestruturas em escalas maiores. Entre os muitos arranjos possíveis, encontram-se **fases lamelares** e **fases hexagonais**. Fases lamelares liotrópicas (L_α , $L_{\beta'}$ e $P_{\beta'}$) são constituídas pelo empilhamento uni-dimensional de bicamadas, onde as caudas carbônicas permanecem voltadas para a parte interna das membranas e as cabeças polares restam em contato com o solvente intercalado (Fig. 1.4(a)). Essa configuração tem importância maior neste trabalho, pois a parte lipídica do complexo aqui investigado consistiu em uma fase lamelar liotrópica em cujas camadas aquosas foram inseridos fragmentos de DNA.

Arranjos hexagonais, por sua vez, são compostos por micelas cilíndricas. A fase H_I é formada por micelas diretas organizadas numa fase colunar ao longo da direção -z que formam uma estrutura triangular bidimensional no plano -xy. A fase H_{II} é formada por micelas reversas tubulares, com o solvente aquoso localizado no interior de cilindros formados pelos grupos hidrofílicos (Fig. 1.4(b)).

Figura 1.4: Arranjos supramoleculares de tensoativos. (a) fase multilamelar formada a partir do empilhamento de bicamadas e (b) fase H_{II} formada por arranjos hexagonais-colunares de micelas cilíndricas inversas (adaptado de [30]).

Outras moléculas anisotrópicas também se auto-organizam numa variedade de fases líquido-cristalinas. Soluções contendo essas moléculas usualmente apresentam comportamento liotrópico, com mesofases dependendo da concentração. Um exemplo típico concerne a moléculas de forma cilíndrica, como os fragmentos de DNA usados neste trabalho. Em soluções aquosas diluídas, essas partículas encontram-se distribuídas isotropicamente. No entanto, acima de uma dada concentração, $C_{DNA} > 160\text{mg/ml}$ para os fragmentos estudados nesta tese, os cilindros adquirem ordem orientacional. Os eixos das cadeias, então, se alinham ao longo de uma direção preferencial e, numa estreita faixa de concentrações, podem formar uma fase nemática caracterizada por um vetor diretor $\hat{n}$ [31, 32].

Devido à quiralidade, soluções contendo grandes quantidades de DNA, se auto-organizam com um polimorfismo bastante rico que inclui fases altamente ordenadas, onde, além de ordem orientacional, as partículas apresentam correlação de posição. Entre as mesofases encontradas em soluções concentradas, destacam-se as fases colestéricas, onde os bastões formam um arranjo supramolecular com estrutura helicoidal. Fases hexagonais colunares e simetrias ortorrômbicas também são observadas em soluções extremamente concentradas [31, 33].

1.3 Fases lamelares liotrópicas

Fases lamelares liotrópicas são sistemas líquido-cristalinos dotados de propriedades físicas singulares. Ao longo da direção perpendicular ao plano das membranas (denotado

como **eixo z** ao longo deste manuscrito), existe ordem posicional de longo alcance dentro de uma estrutura periódica alternando bicamadas lipídicas e camadas de solvente. Ao longo das outras duas direções (**plano xy**), o grau de ordem depende de variáveis termodinâmicas, especialmente da temperatura. De acordo com o ordenamento dos monômeros no interior das membranas, essas fases podem ser classificadas em L_α , $L_{\beta'}$ e $P_{\beta'}$ [34].

Em membranas no estado L_α , as cabeças polares distribuídas no plano da camada se comportam de modo similar a um líquido bidimensional. As bicamadas são planas em média e flutuam em torno de uma posição de equilíbrio bem definida. Isto significa que, nas direções **xy**, as moléculas possuem grau de liberdade elevado, sem ordem posicional. Embora as moléculas possam transitar de uma camada a outra no interior das bicamadas (um fenômeno conhecido como *flip-flop*), a transferência de monômeros entre bicamadas, passando através do meio aquoso, é pequena. Além disso, as caudas alifáticas são altamente desordenadas e a distância entre as moléculas de surfactantes não é bem definida. Na escala macroscópica, o sistema apresenta grande fluidez à temperatura ambiente. Por esta razão, esta fase é frequentemente (embora erroneamente) referida como *fase fluida* ou *fase líquida*.

No estado $L_{\beta'}$, as moléculas guardam ordem posicional no interior das bicamadas. As membranas também são planas em média, apresentando flutuações menores ao longo das posições de equilíbrio. Os grupos polares formam uma rede triangular no plano **xy**, formando fases hexáticas 2D. De acordo com a inclinação das caudas no interior da bicamada, esse domínio pode ainda ser subdividido em três sub-tipos: $L_{\beta F}$, $L_{\beta L}$ e $L_{\beta I}$ [35]. Comparada à fase L_α , fases $L_{\beta'}$ são mais viscosas à temperatura ambiente, sendo por isso frequentemente chamadas de *fases gel*.

Finalmente, a fase $P_{\beta'}$ é a que apresenta o mais alto grau de ordenamento entre os três tipos de arranjos lamelares descritos aqui. As moléculas têm correlação de posição dentro das membranas, onde suas caudas se mantêm separadas por distâncias bem definidas. Diferentemente às duas fases descritas acima, na $P_{\beta'}$ as membranas não são mais planas e possuem enrugações periódicas (veja Fig. 1.5).

Do ponto de vista deste manuscrito, a mais relevante destas fases é a L_α . Isso porque a fase lipídica empregada aqui é auto-organizada segundo essa estrutura. Uma propriedade fundamental das fases L_α é sua capacidade de incorporar solvente. À medida que o sistema é hidratado, a largura dos canais aquosos (d_w na Fig. 1.5-a) aumenta, levando ao inchaço de toda a estrutura. A partir de considerações geométricas simples, a **periodicidade lamelar** $d = \delta_m + d_w$ é obtida usando a relação:

$$d = \frac{\delta_m}{1 - \phi_{wt}} \quad (1.1)$$

Figura 1.5: Fases lamelares liotrópicas. (a) L_α , (b) $L_{\beta'}$ e (c) $P_{\beta'}$. As convenções indicadas para a periodicidade lamelar d e para a espessura das membranas e de camada aquosa, δ_m e d_w , serão usadas através de todo o manuscrito.

onde ϕ_{wt} corresponde à fração volumétrica de água e δ_m , à espessura das membranas. De 1.1, é possível verificar que a periodicidade lamelar aumenta com a hidratação. Este processo ocorre até um limite de hidratação máxima, acima do qual ocorre separação de fase com excesso de água.

Visto que fases lamelares liotrópicas são sistemas ordenados unidimensionais, obtidos a partir do empilhamento de camadas, sua descrição física é análoga à dos cristais líquidos esméticos-A. Considerações mais detalhadas acerca dessa descrição, bem como das forças intermoleculares envolvidas na estabilização do sistema, são feitas a seguir.

1.3.1 Elasticidade e interações em fases lamelares

Propriedades elásticas desempenham papel maior na formação e estabilização de sistemas auto-organizados. A forma adquirida pelos agregados anfífilicos é o resultado de uma relação estreita entre elasticidade e termodinâmica [3]. Na seção anterior, fases lamelares liotrópicas foram tratadas como pilhas de bicamadas planas e rígidas. Entretanto, em sistemas reais, efeitos térmicos levam ao surgimento de *flutuações* nas membranas com consequências drásticas sobre a estrutura [36–38].

Neste trabalho, assumem-se lamelas sujeitas a dois tipos de deformações: curvatura das membranas e compressão do empilhamento. A representação esquemática destas deformações é exibida na Fig. 1.6.

Na aproximação harmônica, a energia de deformação por unidade de volume em cristais líquidos esméticos-A é dada por [40, 41]:

$$f_{def} = \frac{1}{2}K \left(\nabla_{\perp}^2 u \right)^2 + \frac{1}{2}B \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 \quad (1.2)$$

Figura 1.6: Desenho esquemático de bicamadas lipídicas confinadas em uma fase multilamelar. As posições de equilíbrio são indicadas por linhas pontilhadas. Efeitos térmicos induzem tanto flutuações em torno das posições de equilíbrio (compressão) ou curvaturas nas membranas. (Adaptado de [39]).

onde u são os deslocamentos em torno das posições de equilíbrio (definida na Fig. 1.6) e K é constante de *splay*, a qual é relacionada à constante de rigidez de uma membrana isolada através da relação:

$$K = \frac{\kappa}{d} \quad (1.3)$$

Tendo em vista que as bicamadas são tratadas como placas em oscilação, a periodicidade d em 1.3 é o passo esmétrico médio.

A constante B é o módulo de compressibilidade da pilhas de lamelas. Deve-se ressaltar que este coeficiente é relacionado às interações entre membranas, sem significado físico para membranas isoladas.

A **energia de interação** total por unidade de área de arranjos multilamelares de bicamadas **não-carregadas e flexíveis** é dada por [3]:

$$f_{int} = f_{vdW} + f_{hyd} + f_{und} \quad (1.4)$$

O primeiro termo no lado direito de 1.4 está relacionado a forças de van der Waals (*atrativas*). As outras duas energias, f_{hyd} e f_{und} , são associadas às forças *repulsivas* de hidratação (solvatação) e ondulação, respectivamente.

A interação de van der Waals é dada por [42]:

$$f_{vdW} = -\frac{H}{12\pi} \left[\frac{1}{d^2} + \frac{1}{(d + 2\delta_m)^2} - \frac{2}{(d + \delta_m)^2} \right] \quad (1.5)$$

onde H é a constante de Hamaker.

A energia de hidratação por unidade de área corresponde à interação de curto-alcance que atua em pequenas separações entre membranas, $d_w \lesssim 10 \text{ \AA}$. A origem física desta força ainda é obscura e permanece como objeto de debate na literatura [43, 44]. Uma primeira

tentativa de elucidá-las foi associá-las à estruturação da água na interface solvente-cabeças polares [45,46]. Mais recentemente, um novo mecanismo baseado em efeitos de polarização na vizinhança das membranas tem sido proposto [18]. Apesar da controvérsia, um ponto consensual é que a energia de hidratação por unidade de área é empiricamente descrita por um decaimento exponencial do tipo:

$$f_{hyd} = P_h e^{-\frac{d'_w}{\lambda_h}} \quad (1.6)$$

onde P_h é uma constante de escala e λ_h é o comprimento de decaimento da interação. Os valores típicos destas constantes estão em torno de $4k_B T/\text{\AA}^2$ e $2 \text{\AA}$, respectivamente, à temperatura ambiente [47].

O último termo em 1.4 corresponde a flutuações termicamente induzidas ao longo do eixo -z. Trata-se de forças repulsivas de longo alcance, originárias da diferença de entropia entre uma membrana “livre” flutuando e uma membrana inserida na estrutura [42]. Visto que estas interações estéricas são termicamente induzidas, a constante de rigidez, κ , deve ser da ordem de $k_B T$ para que elas sejam efetivas no sistema. Uma forma analítica para esta energia foi derivada originalmente por Helfrich nos anos 1970 [41, 48, 49]:

$$f_{und} = \frac{3\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{\kappa} \frac{1}{d_w'^2} \quad (1.7)$$

1.4 Algumas propriedades físicas do DNA

O DNA, ou **ácido desoxirribonucleico**, é um biopolímero semi-flexível cujos monômeros, os nucleotídeos, são formados a partir de um **grupo fosfato**, um açúcar pentose (a **desoxirribose**) e uma base nitrogenada [25]. As bases envolvidas na formação dos nucleotídeos são as purinas **adenina** (A) e **guanina** (G), e suas complementares pirimidinas **timina** (T) e **citossina** (C). Na Fig. 1.7, as fórmulas estruturais destes constituintes são exibidas. Através da combinação destes quatro tipos de base heterocíclicas, o DNA codifica, juntamente com o RNA, toda informação contida no genoma. Além de ser o reservatório da informação genética, essa molécula também é um sistema fascinante que coloca desafios de grande complexidade para sua descrição em bases físicas [50].

A estrutura tridimensional do DNA foi elucidada em 1953, em um dos episódios mais controversos da História da Ciência. Baseados em dados de raios X obtidos por Maurice Wilkins e Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick determinaram, sem o conhecimento de Franklin, que a cadeia de DNA é organizada segundo uma dupla-hélice anti-paralela [51]. A descoberta rendeu ao trio Watson, Crick e Wilkins o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1962. De acordo com este modelo, os grupos fosfato e a pentose

Figura 1.7: Fórmulas estruturais dos constituintes do DNA. O grupo fosfato e o açúcar pentose formam a espinha dorsal da molécula. A permutação das quatro bases heterocíclicas permite a codificação da informação genética.

formam a espinha dorsal da cadeia, com as bases nitrogenadas unidas ao centro, através de pontes de hidrogênio, formando os “degraus” de uma escada em espiral.

Segundo as condições do meio (pH, hidratação ou força iônica, por exemplo), a hélice dupla pode assumir diferentes conformações. Em solução, a forma mais comum de DNA é a forma B. Nesta configuração, as bases estão alinhadas quase perpendicularmente ao eixo da hélice, com dez pares de base (pb) por passo de hélice. A distância entre os pares de bases é $\approx 3.4 \text{ \AA}$ e cada passo tem comprimento de $\approx 34 \text{ \AA}$. O diâmetro da cadeia é $\approx 20 \text{ \AA}$ [52].

Na Fig. 1.8, a estrutura da dupla hélice do DNA é esboçada com suas dimensões mais relevantes. O comprimento de persistência da cadeia, isto é, o comprimento dentro do qual a molécula é rígida, tem $\approx 500 \text{ \AA}$ ou 150 pb. A cadeia polimérica pode atingir comprimentos bastante longos, mais de 2 metros, resultando em estruturas com alto grau de empacotamento quando polinucleotídios são confinados no interior da membrana nuclear de células eucariotas. Além disso, outro aspecto marcante da dupla hélice é a quiralidade. Isto leva a propriedades líquido-cristalinas bastante peculiares, com um conjunto bastante complexo de mesofases em geometrias confinadas [31].

Do ponto de vista eletrostático, o DNA pode ser tratado como um polieletrólito [50,53]. Quando colocado em água, os grupos fosfatos liberam um próton independentemente das condições de pH do meio. Portanto, em cada nucleotídeo resta uma carga negativa em excesso. Assumindo que estes ânions estão uniformemente distribuídos ao longo da cadeia, a separação entre cargas é $l_D \approx 1.7 \text{ \AA}$. Este valor leva a uma densidade superficial de carga de $\sigma_D \approx -e/110 \text{ \AA}^2$ [54], fazendo do DNA o sistema mais carregado da natureza [25].

Figura 1.8: Modelos tridimensionais mostrando um passo de hélice das formas A e B do DNA. Mudanças no diâmetro e no comprimento entre as duas conformações são evidenciadas.

Propriedades de solubilidade também desempenham papel preponderante na estrutura do DNA. Os grupos pentose e fosfato são altamente solúveis em água, enquanto as bases nitrogenadas não o são. Isto implica na presença de forte efeito hidrofóbico no núcleo da cadeia, levando as bases a se voltarem umas para as outras, em um fenômeno de auto-organização semelhante àquele observado em surfactantes. Ainda nesta direção, a insolubilidade das bases tem consequências diretas nas propriedades de hidratação da molécula, impedindo a água de penetrar o interior da cadeia [52]. Esta característica, combinada com a rigidez da cadeia dentro do seu comprimento de persistência, permite a descrição de fragmentos de ≈ 150 pb como cilindros rígidos maciços. No processo de hidratação, moléculas de água solvatam os grupos fosfatos, cobrindo apenas o lado exterior da dupla hélice. Uma monocamada de hidratação é formada quando a quantidade de água atinge o valor de ≈ 30 moléculas de H_2O por par de base [55].

Dependendo das condições do meio, da presença (ou não) de íons e, especialmente, da hidratação, a molécula de DNA pode assumir conformações distintas. Além da forma B, outras configurações menos comuns são a forma A e, ainda em menor grau, a forma Z. A forma Z, tem eixo de rotação no sentido horário (hélice de “mão esquerda”), e não será tratada aqui. A forma A, por sua vez, aparece em situações de baixa hidratação e é, na verdade, uma variação da forma B. Trata-se de uma estrutura mais compacta na direção

longitudinal, onde a distância entre nucleotídeos diminui para $\approx 2.5 \text{ \AA}$ e cada passo de hélice tem $\approx 28 \text{ \AA}$, ou 11 pb. A transição da forma B para a forma A ocorre quando a hidratação diminui para menos de 20 moléculas de água por par de base [56]. Na Tab. 1.1, as principais propriedades da molécula de DNA relevantes para este trabalho são sumarizadas.

Tabela 1.1: Características da molécula de DNA relevantes para este trabalho.

Comprimento de persistência	150 pb ou $\approx 500 \text{ \AA}$
Diâmetro	$\approx 20 \text{ \AA}$ (forma B)
	$\approx 23 \text{ \AA}$ (forma A)
Distância entre pares de base	$\approx 3.4 \text{ \AA}$ (forma B)
	$\approx 2.5 \text{ \AA}$ (forma A)
Passo da hélice	10 pb ou $\approx 34 \text{ \AA}$ (forma B)
	11 pb ou $\approx 28 \text{ \AA}$ (forma A)
Carga elétrica	$1e^-/\text{nucleotídeo}$
Densidade	1.7 g/cm^3
Massa molar	330 g/mol
	(de nucleotídeos)

1.4.1 Interações entre moléculas de DNA

Conforme mencionado acima, o DNA é um polieletrólito muito forte. Para os propósitos deste trabalho, pode-se considerar os fragmentos como cilindros negativamente carregados. Moléculas de DNA isoladas sempre aparecem associadas a contra-íons que neutralizam a carga global. Quando os nucleotídeos são colocados em água, uma fração de seus contra-íons se dissocia e é liberada na solução. No contexto da teoria de Manning [57], quando a separação das cargas ao longo da cadeia é menor que o comprimento de Bjerrum do meio, parte dos contra-íons permanece condensada na superfície da cadeia, renormalizando o parâmetro de densidade de carga à unidade:

$$\zeta = \frac{\lambda_B}{l_D} \quad (1.8)$$

A fração de contra-íons condensados (CC) é então dada por:

$$\phi_{CC} = 1 - \frac{1}{\zeta} \quad (1.9)$$

Para soluções aquosas de DNA B, à temperatura ambiente, o comprimento de Bjerrum é $\lambda_B = 7,1 \text{ \AA}$ e a densidade linear de carga é $l_D = 1,7 \text{ \AA}$, o que leva a $\zeta = 4.2$ e $\phi_{CC} = 0,76$ [58]. Isto significa que apenas $\approx 24\%$ dos contra-íons são liberados para a solução.

Medidas diretas da força entre cadeias de DNA têm sido realizadas através de métodos de pressão osmótica [59–61]. Esses experimentos têm mostrado a existência de dois tipos de interações repulsivas: para distâncias de separação interaxial inferiores a $30 \text{ \AA}$ (separação entre superfícies inferiores a $10 \text{ \AA}$), uma força obedecendo a uma lei exponencial decrescente é encontrada. Essa força se comporta do mesmo modo que as forças de hidratação observadas em estruturas lamelares para pequenas distâncias de separação entre membranas [46]. A repulsão tem sido atribuída ao ordenamento parcial das moléculas de água na vizinhança dos nucleotídeos. Entretanto, o mecanismo exato que dirige essas forças também permanece em aberto. O segundo regime de interações ocorre para espaçamentos interaxiais superiores a $30 \text{ \AA}$. Neste caso, o balanço de forças é governado por repulsões eletrostáticas, provavelmente oriundas das cargas nos grupos fosfatos ao longo da estrutura da cadeia [47]. Interações atrativas também têm sido previstas em trabalhos teóricos, onde sua origem estaria associada a eventuais correlações de curto alcance entre as cargas dos grupos fosfatos [62]. Contudo, forças atrativas têm sido observadas apenas em soluções contendo íons multivalentes [47, 50, 53, 63].

Esses estudos têm sido conduzidos sob diferentes condições de força iônica. Uma conclusão importante derivada desses trabalhos é que **as interações intermoleculares de curto alcance entre moléculas de DNA parecem ser insensíveis à quantidade de sal adicionada à solução**, o que tem sido considerado uma evidência de que estas interações não possuem origem eletrostática [60]. Conforme será discutido no capítulo 3, este resultado tem consequências diretas no sistema investigado neste trabalho porque, visto que os fragmentos de DNA são constritos pela matriz lamelar, estas forças (de curto alcance) aparecem como ator importante na auto-organização de sistemas DNA-lipídios zwitteriônicos.

1.5 Complexos DNA-lipídios: estado da Arte

O interesse em torno de complexos DNA-lipídios remonta ao fim dos anos 1980 [4–6]. Apesar desses primeiros estudos terem enfatizado as aplicações terapêuticas desses sistemas, sem uma preocupação imediata com seus aspectos estruturais, ficou demonstrado bastante cedo que a compreensão dos mecanismos de transfecção (ou seja, a transferência de DNA seguida pela expressão no genoma) seria impossível sem o pleno conhecimento

do arranjo molecular no interior do vetor. Além disso, o potencial desses sistemas para o estudo de fenômenos de auto-organização foi logo percebido, de tal modo que o tema passou a atrair a atenção tanto de teóricos quanto de experimentalistas. Devido ao papel primordial desempenhado pela interação eletrostática entre cargas opostas, lipídios catiônicos (LCs) foram a primeira escolha para a complexação com polinucleotídeos altamente aniônicos. A partir de então, esses complexos têm sido extensamente referidos na literatura como *lipoplexos* [7]. Apenas mais recentemente, estudos acerca de complexos baseados em lipídios aniônicos e zwitteriônicos apareceram na literatura [64, 65].

As primeiras tentativas para abordar a organização de lipoplexos em escala nanoscópica foram realizadas com uso de técnicas de microscopia eletrônica. Inspirados na aparência visual dos agregados observados, as estruturas foram batizadas com nomenclaturas um tanto quanto “exóticas”, com designações como “contas em um cordão” [5], “espaguetes” ou ainda “bolinhos de carne” [11, 12].

A primeira descrição acurada da estrutura de lipoplexos foi levada a termo por *Radler et al.* em 1997. Usando radiação síncrotron e microscopia de luz polarizada, eles demonstraram que um sistema DNA/DOTAP-DOPC é auto organizado numa fase L_{α}^c onde os nucleotídeos são inseridos nos canais aquosos entre membranas¹, Fig. 1.9. No plano das membranas (xy), o DNA encontra-se condensado em uma rede esmética bidimensional onde o espaçamento interaxial, d_{DNA} , depende de um balanço delicado entre as cargas positivas dos lipídios e as cargas negativas das macromoléculas hospedadas. Quando o número de cargas introduzidas pelos nucleotídeos excede o número de cargas catiônicas, uma fase aquosa contendo DNA isolado aparece. Por outro lado, quando as cargas positivas excedem o número de ânions, uma fase lipídica não complexada emerge no sistema. Pouco tempo depois destes primeiros estudos, foi também demonstrado que a força iônica do solvente, modulada pela introdução de sais divalentes, desempenha um papel relevante na compactação e adesão de biomoléculas às membranas [63]. Tipicamente, a distância entre bastões de DNA varia no intervalo $25 \text{ \AA} < d_{DNA} < 70 \text{ \AA}$, com comprimentos de correlação que compreendem ≈ 10 moléculas.

Desde esses trabalhos pioneiros, o espalhamento de raios X tem sido usado como técnica-padrão em investigações estruturais de inúmeros outros lipoplexos. Para alguns sistemas, foi observado que a aparição de correlações intermembranares leva à formação de estruturas com altos níveis de organização [13]. Explorando as propriedades termotrópicas de misturas DMPC/DMTAP, os autores da Ref. [66] revelaram a formação de estruturas retangulares centradas colunares de bastões de DNA em uma fase $L_{\beta'}^c$ de lipídios. Mais

¹O índice “c”, no símbolo L_{α}^c , significa que a fase lamelar fluida “contém” DNA. Por inspiração dos estudos pioneiros de microscopia eletrônica, este tipo de arranjo recebeu o nome de “estrutura sanduíche”.

Figura 1.9: Desenho esquemático de uma estrutura tipo “sanduíche”, L_{α}^c , encontrada por Rädler et al. [8]. Os lipídios formam um arranjo multilamelar com as moléculas de DNA inseridas nos canais aquosos entre as lamelas. (Figura adaptada a partir de original de G. Tresset).

recentemente, uma estrutura bidimensional de simetria retangular simples também foi reportada em um sistema DNA-LC termotrópico [67].

Embora fases lamelares liotrópicas sejam as estruturas mais frequentes em lipoplexos, elas não são o único tipo de agregados encontrados nesses sistemas. Arranjos hexagonais de lipídios, do tipo “ninho de abelhas”, também têm sido bastante observadas. No estudo reportado na Ref. [9], misturas DOPE/DOTAP formam uma fase hexagonal colunar inversa, H_{II}^c , onde fragmentos lineares de DNA ficam alojados dentro de cilindros de água (Fig. 1.10(a)). Transições $L_{\alpha}^c \rightarrow H_{II}^c$ podem ser obtidas tanto pela redução da constante de rigidez κ quanto pela indução de curvatura espontânea nas membranas, com a introdução de co-surfactantes. Em outro trabalho recente [10], os lipídios formam uma fase hexagonal micelar, com os nucleotídeos acomodados no interstício da fase (H_I^c , veja Fig. 1.10(b)). De modo geral, lipídios que esponta

Estudos teóricos também têm sido implementados com objetivo de lançar luz sobre os mecanismos envolvidos na formação de lipoplexos. Vários modelos têm sido propostos para abordar essa questão e explicar o polimorfismo descrito acima [30]. Estes trabalhos têm sido conduzidos em diferentes escalas, tanto nanoscópica quanto mesoscópica, usando métodos que cobrem de simulações computacionais à teoria elástica de cristais líquidos [68, 69].

A grande maioria desses modelos lida com complexos baseados em LCs. Apesar dos lipídios empregados nesta tese serem zwitteriônicos, é instrutivo traçar um panorama dos

Figura 1.10: Desenho esquemático de fases hexagonais de lipídios, tipo “ninho de abelhas”, contendo bastões de DNA dentro de tubos de água (a) e no interstício da fase (b). (Figuras adaptadas a partir de original fornecido por G. Tresset).

principais resultados derivados dessas abordagens. Elas empregam, majoritariamente, teorias de campo médio destacando as interações eletrostáticas entre nucleotídeos e membranas, bem como as variáveis termodinâmicas implicadas na estabilização das estruturas. Uma variedade de mesofases em equilíbrio têm sido previstas, algumas das quais ainda não foram encontradas experimentalmente [15, 70–73].

No presente trabalho, os esforços foram concentrados em torno de fases lamelares de lipídios contendo fragmentos de DNA, a estrutura tipo “sanduíche” exibida na Fig. 1.9. De acordo com a Ref. [69], assumindo que a fase lamelar não é interrompida por defeitos típicos de cristais líquidos esméticos, tais como deslocamentos ou rupturas, as seguintes fases em equilíbrio são previstas:

Fase colunar. Nesta configuração, os fragmentos de DNA estão alinhados ao longo da direção paralela ao eixo da hélice, formando fases colunares no plano plano das membranas (xy). No plano (yz), seus centros de massa formam redes cristalinas 2D. Devido à repulsão Coulombiana, redes retangulares centradas são os arranjos normalmente esperados [66]. Porém, se a interação efetiva entre nucleotídeos em diferentes camadas é atrativa, estruturas retangulares simples também são previstas.

Fase nemática de bastões de DNA inserida em uma fase lamelar de lipídios. Nesta fase, os fragmentos perdem ordem posicional e a fase colunar é destruída. A ordem orientacional, por sua vez, é mantida com os bastões se alinhando, em média, em torno de

um vetor diretor no plano das bicamadas, formando um arranjo nemático. **Não há correlações transmembranares**, de modo que os diretores nemáticos estão aleatoriamente distribuídos conforme a direção de empilhamento das camadas. Como será discutido mais adiante, esta característica tem fortes consequências no comportamento de manchas de FRAP nos experimentos de difusão anisotrópica conduzidos nesta tese.

Fase sliding columnar. Essa fase ainda não foi detectada experimentalmente. Ela tem propriedades intermediárias entre as fases nemáticas e colunares descritas acima. A maior característica deste arranjo é um fraco acoplamento de ordem de posição entre bastões em diferentes canais aquosos. Esta correlação decai exponencialmente segundo o número de camadas. No plano das membranas, a correlação entre galerias de DNA obedece a uma lei mais complexa, decaindo segundo uma expressão do tipo $\exp\{-const \times \ln^2(a)\}$, onde a é a distância interaxial entre cadeias de nucleotídeos.

Fase isotrópica de DNA dentro de uma fase lamelar de lipídios. Esta fase é prevista para concentrações muito baixas de nucleotídeos no sistema. As partículas não têm uma ordem preferencial no plano das membranas e se encontram aleatoriamente distribuídas entre membranas, formando um líquido bidimensional.

Apesar da diversidade de abordagens, um resultado comum desses esforços teóricos é a conclusão de que o comportamento de fase depende de um balanço intrincado entre forças elásticas, interações eletrostáticas e termodinâmica. Além disso, para sistemas DNA-LCs, tem sido previsto que a complexação é otimizada em formulações no ponto isoelétrico, em acordo com constatações experimentais.

Resultados de simulações de granulação grossa mostram o surgimento de redes colunares hexagonais inseridas entre as lamelas de fases esmécticas, conforme apresentado na Fig. 1.11 [74, 75]. Segundo essas previsões, a auto-organização está intimamente relacionada à rigidez das membranas lipídicas. Para membranas muito flexíveis, $\kappa \ll k_B T$, o sistema tende a formar a fase H_{II}^c exibida na Fig. 1.10(a). Para membranas rígidas, $\kappa \gg k_B T$, a fase L_α^c é privilegiada. Para valores intermediários de κ , e dependendo da composição da membrana, o complexo pode apresentar características de ambas as simetrias, com uma fase hexagonal de DNA inserida num arranjo multilamelar de lipídios. Esta última simetria foi recentemente encontrada em um trabalho experimental desenvolvido no contexto dos grupos onde esta tese foi realizada [20]. Deve ser observado que a predição da Ref. [74] é referente a lipídios catiônicos complexados com DNA em excesso de água. O caso abordado neste trabalho é bastante diferente, visto que foram usados lipídios neutros com nível de hidratação abaixo do limite de diluição. As membranas foram obtidas misturando-se lecitina de soja e ácidos graxos etoxilados. Lecitinas formam membranas bastante rígidas, no entanto, a adição de co-surfactantes monocatenários aumenta a fle-

xibilidade, com conseqüente diminuição dos valores de κ , satisfazendo as condições de elasticidade das simulações conduzidas em [74].

Figura 1.11: Previsões de simulações extraídas da figura 6 da Ref. [74]. O arranjo estrutural depende intimamente da rigidez das membranas. Em (a), quando a rigidez é intermediária (vide texto), a estrutura incorpora aspectos tanto de estruturais hexagonais inversas quanto de estruturas lamelares. À medida que a rigidez das membranas aumenta (b), os fragmentos formam uma rede retangular centrada numa simetria *quasi*-hexagonal.

1.5.1 Liberação de contra-íons

A complexação entre DNA e LCs envolve dois mecanismos, um de natureza eletrostática e outro de origem termodinâmica. O mecanismo eletrostático corresponde à atração entre as cargas opostas de nucleotídeos e LCs. Porém, atração de cargas opostas, por si só, não é suficiente para promover a condensação de DNA na superfície das membranas. Isso ocorre porque, quando o polinucleotídeos aderem às membranas, tanto os fragmentos quanto os surfactantes perdem entropia de translação.

Essa dificuldade é contornada pelos contra-íons. Quando colocados em solução, tanto DNA quanto LCs encontram-se juntamente com seus respectivos contra-íons que neutralizam a carga global das macromoléculas. Durante a adesão, estes contra-íons são liberados no solvente promovendo ganho de entropia desses íons [76]. O resultado é o aumento da entropia global do sistema, tornando-o termodinamicamente estável (Fig. 1.12). Este segundo mecanismo é muito mais importante para a formação de lipoplexos que a atração entre cargas opostas. Por esta razão, a complexação desse sistema é frequentemente dita ser “entropicamente dirigida” [15, 47, 71, 76].

A descrição em termos da energia livre representa um compromisso entre esses dois

Figura 1.12: Mecanismo de liberação de contra-íons. A adesão entre moléculas de cargas opostas promove a liberação dos respectivos contra-íons na solução, levando ao aumento da entropia global do sistema. (Extraído da Ref. [47]).

mecanismos e sua minimização leva à formação de complexos estáveis [50, 53]. Deve ser observado ainda que os contra-íons acima referidos não correspondem a sais adicionados ao sistema. A adição de sais modifica o comportamento termodinâmico da solução e a energia livre de adsorção principalmente porque ela diminui o ganho entrópico associado à liberação dos contra-íons inerentes às macromoléculas [63].

1.5.2 Complexos DNA-lipídios neutros

Complexos formados entre LCs e DNA têm encontrado grande aceitação na comunidade científica internacional devido à alta eficiência de transfecção dentro de um regime relativamente amplo de concentrações, garantindo o uso seguro [77–79]. Entretanto, como todo material exógeno a organismos vivos, esses compostos também apresentam citotoxicidade sob determinadas condições [80, 81]. Neste contexto, a busca por novos compostos baseados em lipídios neutros (LNs) surge como um passo natural na pesquisa em lipoplexos. Por um lado, determinados LNs possuem a vantagem de serem completamente biocompatíveis. Por outro lado, no entanto, eles não contam com as interações eletrostáticas para levar à complexação com moléculas aniônicas. De fato, durante um longo tempo, pensou-se que a formação de sistemas híbridos envolvendo nucleotídeos e LNs não seria possível precisamente por causa da ausência de atração eletrostática intensa entre partículas de carga oposta [82].

Na maioria dos estudos disponíveis sobre complexos DNA-LNs, sais divalentes são usados como mediadores de interação eletrostática entre polinucleotídeos e lipídios [82–

84]. Os primeiros trabalhos em complexos baseados em lipídios inteiramente neutros, sem nenhum tipo de mediadores, surgiu apenas recentemente [64, 85, 86]. Apesar da complexação não ocorrer de forma imediata, necessitando frequentemente de escalas de tempo bastante superiores às aquelas observadas em sistemas catiônicos, estes estudos têm demonstrado que é possível formular compostos usando lipídios não-catiônicos. Estas investigações também têm revelado que tais sistemas apresentam um polimorfismo de fases líquido-cristalinas tão rico quanto aquele observado em lipoplexos catiônicos.

Devido à ausência de fortes interações eletrostáticas entre nucleotídeos e membranas, os modelos teóricos que abordam complexos DNA-LNs necessariamente diferem dos métodos tradicionais.

Na presente tese, os dados experimentais de Roux et al. [16, 86] são parcialmente reproduzidos. Além disso, essas informações são expandidas através da exploração de domínios de baixa hidratação do diagrama de fase. É demonstrado também que a inserção de DNA entre membranas aumenta o ordenamento esmético da fase lamelar hospedeira. É avaliado ainda o comportamento de fase do sistema para duas diferentes composições de membrana e duas condições iônicas. Entre as conclusões, observa-se que flutuações e forças de hidratação desempenham um papel central na complexação e comportamento de fase.

1.6 Espalhamento de raios X por fases lamelares

Visto que raios X são de origem eletromagnética, sua interação com a matéria ocorre no nível das nuvens eletrônicas que rodeiam os núcleos atômicos. Portanto, perfis de espalhamento de raios X carregam informação acerca da densidade eletrônica da amostra. A imagem esquemática da difração por membranas igualmente espaçadas é exibida na Fig. 1.13. Dois casos distintos são representados nesta figura. Em 1.13(a), a situação corresponde a amostras orientadas onde as bicamadas estão alinhadas perpendicularmente ao feixe de raios X. Neste cenário, o padrão de difração no espaço recíproco é composto por um conjunto de pontos equidistantes ao longo do eixo z . As posições dos picos obedece à condição de Bragg: $|\vec{q}_z| = 2\pi n/d$, onde $\vec{q} = \vec{k}_r - \vec{k}_i$; $\vec{k}_r$ e $\vec{k}_i$, respectivamente, os vetores de onda refletido e incidente [87].

Em 1.13(b), a situação é bastante diferente. Nesse caso, tem-se uma amostra não orientada (ou em pó). No interior do volume irradiado, as membranas encontram-se distribuídas nas três direções espaciais e o padrão de difração resultante possui simetria circular, com anéis concêntricos. As posições dos círculos também seguem a condição de Bragg descrita acima, ou seja, eles aparecem igualmente espaçados. Ao longo deste

trabalho, as amostras foram irradiadas segundo esta última configuração. A redução do padrão 2D, que é obtida por meio da integração azimutal das intensidades difratadas, leva a curvas de espalhamento de $I(q)$ vs. q .

Figura 1.13: Desenhos esquemáticos de difração de raios X por pilhas regulares de bicamadas. Em (a), a situação corresponde a amostras orientadas onde as membranas estão orientadas perpendicularmente ao feixe. O padrão de difração é composto por um conjunto de pontos igualmente espaçados na direção q_z . Em (b), a situação corresponde a amostras em pó com orientações isotropicamente distribuídas no interior do volume irradiado. Neste caso, o padrão de difração tem simetria circular (adaptado de [88])

1.6.1 O modelo de *Nallet et al.*

A partir das posições dos picos de Bragg, é fácil determinar a periodicidade d , o principal parâmetro estrutural de fases lamelares liotrópicas. Porém, difratogramas de raios X contêm muito mais informação que simplesmente a distância de repetição da fase. A forma dos picos, assim como o espalhamento difuso, isto é, o espalhamento fora dos máximos de Bragg, permite estudar a estrutura espalhadora em maiores detalhes. Vários modelos têm sido propostos para descrever a difusão de radiação por fases lamelares liotrópicas [89–91]. O objetivo de tais modelos é obter informação tanto no nível supra-molecular, através da extração de parâmetros tais como o índice de Caillé e o número de camadas correlacionadas, quanto no nível da estrutura fina do sistema, determinando-se

o perfil de densidade eletrônica das bicamadas de surfactante. No entanto, um dos resultados mais importantes derivados desses modelos não está diretamente relacionado a determinações estruturais: visto que eles constituem ferramentas poderosas para a medida de flutuações térmicas, também são métodos apropriados para extrair informações acerca de propriedades termodinâmicas de fases esmélicas [42, 92].

Neste trabalho, foi utilizado o modelo desenvolvido por Nallet et al. Este modelo foi escolhido devido à sua relativa simplicidade e fácil implementação computacional [93]. Além disso, ele tem sido usado com sucesso em outros contextos similares ao estudo descrito aqui [94–97]. A seguir, as principais características da abordagem de Nallet et al. são reproduzidas. O tratamento detalhado pode ser encontrado na Ref. [93].

A intensidade espalhada por um volume irradiado, para um dado vetor de onda $\vec{q}$, é dada por:

$$I_{id}(\vec{q}) = \left\langle \left| \int_V \rho(\vec{x}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{x}} d^3\vec{x} \right|^2 \right\rangle \quad (1.10)$$

onde o símbolo $\langle \dots \rangle$ corresponde à média térmica e $\rho(\vec{x})$, à densidade eletrônica. A maneira mais intuitiva de descrever a função $\rho(\vec{x})$ é baseada em premissas puramente geométricas. Segundo essas premissas, um cristal de tamanho finito da estrutura esmélica é visto como uma pilha regular de N plaquetas idênticas com espessura δ_m e extensão lateral $L_\perp$, **todas orientadas perpendicularmente** à z [93]. Neste caso, $\rho(\vec{x})$ é definido como:

$$\rho(\vec{x}) = \sum_0^{N-1} \rho_0(z - n \cdot d), \quad |x_\perp| < L_\perp \quad (1.11a)$$

$$\rho(\vec{x}) = 0, \quad \text{de outro modo} \quad (1.11b)$$

onde $\rho_0(z)$ é o perfil da densidade de espalhamento de uma plaqueta com valores não-nulos apenas quando $0 \leq z \leq \delta_m$. Combinando 1.10 e 1.11, observa-se que as intensidades dos picos de Bragg são moduladas por um fator de bicamada:

$$P(q) = \left| \int_0^{\delta_m} \rho_0(z) \exp\{iqz\} dz \right|^2 \quad (1.12)$$

Deve ser observado que em 1.11 as pilhas foram assumidas como sendo compostas por membranas planas e rígidas, com posições bem definidas ao longo do eixo z . Esta situação é claramente uma imagem ideal posto que, em sistemas reais, desordem térmica e flutuações nas posições das membranas devem ser levadas em conta. Para contornar os problemas desse procedimento simplista, o modelo de Nallet aproveita algumas características da descrição de Caillé para fases esmélicas-A [87]. No contexto dessa abordagem modificada, a densidade de espalhamento representada em 1.11 é reescrita na forma:

$$\rho(\vec{x}) = \sum_0^{N-1} \rho_0(z - nd + u_n), \quad |\vec{x}_\perp| < L_\perp \quad (1.13a)$$

$$\rho(\vec{x}) = 0, \quad \text{de outro modo} \quad (1.13b)$$

onde a função u_n representa flutuações térmicas aleatórias da n^{th} camada em torno de uma posição de equilíbrio $n \cdot d$.

Os deslocamentos nas diferentes camadas estão relacionados através da função de correlação esmética [87]:

$$\langle (u_n - u_0)^2 \rangle = \frac{\eta n^2 d^2}{8}, \quad n \text{ pequeno} \quad (1.14a)$$

$$\langle (u_n - u_0)^2 \rangle = \frac{\eta}{2\pi^2} [\ln(\pi n) + \gamma] d^2, \quad n \gg 1 \quad (1.14b)$$

onde $\gamma = 0.5772$ é a constante de Euler e η é o parâmetro de Caillé, sendo definido em termos das constantes elásticas $\bar{B}$ e K por:

$$\eta = \frac{q_0^2 k_B T}{8\pi \sqrt{K \bar{B}}} \quad (1.15)$$

Na equação 1.15, o coeficiente $\bar{B}$ é o módulo de compressibilidade *a potencial químico constante* [34]. Combinando as equações 1.13 e 1.10, a intensidade espalhada assume a forma:

$$I_{id}(\vec{q}) = N \cdot P_\perp(q_\perp) \cdot P(q_z) \cdot S(q_z) \quad (1.16)$$

onde N é o número de camadas correlacionadas e $P_\perp$ é o fator de forma transverso (no plano xy), relacionado ao tamanho lateral finito das membranas. $P(q_z)$, o fator de forma das membranas ao longo do eixo z , é dado por 1.12 e $S(q_z)$ é o *fator de estrutura* da pilha, dado por:

$$S(q) = 1 + 2 \sum_{n=1}^{N-1} \left(1 - \frac{n}{N}\right) \cos(nqd) \exp \left\{ \frac{-q^2}{2} \langle (u - u_0)^2 \rangle \right\} \quad (1.17)$$

A expressão derivada acima em 1.17 não leva em conta a resolução finita do instrumento de medida. A intensidade *real* é dada por:

$$\tilde{I}(\vec{q}) = \int I_{id}(\vec{q}') R(q - q') d^3 q' \quad (1.18)$$

onde a função de resolução $R(\vec{q})$ é escolhida como um perfil Gaussiano de largura Δq :

$$R(\vec{q}) = (2\pi \Delta q^2)^{-3/2} \exp \left\{ \frac{-q^2}{2\Delta q^2} \right\} \quad (1.19)$$

Considerando um volume irradiado suficientemente grande, tal que a extensão lateral das bicamadas é muito maior que a resolução instrumental ($L_{\perp} \Delta q \gg 1$), o fator de forma transversal $P_{\perp}$ se torna:

$$\tilde{P}_{\perp} = 2\pi \frac{L_{\perp}^2}{\Delta q^2} \exp \left\{ \frac{-q_{\perp}^2}{2\Delta q^2} \right\} \quad (1.20)$$

Na direção perpendicular ao plano das bicamadas, a função $P(q_z)$ varia de modo suave, de modo que o fator de estrutura pode ser convoluído sozinho com a resolução. Este processo de convolução reescreve o fator de estrutura na sua forma limitada pela resolução:

$$\begin{aligned} \tilde{S}(q_z) = 1 + 2 \sum_1^{N-1} \left(1 - \frac{n}{N} \right) \cos \left(\frac{q_z dn}{1 + 2\Delta q^2 d^2} \alpha(n) \right) \times \\ \times \exp \left\{ \frac{-2q_z^2 d^2 \alpha(n) + \Delta q^2 d^2 n^2}{2(1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n))} \right\} \times \\ \times \frac{1}{\sqrt{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}} \end{aligned} \quad (1.21)$$

onde $\alpha(n)$ é a função de correlação $\langle (u_n - u_0)^2 \rangle / 2d^2$.

Os fatores de forma e de estrutura derivados acima são obtidos assumindo-se que as bicamadas são orientadas. Para contemplar a situação de domínios aleatoriamente orientados (amostras em pó), é preciso fazer a média isotrópica sobre 1.18. Para vetores de espalhamento grandes, $q \gg \Delta q$, a forma final da intensidade espalhada é:

$$I(q) = \frac{2V\pi P(q)\tilde{S}(q)}{dq^2} \quad (1.22)$$

A fim de comparar a previsão contemplada em 1.22 com dados reais de raios X, é preciso ainda definir o fator de forma das membranas, $P(q)$. O modelo de Nallet et al. propõem um perfil de duplo degrau para a densidade eletrônica, exibido na Fig. 1.14.

Segundo esta proposição, $\rho_0(z) = \Delta\rho_H$ para $0 \leq z \leq \delta_H$ ou $(\delta_H + 2\delta_T) \leq z \leq 2(\delta_H + \delta_T)$ e $\rho_0(z) = \Delta\rho_T$ para $\delta_H \leq z \leq (\delta_H + 2\delta_T)$. A espessura das bicamadas é $2(\delta_H + \delta_T)$. Esta forma leva à:

$$P(q) = \frac{4\Delta\rho_H^2}{q^2} \left\{ \sin(q(\delta_H + \delta_T)) - \sin(q\delta_T) + \frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H} \sin(q\delta_T) \right\}^2 \quad (1.23)$$

1.6.2 Efeitos de desordem em $\tilde{S}(q)$

Parte das análises que serão apresentadas no Cap. 3 são concernentes ao ordenamento esmétrico de fases lamelares liotrópicas. No modelo apresentado na seção anterior, a in-

Figura 1.14: Esquema do perfil de densidade eletrônica ρ_0 para bicamadas lipídicas segundo o modelo de Nallet et al.

formação acerca deste ordenamento está contida no fator de estrutura $\tilde{S}(q)$. Portanto, atenção agora será voltada de forma mais detalhada para a avaliação do comportamento do fator de estrutura em função dos parâmetros N e η . Deve ser observado que estas duas variáveis estão intimamente relacionadas à ordem do empilhamento de membranas, uma vez que elas são associadas, respectivamente, ao *número de camadas correlacionadas* e às *flutuações das membranas* [90, 98].

O fator de estrutura de uma pilha periódica e infinita de bicamadas, onde a distância entre lamelas é sempre a mesma e não existem flutuações no sistema, é composto por um conjunto de picos de Bragg de igual intensidade, independentemente da ordem de difração. Estes picos são bem representados por funções tipo delta, com largura limitada apenas pela resolução instrumental. Sólidos cristalinos têm um comportamento relativamente próximo a esta imagem ideal. Em fases esmécticas, no entanto, efeitos de desordem têm importância maior. O surgimento de desordem tem duas consequências diretas sobre o fator de estrutura: o parâmetro de Caillé aumenta e o número de camadas correlatas diminui.

Na Fig. 1.15, é exibido o comportamento de $\tilde{S}(q)$ para três valores diferentes de η . O número de camadas correlacionadas foi fixado em um valor alto ($N = 10000$), enquanto a periodicidade lamelar e a resolução instrumental foram estabelecidas em $d = 62,8 \text{ \AA}$ e $\Delta q = 0,006 \text{ \AA}^{-1}$. Observa-se que, para $\eta = 0$, o fator de estrutura é idêntico àquele esperado para sólidos cristalinos não perturbados. À medida que o valor de η é aumentado, a intensidade dos picos diminui drasticamente. Além disso, a largura desses picos aumenta ligeiramente.

Na Fig. 1.16, o comportamento de $\tilde{S}(q)$ é avaliado em função do número de camadas

Figura 1.15: Fatores de estrutura simulados com três valores diferentes para o parâmetro de Caillé: $\eta = 0$ (preto), $\eta = 0,1$ (vermelho) e $\eta = 0.35$ (azul). Os demais parâmetros foram fixados em $d = 62,8 \text{ \AA}$, $\Delta q = 0,006 \text{ \AA}^{-1}$ e $N = 10000$ (adaptado da Ref. [93]).

correlacionadas. Os outros parâmetros foram fixados em $d = 62,8 \text{ \AA}$, $\eta = 0,1$ e $\Delta q = 0,006 \text{ \AA}^{-1}$. Aqui novamente, são observadas mudanças nas intensidades das reflexões de Bragg. Menor o valor de N , menor a intensidade dos picos. Na comparação com o efeito introduzido por valores não-nulos de η , nota-se que a diminuição do número de camadas correlatas não destrói as ordens mais elevadas. Em vez disso, nota-se que os picos tornam-se mais arredondados, com a perda do aspecto tipo função delta. Por outro lado, o fenômeno de alargamento dos picos é mais pronunciado e, para valores bastante baixos de N (curva azul, $N = 3$), oscilações devido a efeitos de batimento aparecem convoluídas com o fator de estrutura.

A consequência mais relevante destes efeitos de desordem sobre o fator de estrutura é que, para grandes valores de q , ele tende à unidade:

$$\lim_{q \rightarrow \infty} \tilde{S}(q) = 1 \quad (1.24)$$

Esta constatação é um resultado muito importante porque ela significa que, para altos valores do vetor de espalhamento em difratogramas de fases liotrópicas lamelares, os perfis de intensidades são dominados pelo fator de forma $P(q)$.

Figura 1.16: Fatores de estrutura simulados para três valores do número de camadas correlacionadas: $N = 10000$ (preto), $N = 10$ (vermelho) e $N = 3$ (azul). Os demais parâmetros foram fixados em $d = 62,8 \text{ \AA}$, $\eta = 0,1$ e $\Delta q = 0,006 \text{ \AA}^{-1}$.

1.7 Dinâmica de DNA em fases lamelares

O conhecimento acerca das propriedades dinâmicas de fragmentos de DNA no interior de fases lamelares é uma temática importante por duas razões principais: primeiro, considerando-se o potencial destes sistemas em terapia gênica, a liberação controlada de nucleotídeos dentro do núcleo requer a determinação precisa das escalas de tempo nas quais eles são expelidos do vetor. Segundo, o movimento de macromoléculas anisotrópicas em geometrias confinadas é encontrado em uma variedade de fenômenos biológicos fundamentais tais como o transporte de proteínas através de membranas ou a replicação de DNA, entre outros [99–102].

Além disso, existe uma relação íntima entre a estrutura dos agregados e a forma como suas partículas se difundem. Portanto, no contexto desta tese, estudos dinâmicos também complementam as análises estruturais feitas com difração de raios X e microscopia. Por “propriedades dinâmicas”, entende-se aqui a **difusão** de nucleotídeos nos canais aquosos de uma fase lamelar. Deve ser observado que, para complexos do tipo “sanduíche”, os bastões de DNA são limitados estericamente pelas paredes lipídicas que restringem seu movimento ao plano das membranas. Esta característica estrutural confere propriedades anisotrópicas à mobilidade das partículas no interior da pilha. Atenção especial deve também ser dada às dimensões espaciais dos processos analisados aqui. Os cilindros e o espaçamento intermembranar onde a difusão ocorre têm apenas algumas poucas dezenas de nanômetros. Estas dimensões não permitem o monitoramento do deslocamento de

partículas individuais nem a visualização do processo no interior de uma única camada aquosa. Neste caso, a análise é feita pelo monitoramento da difusão média de grandes populações de moléculas em movimento no interior de milhares de camadas ao longo da pilha.

1.7.1 Difusão Browniana anisotrópica

O deslocamento de partículas cilíndricas em solução é convenientemente descrito em termos de dois coeficientes de fricção translacional independentes (vide Fig. 1.17(a)), para os movimentos paralelo e perpendicular ao eixo longo do cilindro, respectivamente [103, 104]. Experimentalmente, dois regimes de movimento Browniano têm sido observados em suspensões isotrópicas de partículas em forma de bastões. O primeiro regime, encontrado para baixas concentrações, é caracterizado por um único coeficiente de difusão independente da concentração. Essa constante de difusão também pode ser obtida pela média apropriada dos dois coeficientes de fricção básicos [105–107]. Para bastões com fator de aspecto de ≈ 25 , tais como os fragmentos de DNA usados neste trabalho, este coeficiente de difusão tem sido estabelecido como sendo da ordem de $D \approx 30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ quando as partículas estão dispersas em soluções aquosas [32, 106, 108–110]. No segundo regime, mais concentrado, as partículas começam a interagir entre si. Neste caso, o coeficiente de difusão D se torna dependente da fração volumétrica de partículas [105, 108, 111], e vários modelos teóricos ou simulações numéricas têm sido propostos para abordá-lo [32]. Em concentrações ainda mais elevadas, os cilindros adquirem ordem de orientação e uma fase nemática é alcançada (Fig. 1.17(b)). Para tempos longos, a raiz quadrática média dos deslocamentos de uma única partícula é anisotrópica [111], explicitando a quebra de simetria da fase nemática.

A difusão anisotrópica de bastões de DNA, movendo-se dentro de uma dada camada à altura z , é adequadamente descrita pela segunda lei de Fick na forma:

$$\partial_t C = D_{\parallel} \partial_x^2 C + D_{\perp} \partial_y^2 C \quad (1.25)$$

Existe um número bastante grande de soluções para a Eq. 1.25, dependendo das condições iniciais e de contorno do problema [112]. No contexto deste trabalho, a condição inicial relevante é dada por uma função delta de Dirac. Esta premissa leva à solução Gaussiana bidimensional dada por:

$$C(x, y, z, t) = \frac{C_0(z)}{4\pi t \sqrt{D_{\parallel} D_{\perp}}} \exp \left\{ - \left(\frac{x^2}{4D_{\parallel} t} + \frac{y^2}{4D_{\perp} t} \right) \right\} \quad (1.26)$$

Figura 1.17: Desenho esquemático de soluções de DNA: (a) Partículas não interagentes: o deslocamento dos bastões é caracterizado em termos de dois coeficientes de fricção independentes, paralelo e perpendicular ao eixo longo da cadeia. A difusão é isotrópica, com D resultante dado por uma média adequada de $D_{\perp}$ e $D_{\parallel}$ [103]. (b) Partículas interagentes: os bastões estão localmente orientados numa fase nemática e a difusão é então anisotrópica, refletindo a quebra de simetria da fase.

onde C_0 é a concentração inicial. $D_{\parallel}$ e $D_{\perp}$ são, respectivamente, os coeficientes de difusão ao longo dos eixos paralelo e perpendicular ao eixo dos bastões.

1.7.2 FRAP espacialmente resolvido

Uma técnica padrão para a investigação de dinâmica em escala molecular é a técnica de **recuperação de fluorescência após foto-branqueamento** ou (*FRAP - Fluorescence Recovery After Photobleaching*). O princípio de operação do método consiste na marcação, com uma sonda fluorescente, de uma pequena quantidade de partículas cuja difusão se deseja estudar. Um feixe de laser, curto e intenso, sintonizado no comprimento de onda de excitação da sonda, é focalizado sobre uma pequena região da amostra, causando a perda irreversível da fluorescência local. Em seguida, o feixe é fortemente atenuado e a amostra é observada no espectro de emissão da sonda. A migração lateral de partículas fluorescentes, do exterior da zona de *bleach* para o interior da mancha, provoca a recuperação da fluorescência (vide Fig. 1.18). O comportamento temporal deste processo depende da taxa de mobilidade das partículas, de cuja análise os coeficientes de difusão são obtidos [110, 111, 113–115].

Em um experimento de FRAP, assume-se que a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de fluoróforos. Assumindo-se difusão em duas dimensões, tem-se

Figura 1.18: Típicas imagens de FRAP com seus respectivos perfis 3D. (a) Logo após o processo de *bleach*, a fluorescência no interior da mancha é virtualmente extinta. Com o passar do tempo, a largura da mancha aumenta e a migração de fluoróforos do entorno para o interior da zona de *bleach* dá origem à recuperação da fluorescência (b) e (c).

que $f_0 \propto C(x, y, t)$. Usando-se coordenadas polares, o perfil de fluorescência em um determinado instante t é descrito por:

$$f_0(r, \theta) = I_0 + f_0(t) \exp \left[-\frac{r^2}{2} \left(\frac{\cos^2 \theta}{w_{\parallel}^2} + \frac{\sin^2 \theta}{w_{\perp}^2} \right) \right] \quad (1.27)$$

Em 1.27, $w_{\parallel}^2$ e $w_{\perp}^2$ correspondem às componentes da variância no instante t . Comparando 1.27 e 1.26, é fácil determinar as relações:

$$w_{\parallel}^2 = 2D_{\parallel}t \quad (1.28a)$$

$$w_{\perp}^2 = 2D_{\perp}t \quad (1.28b)$$

As Eqs. 1.28 foram obtidas assumindo-se uma função delta como condição inicial. Na prática, porém, esta situação nunca é alcançada. Devido à largura finita do feixe de laser, e uma duração também finita do pulso de *bleach*, o caso real é diferente desta condição ideal.

No entanto, visto que o feixe de laser empregado aqui tem perfil Gaussiano, pode-se interpretar a primeira imagem de bleach através de um deslocamento na escala temporal do experimento. Em outras palavras, assume-se que o primeiro registro corresponde a

um estado posterior de uma condição inicial tipo delta. Então, as Eqs. 1.28 podem ser corrigidas [113]:

$$w_{\parallel}^2 = 2D_{\parallel}t + w_0^2 = 2D_{\parallel}(t + t_0) \quad (1.29a)$$

$$w_{\perp}^2 = 2D_{\perp}t + w_0^2 = 2D_{\perp}(t + t_0) \quad (1.29b)$$

Em 1.29, w_0^2 corresponde ao tamanho do feixe do laser. Não é difícil conectar o comportamento temporal do perfil espacial das manchas, caracterizados pelas variâncias $w_{\parallel}^2$ e $w_{\perp}^2$, aos respectivos coeficientes de difusão.

1.8 O modelo de Dobrindt

A análise de difusão isotrópica é largamente discutida na literatura [111,113,114]. Por outro lado, a extração de informação quando a difusão ocorre em meios anisotrópicos requer abordagens bastante específicas, segundo o tipo de simetria presente. No caso do sistema analisado aqui, duas dificuldades devem ser contornadas: a anisotropia imposta por uma fase lamelar e a anisotropia relacionada à auto-organização das moléculas de DNA entre as bicamadas. Em outras palavras, trata-se de uma fase ordenada de DNA inserida em uma matriz também anisotrópica. Recentemente, um modelo teórico abordando as características específicas do sistema aqui investigado foi desenvolvido por Jens Dobrindt no CRPP [23]. Abaixo, é apresentada uma breve descrição desse modelo e, no Cap. 4, algumas evidências experimentais são apresentadas para sua validação. Uma descrição mais acurada pode ser encontrada na Ref. [24], onde o tratamento é estendido ao movimento de bastões de DNA em fases colestéricas.

1.8.1 Problemas em análises de difusão dentro de fases lamelares

Começamos com algumas considerações acerca do processo de difusão no interior de apenas UMA camada aquosa de uma fase lamelar. Caso a concentração de partículas seja pequena, tal que interações entre fragmentos não sejam suficientes para a formação de fases ordenadas, os bastões encontram-se isotropicamente distribuídos no plano das membranas. Como mencionado anteriormente, neste caso, a difusão é caracterizada por uma única constante de mobilidade, D . A partir da Eq. 1.27, é fácil concluir que, para condição inicial tipo delta de Dirac, manchas de FRAP apresentam geometria circular ao longo do tempo. Além disso, ainda de acordo com 1.27, o perfil espacial de fluorescência ao longo de uma secção transversal dessa mancha tem forma Gaussiana.

Por outro lado, se a concentração de partículas é suficientemente alta para dar origem a uma fase nemática 2D, a difusão é caracterizada por dois coeficientes de mobilidade: um rápido, $D_{\parallel}$, e outro lento, $D_{\perp}$. Neste caso, visto que as velocidades são diferentes ao longo do eixo paralelo e perpendicular ao diretor nemático, a mancha de *bleach* evolui segundo uma simetria elíptica. Ao longo dos dois eixos principais, os perfis de fluorescência são também Gaussianos, sendo caracterizados por variâncias $w_{\parallel}^2$ e $w_{\perp}^2$.

Agora, consideremos um conjunto de **membranas orientadas homeotropicamente**, com fragmentos de DNA inseridos nos canais aquosos. Por conveniência, o sistema de coordenadas polares (r, θ) é escolhido com origem dos ângulos azimutais ao longo do diretor nemático. Além disso, assume-se que **os diretores nemáticos das diferentes camadas são independentes uns dos outros e encontram-se uniformemente distribuídos no intervalo $[0, \pi]$** . Em outras palavras, não existe correlação transmembranar entre as partículas. Em um experimento de FRAP, as observações são realizadas ao longo eixo óptico do microscópio, a mesma direção da orientação homeotrópica. Portanto, a imagem registrada carrega informação acerca de um grande número de camada ao longo do eixo óptico ².

A superposição de várias camadas leva a diferentes perfis espaciais para as manchas de *bleach* observadas, dependendo da simetria de difusão no interior das camadas individuais. No caso de difusão isotrópica, a imagem final corresponde à convolução de várias manchas circulares com perfis Gaussianos de fluorescência (Fig. 1.19(a)). O resultado é uma mancha circular cujo perfil é também Gaussiano, sendo apropriadamente descrito pela Eq. 1.27.

Para difusão anisotrópica, porém, o caso é bastante diferente. Visto que os diretores nemáticos estão aleatoriamente distribuídos, a superposição de uma multitude de manchas elípticas leva à uma mancha resultante com simetria circular (Fig. 1.19(b)). Diferentemente do perfil de fluorescência observado no caso isotrópico, aqui, uma Gaussiana não basta para descrever a fluorescência. Isto significa que a Eq. 1.27 não é adequada para extrair informações para difusão anisotrópica e um novo modelo é então necessário.

1.8.2 Forma modificada do perfil espacial de fluorescência

Para descrever o perfil espacial de fluorescência da mancha de *bleach* resultante da difusão anisotrópica no interior do espaço intermembranar, Fig. 1.19(b), é necessário modificar a Eq. 1.27 para se levar em conta a média azimutal das várias elipses projetadas.

²Neste trabalho, foi usado um microscópio confocal. Porém, o *pinhole* foi mantido completamente aberto, de modo que trabalhou-se fora da região de confocalidade do aparelho (veja os detalhes na seção Materiais e Métodos).

Uma vez que as orientações nas diferentes camadas são uniformemente distribuídas no intervalo $[0, \pi]$, um primeiro passo para se obter uma expressão apropriada é a realização de uma média de 1.27 neste intervalo angular [23]:

$$\begin{aligned} F_0(r, t) &= \frac{1}{\pi} \int_0^\pi f_0(r, \theta) d\theta \\ &= y_0 + A(t) \exp \left[-r^2 \left(\frac{1}{w_{\parallel}^2} + \frac{1}{w_{\perp}^2} \right) \right] \mathbf{I}_0 \left[r^2 \left(\frac{1}{w_{\parallel}^2} - \frac{1}{w_{\perp}^2} \right) \right] \end{aligned} \quad (1.30)$$

onde o termo $\mathbf{I}_0$ é uma **função de Bessel modificada de primeiro tipo e ordem 0**. A Eq. 1.30 corresponde a uma situação idealizada, que não leva em conta desvios introduzidos pelas condições experimentais.

Em uma descrição mais realista, a largura do feixe não é constante ao longo do eixo óptico. Em vez disso, se a objetiva tem baixa abertura numérica, como tipicamente usado em experimentos de FRAP espacialmente resolvidos [107, 115], a aproximação paraxial é adequada para descrever o perfil de intensidade de luz Gaussiano. A meia-largura do feixe no plano focal onde $I = I_0 e^{-2}$ se torna então:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2} \quad (1.31)$$

onde z_R está relacionado à cintura do feixe w_0 e ao comprimento de onda da luz incidente através da relação $z_R = \pi w_0^2 / \lambda$. A intensidade axial do feixe é dada por:

$$I(z) = I_0 \left[\frac{w_0}{w(z)} \right]^2 \quad (1.32)$$

Assumindo-se a faixa de integração Z ao longo do eixo óptico como sendo suficientemente pequena na comparação com o comprimento de Rayleigh z_R (como é tradicionalmente usual em experimentos), a fórmula final da depleção de fluorescência é dada por [24]:

$$F_0(r, t) = F'_0(t) \exp \left[-r^2 \left(\frac{1}{w_{\parallel}^2} + \frac{1}{w_{\perp}^2} \right) \right] \times I_0 \left[r^2 \left(\frac{1}{w_{\parallel}^2} - \frac{1}{w_{\perp}^2} \right) \right] \quad (1.33)$$

As variâncias $w_{\parallel}^2$ e $w_{\perp}^2$ estão agora ligados aos coeficientes de mobilidade através das relações:

$$w_{\parallel}^2 = w_0^2 + 8D_{\parallel}t \quad (1.34a)$$

$$w_{\perp}^2 = w_0^2 + 8D_{\perp}t \quad (1.34b)$$

O fator de normalização $F'_0(t)$ em 1.33 é dado por:

$$F'_0(t) = \frac{2ZC_0}{\pi \sqrt{(w_0^2 + 8D_{\parallel}t)(w_0^2 + 8D_{\perp}t)}} \quad (1.35)$$

Para tempos longos, o comprimento de difusão, ou seja, o menor dos dois comprimentos característicos $D_{\parallel}t$ e $D_{\perp}t$, é muito maior que as dimensões intrínsecas do feixe Gaussiano (w_0 , λ e z_R). Neste caso, a forma descrita em 1.30 é *assintoticamente* recuperada. Para a extração de coeficientes de difusão anisotrópicos neste trabalho, foi utilizada a forma descrita na Eq. 1.33. Deve ser observado, porém, que esta forma possivelmente não é suficientemente rigorosa no limite de tempos pequenos devido às aproximações usadas para as condições experimentais.

(a) Difusão isotrópica dentro dos canais aquosos.

(b) Difusão anisotrópica dentro dos canais aquosos.

Figura 1.19: Imagem esquemática do processo de difusão em duas situações: (a) quando a concentração de nucleotídeos é baixa e a difusão entre bicamadas é isotrópica, a projeção de várias manchas com geometria circular resulta em uma mancha também de simetria circular e perfil de fluorescência Gaussiano. (b) Quando a difusão dentro dos canais é anisotrópica, a projeção de várias manchas elípticas não correlacionadas resulta em uma mancha de simetria circular cujo perfil de fluorescência não é apropriadamente descrito por uma simples função Gaussiana. (Adaptado de [116]).

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Constituintes do sistema

2.1.1 Fragmentos de DNA

DNA de timo de boi foi comprado da Sigma-Aldrich e submetido à desalinização com uma solução tampão (acetato de sódio a 0,3 M, *pH* ajustado em 7) e etanol puro ¹. Após congelamento durante a noite, a -80°C , a mistura foi centrifugada várias vezes e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi então submetido à liofilização, fornecendo nucleotídeos sem a presença de sais adicionados prontos para sonicação.

O tratamento com ultrassom levou a fragmentos com ≈ 150 pb e comprimento de ≈ 500 Å. O controle de temperatura durante este processo foi realizado pela introdução de uma mistura de água e gelo no banho de ultrassom. As dimensões dos fragmentos foram sistematicamente inspecionadas por técnicas de eletroforese. Os tamanhos correspondem aproximadamente ao comprimento de persistência da cadeia e, sem levar-se em conta camadas de hidratação, permite a descrição das partículas como cilindros rígidos de 500 Å $\times$ 20 Å.

Para tornar possível observações em microscopia de fluorescência, assim como os experimentos de FRAP, os fragmentos foram marcados com uma sonda fluorescente. O fluoróforo escolhido foi o YOYO, comprado da Molecular Probes. A taxa de marcação foi de 1 molécula de YOYO para cada 5000 pares de base. Em solução aquosa, a prova praticamente não fluoresce. Porém, quando ligada aos nucleotídeos, sua intensi-

¹Todas as etapas de pré-tratamento de DNA e de surfactantes foram realizadas por Annie Février, técnica de laboratório no CRPP

dade de fluorescência aumenta de um fator 3500. O espectro de excitação tem pico em $\lambda_{exc} = 491$ nm, enquanto o máximo de emissão está situado em $\lambda_{em} = 508$ nm. A molécula tem geometria planar e se liga às pontas dos fragmentos, assumindo uma orientação paralela ao eixo longo que liga as bases de um mesmo par [117]. Esta conformação forma um ângulo de quase 90 graus entre o dipolo de excitação do YOYO e o eixo do DNA. Por esta razão, um feixe de luz polarizada de forma paralela ao eixo do DNA não excita o YOYO. Portanto, a intensidade de fluorescência observada também carrega informação acerca da orientação dos bastões [118]. O ciclo de preparação do DNA é sumarizado na Fig. 2.1. Maiores detalhes acerca dos protocolos usados no tratamento dos constituintes do sistema estudado aqui podem ser encontrados no Ap. A.

2.1.2 Parte lipídica

A parte lipídica foi obtida através da mistura de lecitina de soja, ou **fosfatidilcolina (PC)**, e Simulsol 2599 PHA, um co-surfactante não-iônico. Estes produtos foram comprados da Sigma-Aldrich e da Seppic, respectivamente, e usados sem nenhum outro tipo de purificação.

Os maiores constituintes da lecitina de soja são fosfatidilcolinas bicatenárias cujas cadeias são compostas de ácido linoleico C18:2 (64 %)². Ácido palmítico C16:0 (13%), ácido oleico C18:1 (10%), ácido linoleico C18:3 (6%) e ácido esteárico C18:0 (4 %) também aparecem em quantidades importantes na lecitina. A massa molar média é ≈ 776 g/mol e a massa específica é algo em torno de 1.02 g/cm³ [119]. A predominância de lipídios insaturados faz com que a lecitina tenha baixo ponto de fusão, de modo que, à temperatura ambiente, suas cadeias são geralmente encontradas no estado fluido, L_α [120].

Simulsol 2599 PHA é o nome comercial de uma mistura de ácidos graxos etoxilados. Por vezes, este produto é conhecido por seu nome químico *macrogol oleate*. O maior constituinte é o ácido oleico (around 72%). Ácidos palmítico e esteárico também aparecem em quantidades relevantes (11% e 3%, respectivamente). Entre os componentes minoritários, encontram-se os ácidos palmitoleicos, linoleico e mirítico. Uma pequena porcentagem de ácidos graxos de cadeia longa, $C > 18$, também é encontrada numa proporção inferior a 2,5 %. A massa molar média calculada é ≈ 278 g.mol⁻¹ e a massa específica é 1.02 g/cm³, segundo o catálogo do fabricante [121].

Um “premix” desses dois grupos de lipídios, PC e Simulsol, foi preparado. Eles foram

²Lipídios são frequentemente denotados em termos do número de carbonos e de insaturações em suas cadeias. Nesta notação, com forma geral do tipo $CN_1 : N_2$, N_1 representa o número de carbonos e N_2 , o número de insaturações.

Figura 2.1: Tratamento do DNA usado nesta tese: o ciclo começa com fibras de nucleotídeos de tamanhos polidispersos. Em seguida, elas são submetidas à desalinização, liberando cátions e ânions na solução. No passo seguinte, o precipitado é ultrasonificado levando a fragmentos cilíndricos com 150 pb. Durante a sonicação, o tamanho das partículas é inspecionado por eletroforese. O último estágio é a marcação com o fluoróforo YOYO. No final do ciclo, têm-se fragmentos liofilizados de DNA com tamanho correspondente ao comprimento de persistência da cadeia.

co-solubilizados em ciclohexano e submetidos à liofilização durante a noite para evaporação do solvente. O papel do co-surfactante é aumentar a flexibilidade das membranas lipídicas, aumentando o domínio de diluição da fase hospedeira. Os resultados apresentados no próximo capítulo foram obtidos para duas composições de membranas, preparadas com duas proporções PC-Simulsol distintas (em massa) 7:3 e 1:1. Devido ao caráter zwitteriônico dos grupos polares das lecitinas, e ao caráter não-iônico do Simulsol, a carga global das membranas resultantes é neutra. De agora em diante, a preparação PC+Simulsol será designada ao longo do manuscrito apenas como *lipídios*.

2.1.3 Solvente

Para a maioria das amostras, o solvente usado foi água ultra pura obtida a partir de um sistema *Millipore*. Para se avaliar o papel da força iônica, algumas preparações foram formuladas usando uma solução de *acetato de amônio* a 0,25M. Esta solução salina foi obtida pela dissolução, em água ultra pura, de CH_3COONH_4 em pó.

O acetato de amônio é um sal monovalente formado a partir de um ácido fraco, o ácido acético CH_3COO^- , e uma base fraca, a amônia que dá origem ao cátion NH_4^+ . As respectivas constantes de dissociação são $pK_a = 4.75$ e $pK_b = 9.25$. Por causa disso, ele pode ser usado como solução tampão, fornecendo um meio com $pH = 7.0$.

2.2 Preparação de amostras

As amostras foram preparadas misturando-se os componentes acima descritos dentro de tubos Eppendorf. A massa de cada constituinte foi escolhida segundo a fração volumétrica pretendida, sendo calculada através da relação:

$$\phi_i = \frac{m_i}{P_i V_T} \quad (2.1)$$

onde ϕ_i é a fração volumétrica do constituinte (ϕ_{DNA} , ϕ_{lip} ou ϕ_{wt}), P_i é sua massa específica e V_T é o volume total da amostra. De modo geral, V_T foi escolhido em 100 μL , fazendo-se um bom compromisso entre a quantidade de material disponível e a precisão típica dos equipamentos de pesagem ($\pm 0.1mg$).

Dois tipos de amostras foram estudadas: o primeiro grupo foi preparado a partir de misturas (pseudo) binárias de lipídios e solvente. O propósito destas séries foi avaliar o comportamento da fase hospedeira e determinar seu domínio de hidratação, a espessura das membranas formadas e o limite de hidratação. O segundo grupo de formulações foi obtido a partir de misturas DNA-lipídios-solvente. Em ambos os casos, estudos envolvendo mudanças das condições iônicas do solvente foram realizados através da introdução de acetato de amônio.

As formulações podem ser representadas graficamente em um diagrama de fases ternário como aquele exibido na Fig. 2.2. Os lados do triângulo correspondem aos eixos do gráfico onde as frações volumétricas de cada componente aparecem representadas. Estas frações podem variar entre 0 e 1. Misturas binárias são representadas sobre eixo ϕ_{lip} enquanto formulações ternárias são indicadas por pontos no interior do triângulo.

Para sistemas ternários, é conveniente definir o parâmetro ρ , o qual representa a razão entre a fração volumétrica de lipídios e a fração volumétrica de DNA:

$$\rho = \frac{\phi_{lip}}{\phi_{DNA}} \quad (2.2)$$

Figura 2.2: Diagrama de fases para a representação de formulações ternárias. Mantendo-se $\rho = \phi_{lip}/\phi_{DNA}$ constante, linhas de diluição são estabelecidas no diagrama. As linhas pontilhadas indicam as principais linhas de diluição estudadas neste trabalho.

Valores pequenos de ρ significam complexos ricos em DNA. Por outro lado, valores mais altos de ρ implicam em complexos mais ricos em lipídios. Mantendo-se ρ constante, linhas de diluição são definidas no diagrama. A maioria das amostras estudadas neste trabalho foram preparadas sobre três linhas de diluição: $\rho = 3.1$, $\rho = 5.1$ e $\rho = 8.1$ (representadas por linhas tracejadas na Fig. 2.2). Além dessas linhas, para algumas amostras tratadas na Sec. 3.3.1, a fração volumétrica de água foi fixada e a relação ρ foi variada.

Após a preparação dos tubos, estes foram centrifugados e estocados sob refrigeração a 4 °C por 24 horas antes do início do processo de equilíbrio das amostras.

2.2.1 Procedimento para equilíbrio das formulações

Visto que o sistema aqui estudado é inteiramente baseado em lipídios desprovidos de carga líquida, não se pode contar com o auxílio de interações eletrostáticas para guiar a complexação. Então, neste caso, a adesão do DNA à parte lipídica ocorre em escalas

de tempo significativamente maiores que aquelas observadas para complexos DNA-LCs [86]. Com o objetivo de acelerar esse processo e promover a homogenização, as amostras foram submetidas a ciclos de agitação mecânica. Logo após a remoção do refrigerador, os tubos foram incubados por cerca de uma hora à temperatura de 30 °C. Em seguida, eles foram regularmente submetidos a ciclos alternados de centrifugação, com os tubos sendo colocados hora “de cabeça para cima”, hora de “cabeça para baixo”. A velocidade de rotação foi cuidadosamente escolhida em função da viscosidade das amostras. Para formulações hidratadas, que eram tipicamente fluidas, os ciclos foram realizados usando-se 1000-2500 rpm. Por outro lado, par amostras de grande viscosidade, a velocidade de rotação alcançou valores da ordem de 12000 rpm. A regra de ouro foi escolher a velocidade mínima necessária para deslocar o produto no interior do tubo. Este cuidado na escolha da velocidade de rotação é uma questão importante porque, quando ela é excessiva, pode ocorrer separação de fases na formulação. O tempo total de centrifugação foi de poucos minutos. Em geral, tempos em torno de 3 minutos foram suficientes para promover o deslocamento completo das misturas dentro dos tubos. Este tratamento foi realizado diariamente, por pelo menos 4 semanas, antes de qualquer análise posterior.

2.3 Experimentos de raios X

Uma vez atingido equilíbrio, as amostras foram cuidadosamente colocadas em capilares de vidro selados, dando origem a domínios aleatoriamente orientados. O procedimento para atingir este estágio dependeu também da viscosidade das formulações. Misturas lipídios/água, por exemplo, geralmente eram bastante fluidas, de forma que puderam ser facilmente colocadas dentro de capilares de 1 mm por simples centrifugação. Para preparações ternárias mais diluídas, *e.g.* $\phi_w > 0,35$, isto também pôde ser feito. No entanto, em amostras viscosas, isto é, com grande quantidades de DNA, foi necessário o uso de suportes metálicos para o acondicionamento adequado dentro de capilares de 2 ou 3 mm.

O número total de formulações analisadas neste trabalho foi algo em torno de 300. Um terço delas foi avaliado usando radiação síncrotron (RS) e o restante foi estudado com fontes convencionais de raios X no Centre de Recherche Paul Pascal (Bordeaux, França). Os experimentos consistiram no registro das intensidades espalhadas em função do vetor de onda $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$ no espaço recíproco, onde θ é o ângulo formado entre o vetor de espalhamento e o feixe direto.

Os estudos em síncrotron foram conduzidos na linha SWING no síncrotron SOLEIL, próximo à Paris, França. Foram realizadas duas rodadas de experimentos no SOLEIL

(projetos 20080568 e 20100052), totalizando cerca de 48 horas de feixe. As fontes clássicas foram um dispositivo Nanostar-Bruker e um anodo rotatório montado no próprio CRPP, baseado em um detector MAR 1200. Abaixo, os principais aspectos destes dispositivos são detalhados.

2.3.1 A linha SWING no síncrotron SOLEIL

A utilização de radiação síncrotron tem várias vantagens sobre fontes clássicas. Entre essas conveniências, pode-se destacar a alta resolução, alto fluxo de fótons, seletibilidade do comprimento de onda, polarização e coerência. Do ponto de vista do presente trabalho, as mais importantes das características acima mencionadas são a brilhância elevada (fluxo) e alta resolução. Fluxo elevado permite destacar picos pouco intensos, os quais podem ser cruciais na discriminação de diferentes estruturas. Além disso, a escala de tempo dos experimentos pode ser bastante reduzida, tornando possível a análise de grande quantidade de amostras em poucas horas. Por sua vez, a alta resolução dessas fontes torna possível observar e resolver certas reflexões que poderiam não ser distinguíveis com dispositivos convencionais.

A estação SWING (uma espécie de acrônimo de SAXS, WAXS e GISAXS) é uma linha de luz “de fácil uso” no SOLEIL, especialmente desenvolvida para experimentos envolvendo espalhamentos tanto a baixo quanto alto ângulo. A geometria de “incidência de feixe rasante” (GISAXS) é outra técnica que pode ser implementada nessa linha. Estas capacidades abrem uma janela experimental para estudos cobrindo dimensões de dezenas de Å a poucos μm . Na Fig. 2.3, uma representação esquemática da linha de luz é mostrada.

Figura 2.3: Esquema geral da linha de luz SWING-SOLEIL esboçando seus principais elementos (Extraído da Ref. [122]).

As energias disponíveis estão situadas no intervalo 5–17 keV, cobrindo desde raios X

“moles” até raios X “duros”. Equivalentemente, os comprimentos de onda situam-se entre $\lambda_{min} = 0,729 \text{ \AA}$ e $\lambda_{max} = 2,480 \text{ \AA}$. O fluxo de fótons é estimado da ordem de 10^{13} ph/s , quando a corrente no anel de estocagem está em seu valor máximo de 500 mA. O feixe é fornecido por um ondulador U20 que opera em vácuo, enquanto um espelho cristalino duplo, de Si_{111} , é o componente óptico responsável pela seleção do comprimento de onda. A distância amostra-detector varia na faixa de 0,6 a 8 m. O feixe tem geometria retangular, com dimensões de $400 \mu\text{m}$ (H) x $100 \mu\text{m}$ (V). As divergências máximas são $14.5 \mu\text{rad}$ (H) x $4.6 \mu\text{rad}$ (V) [122].

Um ponto forte da linha é o seu sistema de detecção: um detector CCD (PCCD170170, Avix), com $170 \times 170 \text{ mm}^2$, é posicionado no interior de uma câmara cilíndrica com 7 m de comprimento por 2 m de diâmetro (veja Fig. 2.4(a)). O conjunto é mantido em atmosfera evacuada, a 10^{-5} bar . Carrinhos motorizados movimentam a peça ao longo de 6 m em deslocamentos longitudinais enquanto, na direção transversal, perpendicular ao feixe, esses movimentos são de até 40 cm. A matriz de detecção é composta por 1024×1024 pixels, cada um correspondendo a um quadrado com $\approx 166 \mu\text{m}$. Um segundo detector 2D (Princeton), dedicado a registros em WAXS, permite a análise simultânea das regiões de baixo e alto ângulo.

(a)

(b)

Figura 2.4: Experimentos na linha de luz SWING-SOLEIL. À esquerda, uma vista em perspectiva do túnel de detecção. À direita, uma vista detalhada do porta-amostra exibindo a entrada da câmara de detecção, os capilares acomodados no suporte, o sistema de circulação de água (mangueiras acima do suporte) e parte do sistema de entrega do feixe.

Os experimentos na linha de luz SWING-SOLEIL foram realizados em duas épocas distintas. Na primeira rodada de análises, a ênfase recaiu sobre a fase hospedeira. Em particular, o objetivo desta rodada foi verificar a fluidez das membranas e procurar possíveis transições $L_\alpha \rightarrow L_{\beta'}$. A partir de informações disponíveis na literatura, é conhecido

que distâncias típicas entre as caudas carbônicas em fosfolipídios situam-se por volta de 3 a 6 Å. A fim de acessar essa região no espaço recíproco, a distância amostra-detector foi estabelecida em $D_{SD} = 608$ mm. A energia da radiação foi escolhida em $E = 12\text{keV}$, o que é equivalente a $\lambda = 1,03$ Å. Nesta configuração, a resolução espacial foi estimada em $\Delta q \approx 0,0038$ Å⁻¹ (ver Seq. 2.3.3). Além disso, o detector foi posicionado fora do eixo da linha, de tal modo que a faixa acessada no espaço recíproco situou-se entre $q_{min} = 0,0310$ Å⁻¹ e $q_{max} = 1,7450$ Å⁻¹.

Na segunda rodada, tanto misturas binárias quanto ternárias foram investigadas. Atenção especial foi dada ao comportamento de fase do sistema na escala mesoscópica, o que significa que as distâncias estudadas no complexo tipicamente recaíram no intervalo 10–100 Å. Além disso, para o complexo sem DNA, o interesse também foi avaliar o espalhamento difuso para estudos posteriores sobre o fator de forma do sistema. Para atingir a configuração otimizada para estas análises, a distância amostra-detector foi escolhida em $D_{SD} = 1575,6$ mm. Novamente, a energia da radiação foi usada no valor padrão $E = 12$ keV. A resolução estimada nesta configuração foi $\Delta q = 0,0017$ Å⁻¹ e faixa de vetores q acessíveis foi $q_{min} = 0,0060$ Å⁻¹– $q_{max} = 0,7000$ Å⁻¹.

Em ambos os experimentos, foi usada circulação de água para manter o porta-amostra a 25 °C. Um conjunto de cerca de 15 capilares era colocado a cada vez no suporte, o qual era remotamente pilotado (ver Fig. 2.4(b)). Registros de calibração foram realizados para cada configuração usando-se AgBe (behenato de prata) como padrão. Essas imagens de controle foram usadas posteriormente para determinar com precisão a posição do feixe direto, assim como para estabelecer a distância amostra-detector com exatidão. Antes de cada rodada de amostras, uma análise nanográfica foi realizada para determinar o melhor posicionamento dos capilares. Após isso, os registros foram levantados com tempos de exposição variando entre 5 e 1500 ms, dependendo da transmitância e do espalhamento da amostra.

A redução dos dados foi realizada com uma rotina, escrita em Java, denominada *FoxTrot* e fornecida pelo pessoal técnico da linha. Este software introduziu as correções apropriadas para dar conta de distorções e inomogeneidades, assim como as normalizações pelo tempo de exposição e pela transmitância. No fim dos experimentos, arquivos *.dat*, contendo colunas com as intensidades de espalhamento em função de q , foram obtidos. As respectivas incertezas também estavam contidas nestes arquivos.

2.3.2 Fontes convencionais

Nanostar-Bruker

A maioria dos dados usados nesta tese foi obtida num dispositivo *Nanostar-Bruker* (ver Fig. 2.5(a)) instalado no CRPP. Esta máquina é inteiramente dedicada a experimentos envolvendo espalhamento de raios X, sendo especialmente desenhada para estudos em estruturas na faixa de 1 nm – 100 nm. O feixe é fornecido por uma fonte convencional, a partir do espectro característico de um alvo de cobre. A tensão de aceleração foi de 40 kV e a corrente de filamento, de 35 mA (totalizando 1400 W). A radiação é obtida a partir das transições $\text{Cu}K_\alpha$, levando a um comprimento de onda³ $\lambda = 1,5418\text{\AA}$. O fluxo na amostra foi estimado em algo da ordem de 10^7 ph/s. A geometria do feixe era circular e seu tamanho foi determinado por um conjunto de *pinholes*, resultando em um diâmetro final de $450\text{ }\mu\text{m}$.

A trajetória dos fótons no interior da máquina é percorrida em vácuo primário ($\approx 10^{-4}$ bar), de forma que efeitos de espalhamento espúrio devido ao ar são evitados. O detector é baseado num sistema a gás, com baixo nível de ruído, inferior a uma contagem por pixel por segundo. A matriz de detecção totaliza 1024×1024 pixels, cada um com $100\text{ }\mu\text{m}$ de lado. Inhomogeneidades na resposta do detector, assim como distorções espaciais, foram adequadamente corrigidas por arquivos de calibração previamente determinados. O bloqueio do feixe direto é feito por um *beam stopper* de chumbo suspenso no centro do detector através de fios bastante finos de um material transparente a raios X.

O procedimento para a realização de experimentos envolvendo o Nanostar, de modo geral, foi bastante semelhante ao descrito para a linha de síncrotron. Um conjunto de cerca de 10-15 capilares foi colocado em suporte metálico e uma nanografia foi previamente realizada para se determinar as melhores posições para o feixe. Um sistema de circulação de água fez controle de temperatura para manter o porta-amostra a 25°C . Em seguida, dependendo da transmitância das amostras, os registros foram realizados com tempos de exposição que variaram entre 2 e 5 horas. A distância amostra-detector predominantemente usada foi de ≈ 25 cm, embora poucos experimentos tenham sido realizados a distância de ≈ 105 cm. Para essas distâncias, o intervalo acessível no espaço recíproco foi, respectivamente, de $0,040\text{\AA}^{-1} < q < 0,825\text{\AA}^{-1}$ e de $0,010\text{\AA}^{-1} < q < 0,200\text{\AA}^{-1}$. O controle do aparelho foi realizado por meio um software próprio, o *SAXS-BRUKER*, que ao final do processo fornecia os difratogramas 2D em formato *.gfrm*. Esse programa também permitiu a redução dos dados, fornecendo as curvas 1D contendo uma tabela de

³Um filtro Ni foi usado para eliminar fótons oriundos de transições K_β . No entanto, não houve separação entre as linhas $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$, de modo que este comprimento de onda nominal é alcançado por uma média ponderada dessas transições $\text{Cu}K_\alpha$ [123].

$I(q) \times q$ com as incertezas nas contagens. Esses dois tipos de arquivo foram posteriormente tratados em outros softwares de análise como o Fit 2D ou Origin.

(a) Nanostar-Bruker

(b) Anodo rotatório

Figura 2.5: Fontes convencionais de raios X usadas neste trabalho. No aparelho Nanostar-Bruker, os experimentos foram conduzidos em vácuo e o detector foi um dispositivo 2D a gás. No anodo rotatório, as amostras foram mantidas à pressão atmosférica e o detector, baseado numa *image plate*.

Anodo rotatório

Além de experimentos na linha de síncrotron e no Nanostar-Bruker, algumas análises foram realizadas numa máquina montada no próprio laboratório, cuja fonte era um anodo rotatório. O comprimento de onda da fonte foi de $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$. O fluxo de fótons não foi determinado com precisão. Entretanto, a potência total da fonte era de 1500 W, divididos em duas linhas de feixe. Além disso, o trajeto do feixe entre a amostra e o detector deu-se à pressão atmosférica, acarretando espalhamentos espúrios devido ao ar.

Este dispositivo foi utilizado principalmente em função de sua capacidade de acesso a regiões de altos ângulos. As análises aqui realizadas foram referentes especialmente ao estado de fluidez da membrana, a qual requer acesso a valores de q situados na faixa entre $1 \text{ \AA}^{-1}$ e $2 \text{ \AA}^{-1}$. Essa capacidade é decorrente do seu sistema de detecção, um MAR1200 onde uma *image plate* montada sobre um carrinho motorizado permite aproximação a uma distância de até 13 cm. Além disso, a matriz de detecção é composta por 1200×1200 pixels, cada pixel com $150 \mu\text{m}$, permitindo, no limite, acessos a valores de $q = 2,2 \text{ \AA}^{-1}$. O sistema do porta-amostras e o detector são exibidos na Fig. 2.5(b).

O controle do dispositivo é totalmente baseado em uma rotina computacional escrita pela equipe de instrumentação do CRPP. Antes de se iniciar os registros de difração pro-

priamente ditos, em imagens bidimensionais, um fotodiodo foi usado para a realização de uma varredura das intensidades transmitidas pelas amostras. O objetivo deste procedimento foi encontrar o posicionamento adequado dos capilares. A grande maioria dos experimentos realizados nessa máquina utilizou distância amostra-detector de 13 cm. Alguns outros estudos foram realizados com distância de ≈ 38 cm. Os tempos de exposição utilizados foram da ordem de 2 horas e meia. Ao fim dos experimentos, o sistema fazia automaticamente a leitura da image plate fornecendo imagens bidimensionais em formato *.mar1200*. Esses arquivos foram posteriormente reduzidos a curvas de $I(q) \times q$ usando o Fit 2D.

2.3.3 Tratamento dos dados

Calibração

A etapa de tratamento de dados foi iniciada com determinações precisas da distância amostra-detector e da posição do feixe direto. Para a realização deste procedimento, foram utilizados os registros de referência obtidos no início de cada experimento com amostras de behenato de prata. As distâncias entre os planos cristalográficos do AgBe são conhecidas com elevada precisão [124], sendo este padrão largamente utilizado para calibração de experimentos de difração de raios X. O padrão de difração desse cristal é composto por uma série de anéis concêntricos (fig. 2.6(a)), situados em posições equidistantes correspondentes a múltiplos inteiros de 58,38 Å.

A posição correta do centro do feixe foi obtida por meio da marcação de vários pontos situados sobre um dos anéis de difração do AgBe, em geral a terceira ou quarta ordem (ver Fig. 2.6(a)). Em seguida, o centro do círculo médio mais próximo a todos esses pontos foi encontrado, sendo este o centro do difratograma (x_0, y_0) . A fim de se avaliar a qualidade desta determinação, foram realizadas representações azimutais dos anéis concêntricos (Fig. 2.6(b)). Nos casos em que o centro havia sido corretamente estabelecido, o padrão obtido nesta representação correspondeu a um conjunto de barras verticais paralelas. Pequenos desvios (inferiores a 2 pixels), introduzem sinuosidades bastante marcantes, permitindo a rápida identificação de desvios.

A distância amostra-detector foi determinada a partir das posições dos picos de difração. Quando a distância está corretamente definida, essas reflexões devem se situar nas posições múltiplas de $q_0 = 2\pi/58,38 = 0,1076 \text{ Å}^{-1}$.

Figura 2.6: Padrão de difração do behenato de prata. (a) Cinco ordens de anéis concêntricos igualmente espaçados ($d = 58,38 \text{ \AA}$): Na terceira ordem, cruzeiros mostram os pontos usados para determinar o centro do feixe direto. (b) Projeção azimuthal do padrão. Alto: quando o centro é corretamente localizado, um conjunto de barras verticais paralelas aparece. Baixo: por outro lado, quando o centro é erroneamente determinado (apenas dois pixels neste exemplo), sinuosidades surgem no padrão.

Subtração do fundo

De acordo com a instrumentação utilizada na coleta de dados, foram realizadas diferentes correções referentes à subtração de ruídos de fundo e remanência. Em particular, o sistema de detecção empregado em cada caso teve grande influência na forma como essas correções foram realizadas.

A região de interesse para os valores de q usados neste trabalho situou-se na faixa entre $q \approx 0,050 \text{ \AA}^{-1}$ e $q \approx 2,200 \text{ \AA}^{-1}$. Isto significa que a banda aqui estudada correspondeu predominantemente à faixa angular de espalhamento de médios e altos ângulos. Além disso, os complexos estudados foram analisados abaixo do limite de hidratação sendo, portanto, altamente espalhadores. Esses dois elementos combinados implicaram em relações sinal-ruído bastante favoráveis, pois, por um lado, efeitos relacionados a espalhamentos espúrios se concentram no entorno do feixe direto, isto é, são contidos predominantemente na região de ângulos muito baixos, e, por outro lado, a contagem de sinal oriundo da amostra é bastante intensa na comparação com outras fontes de sinal. O ruído aleatório introduzido pelos detectores do síncrotron e do Nanostar não causam mudanças

significativas nas curvas de espalhamento estudadas aqui, exceto para a região na faixa de ângulos mais elevados, onde as intensidades do sinal espalhado pela amostra decaem bastante. Essa região carrega informações relacionadas principalmente ao fator de forma das membranas e a devida correção de fundo torna-se relevante para a análise dos perfis de densidade eletrônica.

Nos experimentos realizados em síncrotron, a trajetória do feixe é percorrida quase que inteiramente no vácuo. Isso minimiza fortemente os efeitos de espalhamentos espúrios devidos ao ar. Além disso, o detector, baseado em tecnologia CCD, possui baixo nível ruído eletrônico. Por razões de construção, ao longo da matriz de detecção, existem algumas inhomogeneidades que precisam ser consideradas no procedimento de análise. Para corrigir esses efeitos, foram registradas curvas de intensidades do fundo (sem amostra) as quais posteriormente foram subtraídas das intensidades das amostras. Para comparar diferentes curvas, os perfis de espalhamento obtidos foram também normalizados pelo respectivo tempo de exposição. Matematicamente, o procedimento de correção é sumarizado da seguinte maneira:

$$I_{corr} = \frac{I_S}{T_S \times t_S} - \frac{I_{BG}}{T_{BG} \times t_{BG}} \quad (2.3)$$

onde I , T e t se referem, respectivamente, à intensidade de espalhamento, transmissão e tempo de exposição. Os índices “S” e “BG” correspondem, respectivamente, à amostra e ao fundo⁴.

No caso do Nanostar, espalhamentos devidos ao ar são praticamente inexistentes visto a trajetória dos fótons ocorre completamente em vácuo. Seu detector, baseado num sistema a gás, também possui níveis de ruído bastante baixos. Visto que o aparelho trabalha com um número limitado de configurações (λ fixo, detector em posição fixa e distâncias amostra-detector pré-estabelecidas), arquivos de calibração previamente levantados são usados e a única correção necessária durante os experimentos foi a subtração de um fundo uniforme. As intensidades, corrigidas e normalizadas, são então dadas por:

$$I_{corr} = I_S - BG \quad (2.4)$$

O valor da constante BG foi definido de forma relativamente arbitrária. Como regra geral, o valor subtraído foi escolhido de forma que fossem observados alguns valores de intensidade nulos na região de alto ângulo.

⁴Na linha SWING, a aplicação *Foxtrot* forneceu diretamente dados normalizados pelos tempos de exposição e pelas respectivas transmissões.

Para informações extraídas no anodo rotatório, as análises exigiram maior número de correções. Além do espalhamento de fundo, foi necessário subtrair a remanência do detector. Para isso, um registro da *image plate*, sem submetê-la à exposição, foi realizado. Esta imagem foi então subtraída de todos os demais difratogramas obtidos nessa máquina. O procedimento usado para correção de dados obtidos no anodo rotatório é resumido da seguinte maneira:

$$I_{corr} = \frac{I_S - I_R}{T_S \times t_S} - \frac{I_{BG} - I_R}{T_{BG} \times t_{BG}} \quad (2.5)$$

onde I_R corresponde à remanência do sistema de detecção.

Estimativas de resolução

Um ponto importante para os estudos conduzidos aqui é a resolução instrumental $\Delta q/q$. Este parâmetro é crucial, por exemplo, para o uso adequado dos modelos que descrevem as curvas de espalhamento de raios X (ver Seq. 1.6.1). Além disso, ele é também relevante para a indexação de picos de Bragg porque determina a capacidade de discriminação entre duas reflexões próximas.

A determinação acurada da resolução instrumental não é uma tarefa trivial porque ela depende de vários parâmetros que nem sempre são conhecidos em detalhe. Algumas expressões analíticas e métodos numéricos têm sido propostos para prever o alargamento intrínseco de picos de raios X devido ao aparato experimental [125]. Aqui, no entanto, dada a lacuna em se assegurar os valores exatos de certos parâmetros ($\Delta\lambda$, tamanho de *pinholes* e fendas, etc.), escolheu-se estimar as resoluções com o uso de uma abordagem puramente experimental baseada no padrão de difração do behenato de prata. Visto que as amostras aqui estudadas são sistemas moles, a desordem desses arranjos líquido-cristalinos é bastante superior àquela observada na estrutura cristalina do AgBe. Além disso, para os propósitos dos estudos relatados neste trabalho, considera-se que as larguras dos picos em um difratograma de behenato de prata são limitadas unicamente pela resolução instrumental. Neste caso, a medida da largura desses picos permite uma estimativa razoável da resolução total $\Delta q/q$.

De modo geral, funções de resolução são adequadamente descritas por Gaussianas ou Lorentzianas [93, 125]. Para dados obtidos no Nanostar e no anodo rotatório, foi possível se fazer ajustes dos picos do behenato de prata com equações do tipo:

$$I(q) = A_0 + I_0 \cdot \exp \left\{ \frac{-(q - q_n)^2}{2(\Delta q)^2} \right\} \quad (2.6)$$

onde A_0 é uma constante de *off-set*, I_0 é a amplitude do pico e q_n é sua posição. O parâmetro Δq é o desvio-padrão da função Gaussiana e está relacionado à meia largura à meia altura (HWHM) através da relação $\Delta q = HWHM/\sqrt{2 \ln 2}$.

Por outro lado, no caso de experimentos realizados na estação SWING, os ajustes não foram possível com a Eq. 2.6. Ajustes adequados de tais picos puderam, no entanto, ser realizados com funções Lorentzianas do tipo:

$$I(q) = A_0 + \frac{I_0}{1 + \frac{(q-q_n)^2}{\Delta q^2}} \quad (2.7)$$

onde $\Delta q = HWHM$.

Deve ser observado que os valores de Δq dados pelas Eqs. 2.6 e 2.7 também carregam um alargamento intrínseco da desordem térmica na estrutura cristalina do behenato de prata e correspondem, portanto, a super estimativas da resolução, especialmente para dados obtidos em síncrotron. Na Fig. 2.7, é exibida uma comparação entre as larguras dos picos de segunda ordem de difratogramas de AgBe registrados nos três equipamentos de raios X usados neste trabalho. As distâncias amostra-detector exibidas são aquelas mais frequentemente usadas ao longo da tese. As diferenças na resolução para cada equipamento são claramente observadas. A qualidade da resolução para dados oriundos do síncrotron é destacada pela *finesse* do pico do registro obtido na linha SWING-SOLEIL. Na Tab. 2.1, os valores de $\Delta q/q$ são exibidos para todas as configurações empregadas no manuscrito. Um claro efeito da distância amostra-detector sobre a resolução aparece.

Tabela 2.1: Estimativas da resolução total, $\Delta q/q$, para todas as configurações usadas neste trabalho, na posição $q = 0,215 \text{ \AA}^{-1}$.

Equipamento	Distância amostra-detector (mm)	Faixa de q ($\text{\AA}^{-1}$)	$\Delta q/q$ ($\text{\AA}^{-1}$)
SWING-SOLEIL	1575,6	$0,0600 < q < 0,7000$	$1,7 \times 10^{-3}$
	608,0	$0,0300 < q < 1,7450$	$3,8 \times 10^{-3}$
Nanostar-Bruker	1060	$0,0100 < q < 0,2000$	$1,5 \times 10^{-3}$
	250	$0,0400 < q < 0,8250$	$6,3 \times 10^{-3}$
Anodo rotatório	383	$0,0660 < q < 0,8200$	$5,1 \times 10^{-3}$
	133	$0,190 < q < 2,200$	$8,1 \times 10^{-2}$

Figura 2.7: Comparação das larguras dos picos de segunda ordem do behenato de prata, obtidos nos diferentes dispositivos empregados neste estudo. Os dados foram registrados a distâncias amostra-detector de 133 mm (anodo rotatório), 250 mm (Nanostar-Bruker) e 1575.6 mm (SWING-SOLEIL). As linhas sólidas correspondem a ajustes Gaussianos (linhas verde e preta) e à uma função Lorentziana (vermelha).

Procedimento de indexação

Após as correções apropriadas do espalhamento de fundo e de inomogeneidades do detector, a extração de informação dos padrões de difração foi iniciada com a determinação das posições dos picos de Bragg. Este procedimento foi realizado manualmente, com uso de programas tradicionais para visualização e tratamento de dados (Origin, Kaleidagraph, GNU plot, etc.). Em seguida, essas posições foram introduzidas em uma rotina desenvolvida em ambiente MatLab, desenhada especialmente para os estudos aqui relatados. O princípio desta ferramenta computacional consistiu em testar três tipos de simetria: lamelar, hexagonal 2D e retangular 2D (Fig. 2.8). Combinações bifásicas dessas três estruturas básicas também foram avaliadas e a escolha da indexação correta foi baseada na minimização da soma dos quadrados das diferenças entre as posições previstas e aquelas experimentalmente observadas.

Simetrias lamelares foram indexadas segundo a seguinte expressão:

$$q_n = (n + 1) \times q_0 \quad (2.8)$$

Figura 2.8: Células unitárias indexadas neste trabalho. (a) Fase lamelar contendo bastões organizados segundo uma simetria nemática. (b) Fase lamelar de lipídios contendo um arranjo hexagonal 2D de bastões e (c) fase lamelar de lipídios hospedando uma estrutura retangular 2D formada por bastões.

onde n é um inteiro e q_0 é a posição do pico de primeira ordem. As periodicidades esméticas puderam então ser facilmente extraídas a partir da relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_0} \quad (2.9)$$

Quando um pico difuso aparecia convoluído entre os picos lamelares (usualmente entre o segundo e o terceiro), sua posição, aqui denotada como q_{DNA} , foi determinada separadamente através de ajustes Lorentzianos (ver Eq. 2.7). Esta reflexão foi atribuída a correlações DNA-DNA no plano das membranas (Fig. 2.8(a)). A distância média entre bastões, a partir de agora denotada por a , foi determinada usando a relação $a = 2\pi/q_{DNA}$. O comprimento de correlação foi estimado por (ver Ap. B para mais detalhes):

$$\xi = \frac{2.783}{\Delta q} \quad (2.10)$$

Para simetrias retangulares 2D, as posições dos picos de Bragg são determinadas por:

$$q_{hk} = 2\pi \times \sqrt{\left(\frac{h}{a_{rect}}\right)^2 + \left(\frac{k}{b}\right)^2} \quad (2.11)$$

onde a_{rect} e b são os lados da cela unitária (Fig. 2.8(c)).

Para simetrias hexagonais 2D, os picos são previstos nas seguintes posições [126]:

$$q_{hk} = \frac{4\pi}{a_{hex}} \times \sqrt{\frac{h^2 + hk + k^2}{3}} \quad (2.12)$$

O que leva a picos nas posições relativas $1 : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{7} : \sqrt{9} : \sqrt{12} : \sqrt{13} : \sqrt{16} : \dots$. O parâmetro de rede a , correspondente ao lado da cela unitária, é então obtido a partir de:

$$a_{hex} = \frac{4\pi}{q_0\sqrt{3}} \quad (2.13)$$

Para amostras com indexação ambígua, para as quais o procedimento acima descrito não permitiu encontrar parâmetros com significado físico, os grupos cúbicos $Pn3m$ (picos nas posições relativas $\sqrt{2} : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{6} : \sqrt{8} : \sqrt{9} : \sqrt{10} \dots$) [127], $Im3m$ ($\sqrt{2} : \sqrt{4} : \sqrt{6} : \sqrt{8} : \sqrt{10} : \sqrt{12} : \sqrt{14} \dots$) [128] e $Ia3d$ ($\sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{7} : \sqrt{8} : \sqrt{10} : \sqrt{11} : \sqrt{12} \dots$) [84] foram também testados usando-se uma outra rotina em MatLab desenvolvida para este fim. Para todas as indexações, a diferença máxima tolerada entre o valor previsto pelo grupo de simetria e o valor experimentalmente encontrado foi igual à resolução instrumental.

Ajustes com o modelo de Nallet et al.

Dados de misturas binárias (lipídios/água) e ternárias (lipídios/água/DNA) também foram ajustados segundo o modelo de Nallet et al. [93]. O principal objetivo de tais análises foi avaliar o ordenamento esmétrico das fases lamelares hospedeiras, assim como os efeitos da inserção de nucleotídeos sobre o empilhamento de bicamadas. Isto foi realizado através do estudo do comportamento do parâmetro de Caillé em função da separação entre membranas. Para alcançar esse objetivo, as equações do modelo foram escritas na *toolbox Curve Fitting* do MatLab, a qual realiza minimizações usando algoritmos de Levenberg-Marquardt.

Devido à complexidade do espaço de parâmetros, o qual possui diversos mínimos locais, o processo de ajuste mostrou-se muito sensível aos valores iniciais. Para minimizar essa dificuldade, o número de parâmetros livres foi diminuído pela determinação prévia dos tamanhos das cabeças polares e das caudas carbônicas. Estes valores foram obtidos pelo ajuste da Eq. 1.23 à região de alto ângulo de amostras diluídas, na faixa de vetores de onda $0,300 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,500 \text{ \AA}^{-1}$. Conforme discutido na Sec. 1.6.1, para fases lamelares diluídas, o fator de estrutura tende rapidamente a $S(q) \rightarrow 1$, o qual resulta no predomínio do fator de forma $P(q)$ na região de alto ângulo.

Em seguida, ajustes sobre toda a faixa de q foram realizados usando-se a Eq. 1.22. Quatro parâmetros foram deixados livres para serem ajustados: o fator de escala $A_0 = \frac{8\pi}{D} \Delta\rho_H^2$, a periodicidade d , o parâmetro de Caillé η e a taxa entre os contrastes eletrônicos $\Delta\rho_T/\Delta\rho_H$. Tendo em vista que o modelo apresenta limitação na descrição da região de ângulos muito altos, a faixa de valores de q ajustados foi truncada em $q = 0,500 \text{ \AA}^{-1}$.

Este mesmo procedimento foi adotado anteriormente em contextos similares [95, 96].

As incertezas nos parâmetros foram estimadas a partir de várias repetições dos ajustes usando valores iniciais distintos que convergiam para os mesmos valores finais.

2.4 Microscopias de fluorescência e luz polarizada

As preparações também foram sistematicamente submetidas à inspeção visual. As técnicas usadas foram microscopia de luz polarizada (MOLP) e microscopia de epifluorescência. O principal objetivo destas observações foi avaliar a birrefringência óptica das amostras e obter informações acerca da uniformidade na distribuição de DNA no interior do complexo. O instrumento empregado em ambas análises foi um microscópio *Leica*, modelo *CTR Mic*. Trata-se um microscópio invertido, onde a iluminação pode ser realizada tanto por uma lâmpada de filamento quanto por uma fonte de mercúrio. Este dispositivo é bastante semelhante àquele mostrado na Fig. 2.10.

Pequenas porções de amostra foram depositadas em lâminas de vidro e rapidamente cobertas por lamínulas. Um cisalhamento cuidadoso foi realizado manualmente durante alguns segundos. As celas foram então seladas com uma cola, curada sob ultra violeta, para prevenir a evaporação do solvente. Realizando-se este procedimento, a espessura da cela ao longo do eixo do microscópio não pôde ser precisamente determinada, mas foi possível estabelecer que este valor se encontrava na faixa $5 - 15 \mu\text{m}$. O ancoramento favorecido correspondeu a bicamadas paralelas ao plano das lâminas (ou ancoramento “homeotrópico”). Em domínios homeotropicamente orientados, a direção de empilhamento das membranas foi, portanto, paralela ao eixo óptico do arranjo. O número de camadas empilhadas ao longo da altura da cela foi tipicamente da ordem de 10^3 ou mais.

Um par de polarizadores cruzados, intercalados no eixo óptico do aparelho, permitiu análises de textura. Segundo os padrões observados, foi possível obter informação acerca da anisotropia das amostras. Isto foi possível porque o padrão de birrefringência depende do tipo de simetria do sistema. Uma fase isotrópica, por exemplo, não introduz modificações no eixo de polarização da luz, e através de polarizadores cruzados, o padrão observado corresponde a uma mancha escura. Uma fase lamelar liotrópica, por exemplo, é fortemente anisotrópica e aparece como um padrão caótico, com uma textura característica alternando zonas claras e escuras entre polarizadores. Uma simetria hexagonal também modifica o eixo de polarização da luz, dando origem a uma imagem mosaica. Exemplos típicos destes três tipos de textura são apresentados na Fig. 2.9.

Estudos de fluorescência foram realizados usando-se uma lâmpada de mercúrio como fonte de luz e um par de filtros. A iluminação foi realizada na faixa do azul enquanto

Figura 2.9: Texturas ópticas típicas encontradas em microscopia de luz polarizada. As barras de escala correspondem a $100\ \mu\text{m}$ para (a) e (b) e to $20\ \mu\text{m}$ for (c).

as observações foram feitas na faixa do verde. Os comprimentos de onda recaem, respectivamente, nos espectros de excitação e emissão do YOYO. Análises em MOLP e em fluorescência foi realizadas sobre uma mesma região, o que permitiu co-localizar zonas de fluorescência com suas respectivas orientações locais.

2.5 Criofratura e microscopia eletrônica

Réplicas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram preparadas de acordo com protocolos-padrão para criofratura⁵ [129]. Dois procedimentos distintos foram seguidos para a preparação de espécimens para observações em MET: para amostras hidratadas, pequenas quantidades do complexo foram “sanduichadas” entre plaquetas de cobre enquanto que, para amostras pobres em água, elas foram acomodadas em pequenos poços montados em suportes de ouro. Em seguida, os conjuntos foram mergulhados em propano líquido resfriado à $-190\ ^\circ\text{C}$ por nitrogênio líquido. O processo de fratura e vaporização com camadas de carbono e platina foi realizado no interior de máquina Baltec BAF060, onde a atmosfera atingia $10^{-9}\ \text{bar}$ e a temperatura era de $-150\ ^\circ\text{C}$. Para amostras alojadas em suportes formando “sanduíches”, as fraturas foram obtidas simplesmente separando-se as plaquetas de cobre. No caso em que poços de ouro foram usados, as fraturas foram realizadas pela passagem de uma lâmina fria de microtomia através do espécimen congelado, preservando assim as estruturas internas da amostra. Em ambos os casos, o sistema foi replicado pelo sombreamento com um filme Pt-C, de $4\ \text{nm}$, vaporizado segundo um ângulo de 45° . Uma segunda camada de carbono, com espessura de $30\ \text{nm}$, foi finalmente depositada segundo um ângulo de 90° . As réplicas foram então montadas em grades de cobre após sua remoção dos suportes através de banhos suces-

⁵A preparação de réplicas foi realizada com a inestimável ajuda de Isabelle Ly, técnica de laboratório no CRPP.

sivos em misturas de água/etanol e clorofórmio/etanol. As observações foram realizadas em um MET, modelo Hitachi H600. A tensão de aceleração foi de 75 kV e a corrente de filamento, de 100 μ A. A magnificação variou entre 5000X e 300000X. Para a extração de informação quantitativa acerca das distâncias de padrões observados, transformadas de Fourier, usando o programa *Image J*, foram realizadas.

2.6 Experimentos de recuperação de fluorescência

As celas com as amostras foram preparadas e seladas do mesmo modo descrito na Seq. 2.4. O processo de *bleach* e o registro das imagens foram realizados no CRPP com o *microscópio confocal de varredura a laser* (MCVL), modelo Leica DMIRE, exibido na Fig. 2.10. As lentes objetivas escolhidas foram x10 ou x40, com aberturas numéricas NA 0,3 e NA 0,6, respectivamente. Para assegurar uma média azimutal satisfatória através da altura dos domínios observados, o *pinhole* foi mantido em sua abertura máxima, 600 μ m. Esta é uma característica bastante particular dos experimentos conduzidos aqui, pois, diferentemente da maioria dos estudos reportados na literatura [113–115, 130], a propriedade de confocalidade do microscópio, isto é, sua acurada resolução espacial ao longo do eixo z , não é utilizada. Em vez disso, as necessidades aqui se referem muito mais às capacidades de varredura laser de alta precisão de MCVLs, as quais permitem elevadas resoluções no plano perpendicular ao eixo óptico e *bleaches* cirúrgicos. Além disso, o sistema de detecção, baseado em fotomultiplicadoras sincronizadas com o feixe de iluminação, possibilita seguir a recuperação de fluorescência em comprimentos de onda bastante específicos, com excelentes relações sinal-ruído.

A linha 488 nm de um laser de argônio foi usada como fonte de iluminação. Este comprimento de onda é bastante próximo ao pico de excitação do YOYO, nominalmente 491 nm. A faixa de detecção foi ajustada no intervalo entre 500 nm e 600 nm, assegurando que apenas luz emitida pela amostra fosse registrada. Antes de cada *bleach*, as amostras foram também observadas sob polarizadores cruzados e uma região quadrada, com $\approx 80 \mu$ m de lado, foi selecionada dentro de uma extensa zona escura para assegurar orientação homeotrópica. Esta mesma região foi observada ainda em fluorescência para se inspecionar a homogeneidade da distribuição de DNA. Uma placa de quarto de onda foi colocada no caminho do feixe de modo que a luz que passava pelas amostras tinha polarização circular⁶.

⁶Este passo é muito importante porque, como discutido anteriormente, a intensidade de fluorescência depende da orientação dos bastões de DNA. Portanto, luz linearmente polarizada poderia induzir distorções no perfil de fluorescência de acordo com a orientação local dos fragmentos.

Figura 2.10: Microscópio confocal de varredura laser, modelo Leica DMIRE, usado nos experimentos de FRAP deste trabalho.

Os experimentos de FRAP dividiram-se em duas partes. A primeira é relacionada à etapa de *pre-bleach*. Um conjunto de 10 imagens da região de interesse foi registrada antes do pulso de *bleach*. Estas imagens foram posteriormente promediadas e uma imagem do fundo foi obtida. O segundo estágio é relacionado ao registro de imagens após o *bleach*. O número total de registros, assim como o intervalo entre imagens, dependeu fortemente da velocidade do processo de difusão. Para as amostras estudadas aqui, estes tempos situaram-se entre 5 segundos, para uma preparação diluída DNA-água, e 20 segundos, para a amostra ternária DNA-lipídios-água mais concentrada. O número total de registros situou-se respectivamente entre 20 e 80 imagens. O pulso de *bleach* foi usado na máxima potência fornecida pelo laser, estimada em algo da ordem de 50 mW sobre a amostra. O feixe de iluminação, usado para registrar imagens antes e depois do bleach, foi atenuado de um fator ≈ 20 . O estado dos principais parâmetros usados nos experimentos descritos aqui são sumarizados na Tab. 2.2.

2.6.1 Programa de análise

As análises foram realizadas usando uma rotina em MatLab desenvolvida por Jens Dobrint e melhorada por outros ⁷. O código foi baseado num programa anterior desenvol-

⁷A forma final do código usado neste trabalho recebeu melhorias de C. L. Pinto de Oliveira (Universidade de São Paulo), E. R. Teixeira da Silva, C. Alves (Universidade de São Paulo) e A. Schöppach (CRPP).

Objetiva	x10 (NA 0.3) ou x40 (NA 0.6)
Modo de varredura	xyt
Velocidade de varredura	800 Hz
λ de iluminação	488 nm
Faixa de emissão	500-600 nm
Formato (pixels)	512×512
Potência no <i>bleach</i>	Estimada em 50 mW
Diâmetro do feixe	$\approx 2.5\mu m$
Duração do <i>bleach</i>	500ms
Tamanho do <i>pinhole</i>	$600\mu m$

Tabela 2.2: Parâmetros usados nos experimentos de FRAP.

vido por S. Seiffert e colaboradores [113, 114, 131]. O tratamento é dividido da seguinte maneira:

Normalização. Neste passo, um conjunto de imagens *pre-bleach* é promediado e uma imagem de fundo é obtida. Os registros são importados pelo MatLab e estocados em matrizes de 512×512 cujas entradas são intensidades de fluorescência codificadas em valores inteiros entre 0 e 255 (8 bits). Todas as imagens tomadas após o *bleach* são divididas pela imagem de fundo para normalização.

Localização do centro e média. O centro de rotação da imagem é encontrado a partir de um algoritmo específico desenvolvido pelos autores da Ref. [113]. A imagem é então dividida em 180 intervalos angulares e os perfis de fluorescência através de secções transversais são obtidos no intervalo $[0, \pi]$. Em seguida, a média radial destes perfis é obtida (ver Figs. 2.11(a) e 2.11(b)).

Ajuste da Eq. 1.33. Na próxima etapa, a função anisotrópica modificada, Eq. 1.33, é ajustada aos dados experimentais de fluorescência. Uma vez que o tempo decorrido é conhecido, uma coleção de $w_{\parallel}^2, w_{\perp}^2$ vs. t é obtida (Fig. 2.11(c)).

Obtenção dos coeficientes de difusão. Finalmente, ajuste lineares usando as Eqs. 1.34 são realizados e, a partir da inclinação das retas, os coeficientes de difusão são extraídos.

O tratamento dos dados é sumarizado na Fig. 2.11, onde as principais etapas são esquematizadas.

(a) Localização do centro.

(b) Média angular.

(c) Ajuste do perfil.

Figura 2.11: Principais etapas do processo de análise dos dados: (a) O centro do *bleach* é encontrado. (b) Em seguida, as intensidades de fluorescência são promediadas sobre 180 setores angulares passando pelo centro – note que, para clareza, apenas 18 setores são mostrados aqui. (c) A Eq. 1.33 é ajustada aos perfis de fluorescência médios.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS ESTRUTURAIS

Neste capítulo são descritos os resultados estruturais obtidos ao longo deste trabalho. Em um primeiro momento, os esforços foram concentrados na fase hospedeira, isto é, no sistema formado por fases lamelares hidratadas. Duas composições de membrana foram avaliadas, contendo PC:Simulsol nas proporções de 70:30 e 50:50. As condições iônicas também foram moduladas através da introdução de sal monovalente no sistema. Análises quantitativas foram realizadas ajustando-se o modelo de Nallet et al. aos dados de raios X e pelo estudo do comportamento do parâmetro de Caillé em função da periodicidade. Uma abordagem proposta por Petrache et al. [132–134] foi utilizada e permitiu determinar que, para a faixa de espaçamento intermembranar de interesse para a introdução de bastões de DNA, o balanço de forças entre as membranas é governado por um equilíbrio entre forças atrativas de van der Waals e interações repulsivas de hidratação e de Helfrich.

Em uma segunda etapa, fragmentos de DNA (150 pb) foram adicionados para preparar os complexos. Séries de dados foram obtidas com as composições de membrana acima mencionadas. Para membranas com 70% de PC, três linhas de diluição foram varridas no diagrama de fases: $\rho = 3,1$, $\rho = 5,1$ e $\rho = 8,1$. Para a outra composição, apenas amostras com $\rho = 3,1$ foram preparadas. Um rico polimorfismo de mesofases, dirigido pelo confinamento, é encontrado e a completa incorporação de nucleotídeos é observada ser intimamente dependente da quantidade de DNA presente no sistema. Interações eletrostáticas parecem ter um papel secundário no comportamento de fase enquanto o aumento na proporção de Simulsol parece favorecer a formação de domínios monofásicos.

3.1 Sistema lipídios-água: a fase hospedeira

3.1.1 Membranas com proporção PC-Simulsol 70:30

As análises estruturais se iniciaram com o estudo de fases hospedeiras preparadas a partir de membranas com taxa PC-Simulsol de 70:30. Amostras foram formuladas usando-se água ultra pura como solvente e deixadas equilibrar segundo o procedimento descrito no Cap. 2. As frações volumétricas de água cobriram a faixa de $\phi_w = 0,25$ a $\phi_w = 0,75$. Os experimentos de raios X foram realizados em diferentes ocasiões, no aparelho Nanostar-Bruker e/ou na estação SWING-SOLEIL. Os principais objetivos foram avaliar o domínio de diluição do sistema e determinar o limite de hidratação assim como a espessura das membranas formadas. Além disso, outra tarefa importante foi estabelecer o estado das caudas carbônicas, fluido ou gel, para as diversas concentrações.

Alguns difratogramas selecionados destas amostras são exibidos na Fig. 3.1. Os padrões de difração, como esperado, são compostos por anéis concêntricos igualmente espaçados cujos raios dependem da quantidade de água no sistema. Esta é a assinatura clássica em raios X de fases liotrópicas lamelares, onde a distância de repetição aumenta com o grau de hidratação. Para algumas poucas amostras, as intensidades espalhadas não se distribuem homogeneamente ao longo dos anéis. Este efeito é devido à formação de domínios semi-orientados durante o processo de centrifugação para a colocação do produto dentro dos capilares.

Os dados reduzidos, $I(q)$ vs. q , a partir de todas as formulações com esta composição de membrana são exibidos nas Figs. 3.2 e 3.3.

Pilhas multilamelares de bicamadas regularmente espaçadas são encontradas em todo o domínio estudado. Na medida em que a quantidade de água aumenta, os picos de Bragg se deslocam na direção da região de pequenos ângulos numa clara indicação do inchamento da fase lipídica. Para amostras concentradas, *e.g.* $\phi_{lip} \approx 0,75$, observa-se até quatro picos finos que atestam o forte ordenamento esmétrico e o grande número de camadas correlacionadas na estrutura. Por outro lado, para amostras mais diluídas, *e.g.* $\phi_{lip} \approx 0,50$, o número de reflexões de Bragg diminui enquanto os picos se tornam mais largos, mostrando o decaimento de ordem esmétrica.

As distâncias de repetição são determinadas a partir das posições dos picos de primeira ordem usando-se a Eq. 2.9. O comportamento da periodicidade lamelar d em função do inverso da fração volumétrica de lipídios $1/\phi_{lip}$ é mostrado na Fig. 3.4. Dois regimes distintos são identificados. O primeiro é governado por uma lei de diluição usual até frações volumétricas de água $\phi_w \approx 0,60$. Neste intervalo, as periodicidades lamelares variam de ≈ 47 Å a ≈ 85 Å. Uma relação linear entre a periodicidade esmétrica e a

Figura 3.1: Padrões de difração de fases lamelares com diferentes concentrações.

hidratação, do tipo $d = \delta_m / \phi_{lip}$, é encontrada. Fazendo-se um ajuste linear sobre os dados deste domínio, determina-se a espessura das bicamadas formadas em $\delta_m = 36,5(3)$ Å.

No segundo domínio, para $1/\phi_{lip} \gtrsim 2.5$, o sistema apresenta excesso de água e as distâncias de repetição permanecem aproximadamente constantes, em torno de $92(5)$ Å. Deve ser observado que os dados usados na Fig. 3.4 foram obtidos a partir de amostras preparadas de maneira independente, submetidas a raios X em instrumentos distintos, configurados de maneiras diferentes. Portanto, a reprodutibilidade dos valores de d aponta para forte robustez dos dados.

O conhecimento de δ_m possibilita a determinação do tamanho dos canais aquosos $d_w = d - \delta_m$. Este parâmetro é muito importante no que diz respeito aos complexos ternários porque ele permite estabelecer o espaço disponível para os nucleotídeos no interior da fase hospedeira. Por outro lado, é também conveniente conhecer o espaçamento intermembranar em função da fração volumétrica de lipídios, pois isso possibilita a comparação entre formulações binárias e ternárias com ϕ_{lip} equivalentes. Na Fig. 3.5, é apresentado o comportamento da separação entre membranas em função da fração de lipídios. Linhas

Figura 3.2: Curvas de SAXS de misturas binárias lipídios/água, obtidas no Nanostar-Bruker.

tracejadas indicam o limite de diluição e o tamanho do DNA abaixo do qual as espessuras dos canais aquosos não são suficientes para acomodar bastões com diâmetro = 20 Å. É observado que o sistema é capaz de incorporar nucleotídeos entre lamelas quando a fração volumétrica de lipídios varia entre $\phi_{lip} \approx 0,35$ e $\phi_{lip} \approx 0,64$.

Para investigar o estado das caudas carbônicas, e trazer informações acerca da fluidez das membranas, experimentos de difração foram realizados na região de altos valores de q . Os resultados destes ensaios são exibidos na Fig. 3.6. A presença sistemática de um pico difuso na região WAXS evidencia o estado fluido das membranas ao longo de todo o domínio de diluição. Ajustando-se estas reflexões com funções Gaussianas (linhas vermelhas sólidas na primeira coluna da Fig. 3.6), a posição deste pico é determinada em torno de $q = 1,38 \text{ Å}^{-1}$ com $\Delta q = 0,50 \text{ Å}^{-1}$. Estes valores correspondem a uma distância média entre caudas carbônicas igual a 4,5 Å com um comprimento de correlação $\xi \approx 12,5 \text{ Å}$ (ou cerca de três moléculas). Na Fig. 3.7, é exibido um difratograma 2D de uma amostra

Figura 3.3: Curvas $I(q)$ vs. q de misturas lipídios/água obtidas no (a) Nanostar-Bruker e (b) na linha SWING-SOLEIL. Para amostras concentradas é possível observar até quatro reflexões de Bragg. Ordens superiores desaparecem com o aumento de hidratação.

onde o processo de carga no capilar induziu a formação de domínios semi-orientados. As intensidades no anel externo são concentradas ao longo do eixo vertical, ao passo que, nos anéis internos, essa concentração ocorre ao longo da direção vertical. Como discutido acima, os círculos na região de baixo ângulo são oriundos da difração pela estrutura em mesoescala, ou seja, pelos planos das bicamadas. Por outro lado, o anel na região de alto ângulo é fruto da difração pelas caudas carbônicas, perpendiculares em média às membranas.

Paralelamente às análises de raios X, foram realizadas observações sob microscopia de luz polarizada. Texturas lamelares foram encontradas para a maioria das amostras (Fig.3.8) com padrões caóticos de birrefringência sendo observados para composições com $\phi_{lip} > 0,42$. Nas formulações contendo grandes quantidades de água, gotículas de água (opticamente isotrópicas) aparecem ao redor de vesículas lipídicas (*e.g.* Fig.3.8(e)). Estas constatações estão em bom acordo com os dados obtidos a partir de raios X, uma vez que texturas lamelares são observadas para amostras pertencentes ao domínio governado pela lei de diluição, enquanto que a coalescência de gotículas aparece em formulações acima

Figura 3.4: Comportamento da periodicidade lamelar d em função de Behavior of the lamellar periodicity d em função de $1/\phi_{lip}$. Dois domínios são identificados: o primeiro é governado por uma lei de diluição usual, com $\delta_m = 36,5(3) \text{ \AA}$. O segundo domínio é caracterizado por excesso de água, com $D_{max} = 92(5) \text{ \AA}$. Os pretos correspondem às curvas exibidas na Fig. 3.2, $\triangle$ azuis correspondem aos dados mostrados na Fig. 3.3(a) e $\square$ rosas, aos dados mostrados na Fig. 3.3(b).

Figura 3.5: Comportamento da distância de separação entre membranas em função da fração volumétrica de lipídios. A região indicada por setas corresponde a distâncias para as quais a fase hospedeira é capaz de incorporar nucleotídeos.

Figura 3.6: Perfis $I(q)$ vs. q de misturas lipídios/água, observados na região de alto ângulo. A presença de um pico difuso em torno de $q = 1,38 \text{ \AA}^{-1}$ (setas pretas) foi encontrada em todas as formulações, apontando o estado L_α das membranas em todo o domínio de diluição. Para amostras muito hidratadas, $\phi_{wt} < 0,50$, o pico associado às moléculas de água, em torno de $q = 1,9 \text{ \AA}^{-1}$ (setas vermelhas), torna-se significativo.

do limite de hidratação.

Observações em microscopia eletrônica à transmissão também foram realizadas para complementar os dados de raios X com visualização de espaço direto. Algumas formulações foram selecionadas e replicadas segundo o procedimento apresentado na Seção 2.5. Cinco composições foram escolhidas para criofatura. Dentro do domínio de diluição, as formulações com $\phi_{lip} = 0,752$, $\phi_{lip} = 0,604$, $\phi_{lip} = 0,500$ e $\phi_{lip} = 0,449$ foram analisadas. A composição com $\phi_{lip} = 0,290$ foi tomada como representante do domínio acima do limite de hidratação.

Imagens de baixa-magnificação destas réplicas são exibidas nas Figs. 3.9-3.11. A topologia de larga escala pode ser então visualizada e algumas vesículas, incrustadas numa matriz lipídica coloidal, são observadas em toda a faixa de hidratação. A frequência e o tamanho destas estruturas dependem da concentração. Para amostras ricas em lipí-

Figura 3.7: Difratograma de uma fase lamelar com $\phi_{lip} \approx 0,30$ mostrando simultaneamente as regiões de SAXS e WAXS. A distribuição das intensidades espalhadas, indicadas por setas vermelhas e verdes, mostra a perpendicularidade entre as estruturas correspondentes também no espaço direto.

dios, *e.g.* $\phi_{lip} = 0,752$, as vesículas observadas são maiores em tamanho e mais raras em frequência. Por outro lado, para amostras diluídas, *e.g.* $\phi_{lip} = 0,290$, o número de vesículas aumenta significativamente enquanto o tamanho médio diminui. Uma possível razão para isso é o decaimento do ordenamento esmétrico com a hidratação. Como mencionado na Seq. 1.6.1, menor a distância entre membranas, menor a amplitude das flutuações. Portanto, flutuações térmicas mais baixas, juntamente com um grande número camadas correlacionadas, favoreceriam o surgimento de mais estruturas estáveis, permitindo a coalescência de vesículas grandes. Por outro lado, para membranas onde as flutuações são intensas, não há estabilidade suficiente para manter estruturas grandes auto-organizadas, o que levaria a vesículas menores e mais numerosas.

Na Fig. 3.12, as réplicas são exibidas em maior detalhe. As fraturas ocorreram de forma paralela aos planos das membranas. Terraços extensos, livres de defeitos, podem ser visualizados fornecendo imagens espetaculares de estruturas em camadas. Para amostras muito concentradas, Fig. 3.12(a), centenas de camadas correlacionadas são observadas. Por outro lado, para formulações mais diluídas, apenas algumas camadas aparecem corre-

Figura 3.8: Imagens de MOLP de misturas lipídios/água com proporção PC-Simulsol 70:30.

lacionadas. Além disso, também é possível visualizar corrugações nas bordas das fraturas (ver Fig. 3.12(c)). Estas constatações são consistentes com observações em raios X, para as quais é encontrado um alargamento dos picos de Bragg (portanto, maior desordem) em amostras mais hidratadas.

Na Fig. 3.13, imagens de alta magnificação mostram fraturas perpendiculares às la-

(a) $\phi_{lip} = 0,752$ (b) $\phi_{lip} = 0,604$

Figura 3.9: Réplicas de amostras concentradas observadas a magnificações de $25000\times$ e $30000\times$.

(a) $\phi_{lip} = 0,500$ (b) $\phi_{lip} = 0,449$

Figura 3.10: Réplicas a partir de amostras do meio do domínio de diluição observadas à magnificação de $10000\times$.

melas. As imagens foram obtidas sobre amostra com $\phi_{lip} = 0,752$. Novamente, centenas de lamelas são observadas assim como o alto grau de ordem. Em 3.13(a), é possível visua-

Figura 3.11: Réplica da amostra representativa do domínio com excesso de água, $\phi_{lip} = 0.290$, observada à magnificação de $17000\times$.

lizar deslocamentos e desclinações, indicadas por setas vermelhas, defeitos típicos em cristais líquidos esméticos A [28]. Análise de imagem através de uma transformada de Fourier (detalhe em 3.13(b)) revela forte anisotropia unidimensional, com periodicidade lamelar igual a $50 \text{ \AA}$, em excelente acordo com medidas de raios X, $d = 49 \text{ \AA}$.

(a) $\phi_{lip} = 0,752$ (b) $\phi_{lip} = 0,604$ (c) $\phi_{lip} = 0,500$ (d) $\phi_{lip} = 0,449$

Figura 3.12: Réplicas de MET de misturas binárias lipídios/água, observadas com aumento de $20000\times$ e $100000\times$. O surgimento de terraços extensos, sem defeitos, atesta visualmente o comportamento lamelar da fase hospedeira. Deve-se observar a grande diferença no ordenamento esmétrico entre amostras concentradas e diluídas.

(a)

(b)

Figura 3.13: Fraturas perpendiculares de lamelas para amostra com $\phi_{lip} = 0,752$. (a) Setas indicam deslocamentos e desclinações, defeitos típicos de cristais líquidos esméticos A. (b) Análise de imagem, por transformada de Fourier, revela forte anisotropia 1-D com distância de repetição $d = 50 \text{ \AA}$, em excelente acordo com $49 \text{ \AA}$ medido a partir de raios X.

Efeitos da adição de sal

Duas series de amostras foram preparadas usando soluções salinas e água ultra pura como solvente. O sal usado nas soluções salinas foi o acetato de amônio, à concentração de 0,25M. O comportamento de periodicidades lamelares resultante, em função do inverso da fração volumétrica de lipídios, é mostrado na Fig.3.14. Não são percebidas diferenças entre as formulações com e sem sal.

Novamente, dois domínios são encontrados. O primeiro deles é claramente governado por uma lei de diluição usual, cuja análise aponta que a espessura das membranas formadas é $\delta_m = 36,0(3) \text{ \AA}$ e o limite de diluição é $D_{max} = 89,3(6,5) \text{ \AA}$. Estes resultados são bastante próximos daqueles encontrados anteriormente.

Figura 3.14: Periodicidade lamelar em função de $1/\phi_{lip}$ para amostras com e sem sal. As linhas retas correspondem a um ajuste linear com inclinação $\delta_m = 36.0(3) \text{ \AA}$ e um limite de diluição $D_{max} = 89.3(6.5) \text{ \AA}$.

O estudo das posições de Bragg é útil para obter-se informações sobre as propriedades de diluição das fases lamelares assim como determinar a espessura das membranas e o limite de diluição do sistema. Porém, uma análise mais detalhada do espalhamento difuso, isto é, das intensidades situadas foram dos máximos de Bragg, também revela outras características interessantes tanto em escala molecular quanto em escala supramolecular. Entre as variáveis relevantes para os estudos conduzidos aqui, pode-se destacar o ordenamento esmétrico dado pelo parâmetro de Caillé. Este parâmetro está convoluído no fator de estrutura das curvas de espalhamento de raios X. O modelo de Nallet et al., apresentado na Seq. 1.6.1, é uma ferramenta adequada que permite abordar esse tipo de

investigação. Tal procedimento, combinado com outros esquemas teóricos disponíveis na literatura [17, 132], traz valiosas informações acerca das forças intermoleculares envolvidas na estabilização da fase hospedeira sendo, portanto, um primeiro passo para tratar a questão dos mecanismos implicados na complexação entre DNA e fases lipídicas neutras. Para avaliar quaisquer modificações introduzidas por atenuações de interações eletrostáticas, curvas obtidas a partir de preparações contendo sal também foram ajustadas com esse modelo.

Pelas razões detalhadas na Seq. 2.3.3, a análise foi iniciada com o ajuste do fator de forma $P(q)$, somente, à região de grandes valores de vetor de onda ($q > 0,20 \text{ \AA}^{-1}$) de uma amostra diluída. Os ajustes foram realizados com quatro parâmetros: um fator de escala, $A_0 = \frac{8\pi}{d} \Delta\rho_H^2$, o comprimento dos grupos polares, δ_H , o comprimento das caudas carbônicas, δ_T , e a razão entre os contrastes eletrônicos de cabeças e caudas, $\Delta\rho_T/\Delta\rho_H$. Para se levar em conta efeitos de fundo que podem permanecer mesmo após as correções de solvente e de capilar vazio, um polinômio de segunda ordem da forma $BG + BG1 \times q + BG2 \times q^2$ foi adicionado à $P(q)$. Visto que $S(q) \rightarrow 1$ para $q \gg q_0$, assumiu-se que o fator de estrutura alcança seu valor assintótico quando $q > 0,20 \text{ \AA}^{-1}$. As curvas resultantes são apresentadas, lado a lado, para as formulações com e sem sal na Fig. 3.15.

Figura 3.15: Amostras diluídas, ambas com $\phi_{lip} = 0,251$, ajustadas apenas com o fator de forma $P(q)$ (Eq. 1.23). Os parâmetros ajustados são o comprimento dos grupos polares, δ_H , o comprimento das caudas alifáticas, δ_T , e a razão entre os contrastes eletrônicos de caudas e cabeças, respectivamente.

Não foram observadas diferenças apreciáveis entre preparações contendo sal e sem

sal. Os comprimentos dos grupos polares e das caudas hidrofóbicas são, respectivamente, $\delta_H \approx 9,5 \text{ \AA}$ e $\delta_T \approx 13,0 \text{ \AA}$ para ambos os casos, com desvios bastante pequenos entre si. A razão entre contrastes eletrônicos, $\Delta\rho_T/\Delta\rho_H$, apresenta uma variação mais robusta com a adição de sal, o que presumivelmente resulta da presença de íons nos canais aquosos. No entanto, mesmo estas diferenças permanecem dentro da faixa de incertezas do ajuste.

Em seguida, estes parâmetros obtidos δ_H , δ_T e $\Delta\rho_T/\Delta\rho_H$ foram usados como valores iniciais para ajustes de espectro completo, incluindo o fator de estrutura $S(q)$. Uma vez que não são esperadas variações significativas nos comprimentos de grupos polares e de caudas alifáticas com a variação do grau de hidratação, δ_H e δ_T foram limitados a uma faixa de $\pm 1 \text{ \AA}$ em torno dos valores exibidos na Fig. 3.15. Por outro lado, variações apreciáveis nos contrastes eletrônicos podem ocorrer para diferentes diluições por causa de modificações na concentração de lipídios. Então, o parâmetro $\Delta\rho_T/\Delta\rho_H$ foi mantido livre, notando-se apenas que ele deveria ser necessariamente negativo. A constante de escala, A_0 também foi mantida livre para contemplar as variações na periodicidade lamelar e em $\Delta\rho_H$. Para estimar o número de camadas correlacionadas, os seguintes valores de N foram sistematicamente testados: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75 e 100.

Os parâmetros obtidos são sumarizados na Tab. 3.1. As curvas resultantes dos ajustes sobre toda a faixa de valores de q são exibidos nas Figs. 3.16–3.18. Novamente, não são observadas diferenças significativas entre preparações contendo sal ou não. Este comportamento aponta para o fato de que interações eletrostáticas diretas não desempenham um papel significativo na estabilização das fases lamelares, em acordo com as expectativas para complexos inteiramente baseados em lipídios neutros.

A espessura das bicamadas, extraída a partir da média de $2(\delta_H + \delta_T)$ na Tab. 3.1, é determinada em $\delta'_m = 44,9(7) \text{ \AA}$. Este valor é $\approx 25\%$ maior que a espessura “geométrica” obtida anteriormente a partir da lei de diluição, $\delta_m = 36,5(3) \text{ \AA}$. Esta discrepância aparece frequentemente em fases lamelares, especialmente quando no estado fluido (quando as moléculas oscilam ao longo da direção z), pois existem várias definições de espessura de membranas [134]. O valor de δ_m derivado anteriormente é a chamada *espessura de Luzzati*, a qual é relevante para a determinação da quantidade de água entre lamelas [135]. Por outro lado, o valor de δ'_m , extraído dos perfis de densidade eletrônica, corresponde à *espessura estérica* e é definido como a máxima distância entre dois grupos polares em monocamadas opostas de uma membrana. Discussões cuidadosas acerca de tais definições foram conduzidas por McIntosh [136] e Nagle e Tristram-Nagle [135]. Em todo o caso, ambas as espessuras encontradas aqui, tanto a estérica quanto a de Luzzati, estão em bom acordo com valores reportados na literatura para membranas completamente hidratadas

formadas a partir de lecitinas [134, 137, 138].

Tabela 3.1: Parâmetros obtidos a partir de ajustes com o modelo de Nallet et al. para os dados de raios X mostrados nas Figs. 3.16-3.18. As formulações marcadas com um * correspondem a amostras contendo sal.

ϕ_{lip}	d [Å]	δ_H [Å]	δ_T [Å]	$-\Delta\rho_H/\Delta\rho_T$	N	η
0,799	47,0(1)	10,2(1)	12,4(2)	-0,25(5)	100	0,02(1)
0,800*	45,7(1)	9,8(1)	13,7(2)	-0,42(5)	100	0,05(1)
0,694	50,5(1)	10,5(1)	12,8(2)	-0,22(5)	50	0,06(1)
0,703*	50,8(1)	10,0(1)	11,5(2)	-0,32(5)	60	0,03(1)
0,602	58,2(1)	9,4(1)	13,1(2)	-0,33(5)	10	0,18(2)
0,604*	61,4(1)	9,3(1)	13,2(2)	-0,31(5)	12	0,13(2)
0,550	66,1(1)	9,7(1)	12,2(2)	-0,39(5)	15	0,13(2)
0,551*	63,7(1)	9,4(1)	12,9(2)	-0,36(5)	12	0,12(2)
0,502	74,3(1)	9,7(1)	13,0(2)	-0,39(5)	12	0,14(2)
0,503*	73,2(1)	9,6(1)	13,3(2)	-0,39(5)	12	0,14(2)
0,452	77,7(1)	9,9(1)	11,6(2)	-0,37(5)	10	0,28(3)
0,447*	77,7(1)	9,6(1)	13,4(2)	-0,38(5)	5	0,18(2)
0,399	84,1(1)	9,8(1)	12,4(2)	-0,41(5)	10	0,22(2)
0,399*	77,4(1)	9,9(1)	12,9(2)	-0,39(5)	6	0,14(2)
0,353	89,1(1)	9,9(1)	12,4(2)	-0,42(5)	5	0,28(3)
0,350*	89,4(1)	9,8(1)	12,5(2)	-0,41(5)	5	0,25(3)
0,303	90,5(1)	10,0(1)	12,1(2)	-0,44(5)	5	0,30(3)
0,295*	91,1(1)	9,8(1)	12,6(2)	-0,41(5)	3	0,29(3)
0,251	99,8(1)	9,8(1)	12,4(2)	-0,43(5)	3	0,54(5)
0,251*	93,0(1)	9,8(1)	12,6(2)	-0,41(5)	3	0,36(5)

O parâmetro de Caillé em função da periodicidade esmética é apresentado na Fig. 3.19. A grande similaridade entre as duas séries (com e sem sal) é imediatamente percebida. Como discutido acima, η é um índice de ordenamento das fases lamelares e seu comportamento com o espaçamento intermembranar é bem descrito com base na origem das interações repulsivas que impedem a colapso da estrutura pelas forças de van der Waals. Quando estas interações são de origem eletrostática, η é dado por [34, 94]:

$$\eta_{elec} = \sqrt{\frac{\pi k_B T L_B (d - \delta_m)^3}{2\kappa d^4}} \quad (3.1)$$

onde L_B é o comprimento de Bjerrum do solvente ($\approx 7\text{\AA}$ para a água) e κ , a constante

de rigidez das membranas.

Quando o sistema é dominado por mecanismos entrópicos de forças estéricas de ondulação, η segue a predição universal de Helfrich [42, 49, 92]:

$$\eta_{helf} = 1,33 \left(1 - \frac{\delta_m}{d}\right)^2 \quad (3.2)$$

As linhas sólidas na Fig. 3.19 correspondem a previsões das Eqs. 3.1 e 3.2. Para a previsão eletrostática, o parâmetro correspondente à rigidez das membranas, κ , foi deixado livre para ser ajustado.

Ambos os modelos falham na descrição adequada dos dados. A incapacidade de uma teoria baseada em repulsões eletrostáticas para dar conta do comportamento de membranas zwitteriônicas é previsível posto que não existem repulsões eletrostáticas *fortes* entre os grupos polares [49]. Além disso, o valor ajustado de $\kappa = 0,36(12) k_B T$ é extremamente baixo, cerca de duas ordens de magnitude menores que valores típicos encontrados para lipídios similares na literatura [138, 139].

Por outro lado, forças de ondulação estão presumivelmente envolvidas no mecanismo de estabilização de fases lamelares liotrópicas formadas de membranas flexíveis [135]. Portanto, desde que a Eq. 3.2 não é capaz de descrever os dados, a interação repulsiva entre bicamadas adjacentes não pode ser entendida em termos de uma interação simples. Neste caso, buscou-se aqui um mecanismo híbrido, combinando forças de hidratação e forças estéricas conjuntamente.

Uma abordagem proposta por Petrache et al. [132] tem provido um tal modelo híbrido e tem sido extensivamente usada por vários grupos [140–142]. Aqui, essa abordagem será apenas parcialmente desenvolvida porque, do ponto de vista deste manuscrito, o interesse é evidenciar que as interações intermembranares são governadas por uma mistura de forças de ondulação e hidratação. A determinação de parâmetros elásticos da fase, constantes de escala, etc., encontra-se além do escopo deste trabalho.

Segundo a proposição de Petrache, o parâmetro de Caillé pode ser expresso em termos da *amplitude quadrática média das flutuações*, σ^2 , através da relação:

$$\sigma^2 = \eta \frac{d^2}{\pi^2} \quad (3.3)$$

Ainda de acordo com essa abordagem, quando forças de hidratação aparecem no sistema juntamente com interações de ondulações, a energia livre associada às flutuações é dada por [132, 133]:

$$F_{fl} = \left(\frac{k_B T}{2\pi}\right)^2 \frac{1}{\kappa} A_{fl} \exp\left(-\frac{d'_w}{\lambda_{fl}}\right) \quad (3.4)$$

onde λ_{fl} é o comprimento de alcance da interação e A_{fl} é o inverso da amplitude quadrada das ondulações. O espaçamento entre membranas, d'_w , é obtido subtraindo-se a espessura estérica, δ'_m , da periodicidade esmética.

Por outro lado, também é possível conectar a energia livre de flutuações a σ^2 :

$$F_{fl} = \left(\frac{k_B T}{2\pi} \right)^2 \frac{1}{K_c} \sigma^{-2} \quad (3.5)$$

Comparando-se as Eqs. 3.4 e 3.5, é fácil obter-se uma relação direta para σ^{-2} em função de (d'_w) :

$$\sigma^{-2}(d'_w) = A_{fl} \exp \left(-\frac{d'_w}{\lambda_{fl}} \right) \quad (3.6)$$

A curva de σ^{-2} vs. d'_w é apresentada na Fig. 3.20 em escala logarítmica. Exceto para pequenas separações entre membranas, $d'_w \lesssim 13 \text{ \AA}$, σ^{-2} se comporta segundo uma lei de decaimento exponencial, em acordo com a previsão derivada acima. A linha sólida corresponde ao ajuste de 3.6 aos dados com os seguintes parâmetros encontrados: $\lambda_{fl} = 16,3(1,2) \text{ \AA}$ e $A_{fl} = 0,06(1) \text{ \AA}^{-2}$. Este resultado para λ_{fl} é cerca de três vezes superior aos valores usualmente encontrados na literatura para DMPC, EPC, DPPC e DOPC puros [132–134, 139]. Por sua vez, o valor de A_{fl} é uma ordem de grandeza menor que os valores típicos. Tais diferenças são consistentes com a adição de Simulsol a membranas de lecitina de soja, sugerindo que a introdução de ácidos graxos etoxilados amolece as bicamadas formadas e aumenta a faixa de alcance das forças de flutuações.

Figura 3.16: Curvas de espalhamento de raios X e fatores de estrutura (detalhes) de fases L_α ajustadas com o modelo de Nallet et al.

Figura 3.17: Curvas de espalhamento de raios X e fatores de estrutura (detalhes) de fases L_α ajustadas com o modelo de Nallet et al.

Figura 3.18: Curvas de espalhamento de raios X e fatores de estrutura (detalhes) de fases L_α ajustadas com o modelo de Nallet et al.

Figura 3.19: Comportamento de η para ambas as séries. A universalidade do ordenamento esmétrico é clara mesmo com variações significativas das condições iônicas. Linhas pontilhadas e tracejadas correspondem às previsões de Helfrich e ao modelo eletrostático, ver Eqs. 3.2 e 3.1. Para o modelo eletrostático, a constante de rigidez ajustada, κ , é determinada em $0,36(12) k_B T$, valor muito baixo quando comparado com sistemas semelhantes.

Figura 3.20: Curva de σ^{-2} em função da separação entre membranas, definida como $d'_w = d - \delta'_m$. A linha sólida é o ajuste da Eq. 3.6 aos dados com os seguintes parâmetros: $\lambda_{fl} = 16,3(1,2)$ Å e $A_{fl} = 0,06(1)$ Å⁻².

3.1.2 Membranas com proporção PC-Simulsol 50:50

A adição de ácidos graxos etoxilados à lecitina presumivelmente muda as propriedades elásticas das membranas formadas [64,86]. Para verificar esses efeitos, uma segunda composição de membranas, preparadas a partir de uma mistura de PC e Simulsol em proporção de 50:50, foi investigada. As amostras foram preparadas com concentrações de lipídios variando de $\phi_{lip} = 0,159$ a $\phi_{lip} = 0,797$. Para avaliar o papel da força iônica também neste caso, algumas formulações foram hidratadas com soluções de acetato de amônia, do mesmo modo como procedido nos estudos conduzidos na Seq. 3.1.1. O comportamento da periodicidade lamelar em função do inverso da fração volumétrica de lipídios é mostrado na Fig. 3.21.

Figura 3.21: Periodicidade lamelar em função de $1/\phi_{lip}$ para membranas com razão PC-Simulsol 50:50. A linha vermelha pontilhada é um guia para os olhos representando uma fronteira aproximativa do regime governado por uma lei de diluição usual. A linha sólida é um ajuste linear que fornece $\delta_m = 38,4(6)$ Å.

Semelhantemente ao comportamento observado na composição de membrana anterior, não existem diferenças perceptíveis entre amostras contendo sal ou não. Novamente, dois regimes distintos podem ser identificados em função do grau de hidratação: o primeiro, com distâncias de repetição variando de $d \approx 45$ Å até $d \approx 80$ Å, é governado por uma lei de diluição usual. A inclinação dos dados neste domínio leva ao valor de $\delta_m = 38,4(6)$ Å para a espessura de membranas. Deve ser notado que este valor é cerca de ≈ 2 Å maior que aquele encontrado para membranas com proporção 70:30. Uma possível razão para isto é o aumento da proporção de surfactantes contendo 18 carbonos em suas caudas, o que

provavelmente dá origem a uma expansão do núcleo hidrofóbico das bicamadas. Por outro lado, o segundo regime, encontrado para $d > 80 \text{ \AA}$, difere do comportamento observado anteriormente. Aqui, as periodicidades esmécticas não atingem um valor de saturação e o limite de diluição não pode ser claramente estabelecido.

Observações complementares com microscopia de luz polarizada revelam a presença de gotículas de solvente quando a fração volumétrica de lipídios é inferior a 0,480. Para amostras acima desta concentração, o padrão de birrefringência clássico de texturas lamelares aparece. Imagens selecionadas de MOLP sobre essas fases são exibidas na Fig. 3.22, onde as diferenças de textura entre amostras dos dois domínios são postas em evidência.

Figura 3.22: Imagens de MOLP feitas a partir de misturas lipídios/água com membranas contendo PC e Simulsol em uma taxa de 50:50. Amostras do primeiro domínio, $\phi_{lip} \gtrsim 0,50$, apresentam texturas birrefringentes, enquanto no segundo domínio aparecem gotículas de solvente.

Análises usando o modelo de Nallet et al. também foram realizadas para esta composição de lamelas. O primeiro passo consistiu no ajuste do fator de forma $P(q)$ à região de alto ângulo de uma amostra diluída. Na Fig. 3.23, as curvas resultantes deste procedimento preliminar são exibidas. Comparando estes resultados àqueles obtidos para a outra composição, vide Fig. 3.15, apenas pequenas diferenças são notadas para δ_H , δ_T e $\Delta\rho_T/\Delta\rho_H$.

Os parâmetros obtidos para a região de alto ângulo foram usados como valores iniciais para os ajustes sobre o espectro completo de q , quando então foi incluído nos ajustes o fator de estrutura $S(q)$. Os valores obtidos para d , δ_H , δ_T , $\Delta\rho_H/\Delta\rho_T$, N e η são resumidos na Tab. 3.2. As curvas dos dados, juntamente com os respectivos ajustes, são mostradas nas Figs. 3.24 e 3.25¹.

¹Os ajustes exibidos nas Figs. 3.24 e 3.25 foram realizados com a inestimável ajuda de Bárbara B. Gerbelli, estudante de mestrado do IFUSP.

Figura 3.23: Amostras diluídas preparadas com lamelas contendo 50:50 (PC:Simulsol). As linhas vermelhas são ajustes com o fator de forma $P(q)$, Eq. 1.23.

A comparação entre os parâmetros apresentados na Tab. 3.2 e aqueles mostrados na Tab. 3.1 aponta apenas pequenas diferenças entre dados das duas composições. A razão entre os contrastes eletrônicos, por exemplo, permanece em torno de $-0,35$. A espessura estérica média, obtida a partir de $2(\delta_H + \delta_T)$, é determinada em $\delta'_m = 44,1(4)$ Å, em bom acordo com o valor anteriormente encontrado. Uma exceção significativa fica por conta dos parâmetros de Caillé na região diluída: para periodicidades acima de ≈ 87 Å, nota-se um repentino aumento de η , que leva ao quase desaparecimento do fator de estrutura, como observado nas Figs. 3.25(g) e 3.25(h). O comportamento de η em função da periodicidade lamelar é apresentado na Fig. 3.26.

As linhas em 3.26 são ajustes segundo as Eqs. 3.1 e 3.2. De modo semelhante ao comportamento observado na Fig. 3.19, ambos os modelos, o eletrostático e o de Helfrich, falham na descrição dos dados. Realizando-se a análise no contexto da abordagem de Petrache apresentada na Sec. 3.1.1, obtém o comportamento de σ^{-2} vs. d'_w exibido na Fig. 3.27.

Diferentemente do comportamento das membranas contendo 70% de lecitinas, aqui σ^{-2} não segue uma lei de decaimento exponencial ao longo de toda a faixa de separações intermembranares (linha preta pontilhada). A Eq. 3.6 é capaz de ajustar os dados apenas na faixa de d'_w situada entre ≈ 15 Å e ≈ 40 Å (linha vermelha sólida). Estas constatações concordam com a mudança na inclinação da linha de diluição, Fig. 3.21, o que é um sinal de que as membranas são afetadas pela introdução de Simulsol.

Os parâmetros resultantes do ajuste de Eq. 3.6 são $\lambda_{fl} = 16,9(1,3)$ Å e $A_{fl} = 0,07(1)$ Å $^{-2}$, muito próximos dos valores obtidos para bicamadas com 70:30 (PC:Simulsol).

Tabela 3.2: Parâmetros obtidos a partir de ajuste com o modelo de Nallet et al. sobre dados de raios X de fases lamelares preparadas com membranas contendo 50:50 (PC:Simulsol). Amostras contendo sal aparecem marcadas com um *. Quando um — aparece, significa que a respectiva curva foi ajustada apenas com o fator de forma, Eq. 1.23.

ϕ_{lip}	d [Å]	δ_H [Å]	δ_T [Å]	$-\Delta\rho_H/\Delta\rho_T$	N	η
0,797	47,7(2)	10,0(2)	10,5(3)	-0,20(5)	100	0,03(3)
0,780*	47,7(2)	10,0(2)	9,7(3)	-0,20(5)	100	0,03(3)
0,652*	60,5(2)	9,0(2)	13,4(3)	-0,29(5)	35	0,12(3)
0,635	62,7(2)	9,0(2)	12,4(3)	-0,39(5)	75	0,14(3)
0,613*	63,9(2)	9,3(2)	13,3(3)	-0,33(5)	35	0,10(3)
0,585	66,(2)	9,3(2)	12,8(3)	-0,32(5)	75	0,11(3)
0,554*	70,0(2)	9,2(2)	13,0(3)	-0,33(5)	30	0,11(3)
0,507	73,(2)	9,2(2)	12,9(3)	-0,35(5)	75	0,15(3)
0,480*	77,7(2)	9,4(2)	12,6(3)	-0,38(5)	30	0,17(3)
0,437	79,2(2)	9,2(2)	13,2(3)	-0,37(5)	15	0,19(3)
0,414*	83,6(2)	9,7(2)	11,8(3)	-0,40(5)	30	0,23(4)
0,362	86,8(2)	9,4(2)	13,6(3)	-0,43(5)	15	0,31(4)
0,326*	93,3(3)	9,2(2)	13,1(3)	-0,39(5)	25	0,62(5)
0,283	96,8(3)	9,2(2)	13,9(3)	-0,41(5)	3	0,62(5)
0,261*	—	9,3(2)	12,9(3)	-0,40(5)	—	—
0,210	—	9,0(2)	13,9(3)	-0,40(5)	—	—
0,159*	—	9,3(2)	12,9(3)	-0,41(5)	—	—

O estado das caudas carbônicas destas membranas também foi inspecionado por WAXS. O pico difuso, correspondendo à assinatura clássica do estado fluido das cadeias, foi encontrado em todas as composições de modo semelhante ao observado anteriormente (ver Fig. 3.6).

Figura 3.24: Curvas de raios X, com os respectivos fatores de estrutura (inserções), ajustadas com o modelo de Nallet et al.

(a) Solução salina, $\phi_{lip} = 0,480$ (b) Água pura, $\phi_{lip} = 0,437$ (c) Solução salina, $\phi_{lip} = 0,414$ (d) Água pura, $\phi_{lip} = 0,362$ (e) Solução salina, $\phi_{lip} = 0,326$ (f) Água pura, $\phi_{lip} = 0,283$ (g) Solução salina, $\phi_{lip} = 0,261$ (h) Solução salina, $\phi_{lip} = 0,159$

Figura 3.25: Curvas de raios X com os fatores de estrutura (inserções) de fases L_α ajustadas com o modelo de Nallet et al.

Figura 3.26: Comportamento de η para séries com e sem sal. Linhas pontilhadas e tracejadas correspondem às previsões de Helfrich e eletrostática (vide Eqs. 3.2 e 3.1). Para o modelo eletrostático, a constante de rigidez ajustada, κ , é determinada em $0,26(10) k_B T$.

Figura 3.27: Curva de σ^{-2} em função de d'_w , para membranas com 50 : 50 (PC:Simulsol). A linha sólida vermelha é o ajuste da Eq. 3.6 à região linear dos dados entre $d'_w \approx 15$ Å e $d'_w \approx 40$ Å. A linha vermelha pontilhada é uma extrapolação do ajuste linear. Os parâmetros obtidos são $\lambda_{fl} = 16,9(1,3)$ Å e $A_{fl} = 0,07(1)$ Å⁻². A linha preta pontilhada é o ajuste da Eq. 3.6 à toda a faixa de d'_w .

3.1.3 Discussões

Dos resultados acima descritos, pode-se concluir que as fases hospedeiras usadas neste trabalho se auto-organizam em arranjos esméticos de membranas empilhadas, através de um largo domínio de diluição. Para ambas as composições de bicamadas, é possível obter-se espaçamentos intermembranares superiores a 20 Å, a separação mínima necessária para a introdução de fragmentos de DNA. Além disso, é também observado que o comportamento de diluição segue a relação linear clássica entre d e $1/\phi_{lip}$, pelo menos dentro de uma certa faixa do domínio de diluição. Portanto, controlando-se a concentração de lípidos da fase hospedeira, pode-se controlar o confinamento exercido pela matriz lamelar sobre as partículas inseridas nos canais aquosos.

O limite de hidratação é encontrado em torno de 92 Å, para membranas com 70:30 (PC:Simulsol) enquanto, para a outra composição mais rica em Simulsol, este limite não pode ser determinado com precisão. Este achado evidencia as mudanças introduzidas pela adição de ácidos graxos etoxilados nas membranas de lecitina. De fato, a periodicidade máxima em fases lamelares preparadas com lecitinas puras EPC, DMPC ou DPPC, por exemplo, é tipicamente da ordem de 60 Å. Subtraindo-se os valores usuais de espessura de membranas, em tais fases o espaçamento aquoso máximo permanece em torno de 24 Å [132–135]. Este valor já é bastante próximo ao espaçamento mínimo necessário para a acomodação de bastões de DNA e não permite, portanto, um estudo sistemático do confinamento sobre o arranjo supramolecular das partículas hospedadas. Assim sendo, no contexto desta tese, a adição de ácidos graxos etoxilados à lecitina de soja é fundamental para aumentar os espaços disponíveis nos canais aquosos da fase para a inserção dos nucleotídeos.

A análise do parâmetro de Caillé trouxe algumas informações interessantes acerca das interações intermoleculares. Ela revelou que as interações repulsivas no seio da fase lamelar não são baseadas em repulsão eletrostática. Por outro lado, esta mesma análise apontou que interações de Helfrich não são as únicas forças repulsivas entre as membranas. Estes achados mostram a necessidade de um modelo híbrido, contemplando outras forças, para descrever o balanço de forças entre bicamadas. A abordagem de Petrache mostrou-se adequada para tal análise, indicando que uma mistura entre forças de hidratação e de ondulação é responsável pelas interações repulsivas no interior das fases lamelares. Ainda de acordo com essa metodologia, o comprimento de alcance desta força híbrida é $\lambda_{fl} \approx 17$ Å, um valor aproximadamente três vezes maior que aqueles tipicamente encontrados em bicamadas de lecitinas puras [134, 137, 138]. Isto é uma medida quantitativa do efeito do Simulsol sobre as propriedades elásticas das membranas usadas aqui.

Este regime híbrido, onde as interações são governadas por uma mistura entre forças

de hidratação e de Helfrich, depende da faixa de separações intermembranares. Esta afirmação é sustentada pela comparação entre dados das duas composições estudadas acima. Para ambas, a Eq. 3.6 não descreve o comportamento de σ^{-2} para pequenas separações (ver Figs. 3.20 e 3.27). Nesta região, as interações são dominadas por forças de hidratação de curto alcance e interações de flutuações têm um papel secundário no sistema [3, 46]. No outro extremo, a Eq. 3.6 não descreve o comportamento de σ^{-2} para grandes separações, no caso em que o conteúdo das membranas é de 50% de lecitina. Esta observação pode ser interpretada como uma consequência direta do amolecimento das bicamadas, provocado pela introdução de ácidos graxos. Uma vez que as flutuações se tornam mais relevantes em sistemas flexíveis, interações de Helfrich tornam-se mais importantes para separações superiores a 40 Å no segundo caso [42, 92]. Como será visto nas próximas seções, a região de interesse para incorporação de DNA à fase lamelar é situada na faixa de separações onde o regime de interações é governado pela mistura de forças de hidratação e de Helfrich.

3.2 Sistemas DNA-lipídios: polimorfismo estrutural

3.2.1 Membranas com proporção PC-Simulsol 70:30

Linha de diluição $\rho = 3,1$

Para amostras preparadas ao longo da linha de diluição $\rho = 3,1$, a quantidade de água variou de $\phi_{wt} = 0,156$ a $\phi_{wt} = 0,578$. De modo equivalente, estas hidratações correspondem a frações volumétricas de lipídios no intervalo $0,318 < \phi_{lip} < 0,637$, cobrindo todo o domínio onde a fase hospedeira é governada por uma lei de diluição usual. Na Fig. 3.28, curvas de $I(q)$ vs. q são mostradas para composições diluídas onde ϕ_{lip} variou entre 0,318 e 0,379.

Nas regiões de baixos e médios ângulos, $0,040\text{\AA}^{-1} < q < 0,600\text{\AA}^{-1}$, vários picos de Bragg oriundos de difração por fases esméticas são encontradas. Para dados obtidos em síncrotron (curvas preta e azul na Fig. 3.28), pode-se identificar até sete picos de Bragg. Um conjunto de quatro ou cinco reflexões igualmente espaçadas, indicadas por asteriscos na Fig. 3.28, aponta a presença de uma estrutura ordenada de longo alcance no complexo. As distâncias de repetição permanecem aproximadamente constantes com a hidratação, oscilando em torno de um valor médio de $77\text{\AA}$.

Em coexistência com essa estrutura, é encontrada uma segunda fase lamelar cujas periodicidades são menores na comparação com a primeira. Semelhantemente ao comportamento apresentado pela primeira fase, os passos esméticos permanecem aproximadamente inalterados em torno de um valor médio de $57\text{\AA}$. Além disso, apenas uma ou duas reflexões, apontadas por setas na Fig. 3.28, são observadas, demonstrando baixo nível de ordenamento no empilhamento. Na região de alto ângulo (detalhe na Fig. 3.28), o pico difuso oriundo da difração por caudas desordenadas aparece em $q \approx 1,38\text{\AA}^{-1}$. Portanto, as caudas alifáticas encontram-se em seu estado fluido. Convoluído com este pico, também é detectado um pico típico associado à água em $q \approx 1,9\text{\AA}^{-1}$.

Em microscopia de luz polarizada, a textura birrefringente característica de fases lamelares é claramente observada, Fig. 3.29(a). Esta imagem não mostra excesso de água, levando-se à conclusão de que o solvente está completamente incorporado às lamelas. Microscopia de fluorescência, Fig. 3.29(b), revela a presença de nucleotídeos em algumas regiões limitadas circundadas por zonas escuras, mostrando que os nucleotídeos são incorporados a apenas uma das fases lamelares, enquanto a outra fase em coexistência permanece não complexada.

Figura 3.28: Intensidades espalhadas a partir de amostras diluídas preparadas com razão lipídios:DNA $\rho = 3.1$. Picos regularmente espaçados de fases lamelares, indicados por asteriscos, são encontrados juntamente com fases lamelares em coexistência cujos picos são apontados por setas. As curvas em preto e azul foram obtidas na linha SWING-SOLEIL enquanto as demais foram levantadas no Nanostar-Bruker. Inserção: a presença de um pico difuso em $q \approx 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ indica que as membranas se encontram no estado fluido. Uma reflexão difusa, oriunda das moléculas de água, também é visível em torno de $q = 1,9 \text{ \AA}^{-1}$.

Figura 3.29: Microscopia de luz polarizada e de fluorescência de amostras representativas observadas ao longo da linha de diluição $\rho = 3,1$. Barras de escala = 100 μm .

Figura 3.30: Difratograma de uma amostra com $\phi_{lip} = 0,488$, $\rho = 3,1$. Quatro anéis intensos, oriundos de uma fase lamelar, aparecem. Detalhe: destaque apresentado com uma escala de cor otimizada para ressaltar o espalhamento fraco devido ao DNA no plano das membranas.

Continuando ao longo da linha de diluição, no sentido da desidratação, um novo domínio é encontrado para concentrações entre $\phi_{lip} = 0,404$ e $\phi_{lip} = 0,529$. Um padrão de SAXS típico desta região é apresentado na Fig. 3.30. O padrão é muito similar àquele obtido com fases sem DNA, exceto para algumas formulações onde um anel difuso aparece convoluído entre a segunda e a terceira ordem lamelar. Nas Figs. 3.31 os perfis reduzidos de $I(q)$ vs. q para amostras desse domínio são apresentados. Como observado anteriormente, picos de Bragg associados a pilhas lamelares podem ser identificados. Diferentemente das curvas mostradas na Fig. 3.28, aqui não é possível distinguir a presença de fases em coexistência. Além disso, uma clara dependência entre periodicidade lamelar e hidratação aparece. Na medida em que a quantidade de água aumenta, os picos se deslocam na direção da região de baixo ângulo, atestando o aumento do espaçamento intermembranar. As distâncias de repetição variam de $d = 68,2 \text{ \AA}$ até $d = 74,4 \text{ \AA}$ e a presença de quatro ou cinco reflexões igualmente espaçadas confirma a presença de fases esmétricas altamente ordenadas no complexo. Na região WAXS (detalhes na Fig. 3.31), o estado fluido das membranas é demonstrado pelo pico difuso originário da difração pelas

caudas carbônicas. O pico relacionado às moléculas de água não é mais observado, uma consequência da diminuição de hidratação.

Figura 3.31: Intensidades espalhadas a partir de amostras com $\rho = 3.1$ e ϕ_{lip} variando de 0,404 a 0,529. Reflexões de Bragg oriundas de fases lamelares podem ser facilmente identificadas. Setas apontam picos difusos devidos a correlações DNA-DNA no plano das membranas. Detalhe: WAXS mostra o estado fluido das membranas.

O surgimento de um pico difuso entre a segunda e a terceira ordem lamelar para a maioria das amostras, indicados por setas pretas na Fig. 3.31, é outra característica marcante deste domínio. Estas reflexões se originam de correlações DNA-DNA no plano das membranas. As posições precisas destes picos, assim como as respectivas larguras, foram determinadas a partir de ajustes Lorentzianos (curvas vermelhas em 3.31). As distâncias correspondentes no espaço direto são determinadas a partir da relação $d_{DNA} = 2\pi/q_{DNA}$. Os valores de d_{DNA} variam de 26,3 $\text{\AA}$ a 34,3 $\text{\AA}$. Tais separações correspondem

a uma molécula de DNA mais algumas camadas de hidratação.

Microscopia de polarização e fluorescência, como mostrado nas Figs. 3.29(c) e 3.29(d), revela o padrão de birrefringência característico de texturas lamelares co-localizado com homogeneidade na distribuição de DNA, em bom acordo com o cenário de completa complexação entre nucleotídeos e membranas.

A questão de como os nucleotídeos estão organizados entre as lamelas é bastante interessante. Para amostras que não apresentam o pico difuso entre as ordens lamelares, poder-se-ia, em princípio, declarar que os fragmentos estão isotropicamente distribuídos no espaço entre membranas. No entanto, esta hipótese não é consistente com os experimentos uma vez que essas formulações aparecem intercaladas com outras onde a reflexão devida ao DNA aparece. Então, uma possível organização para explicar os dados observados é considerar a presença de ordem orientacional de biomoléculas no plano das membranas, formando uma estrutura L_α^N . Nesse caso, devido a interações bastão-bastão no plano e interações de volume excluído bastão-membrana fora do plano, os fragmentos formam uma mesofase bidimensional nemática, sem ordem posicional ou correlações transmembranares. Outra hipótese satisfatória, porém, consiste em colocar moléculas de DNA em galerias regulares formando uma estrutura esmética 2D no plano das bicamadas, sem correlações transmembranares [143]. Uma terceira interpretação possível é considerar, além de correlações no plano, algum grau de correlação orientacional de camada para camada. Este último caso poderia implicar na presença da chamada “fase sliding”, a qual foi prevista teoricamente, mas ainda não encontrada experimentalmente (L_α^S) [70]. Infelizmente, nenhuma dessas ambigüidades pode ser excluída de uma análise de difratogramas de SAXS obtidos com amostras em pó. Para contornar essa dificuldade, uma alternativa poderia ser a modelagem de curvas de $I(q)$ vs. q levando-se em conta as variações dos perfis de densidade eletrônica das moléculas de DNA dentro da fase hospedeira. Tais modelos permitiriam a deconvolução dos fatores de forma para as diferentes organizações, tornando possível distinguir as diferentes estruturas. Porém, até onde nós sabemos, tais estudos não foram realizados até o momento.

Medindo-se a meia largura à meia altura ($\Delta q/2$) dos picos difusos ajustados com Lorentzianas, o comprimento de correlação dos nucleotídeos, $\xi = 2\pi/HWHM$, pode ser estimado. Para dados obtidos na linha SWING-SOLEIL, onde a resolução intrínseca tem influência desprezível na largura dos picos, os valores típicos de ξ estão situados na faixa entre 200 Å e 400 Å. Estes valores correspondem a um número de 6 a 15 moléculas alinhadas, levando a fracas correlações entre partículas, o que reforça a hipótese de um arranjo nemático de nucleotídeos [86]. É possível desenvolver aqui um modelo geométrico simples para melhor verificar a validade desta hipótese. Na Fig. 3.32(a), é apresentado um

desenho esquemático da cela unitária 2D, proposta para a organização do DNA nesses domínios monofásicos hidratados. O modelo é construído levando-se em conta os parâmetros estruturais de dados de raios X, periodicidade lamelar e distância média entre bastões, além da espessura da membrana e do diâmetro das cadeias de DNA. A partir de considerações geométricas simples (assumindo-se membranas planas, *i.e.* negligenciando-se flutuações ou a presença de defeitos), é possível derivar as Eqs. 3.7–3.9 que possibilitam prever as frações volumétricas relevantes para descrever a composição do sistema:

Figura 3.32: Representações esquemáticas de lamelas hospedando bastões de DNA. d representa a periodicidade esméctica e a é a distância média entre moléculas de DNA.

$$\phi_{DNA} = \frac{\pi \Phi_{DNA}^2}{4da} \quad (3.7)$$

$$\phi_{lip} = \frac{\delta_m}{d} \quad (3.8)$$

$$\phi_w = 1 - \phi_{DNA} - \phi_{lip} \quad (3.9)$$

onde ϕ_{DNA} , ϕ_{lip} e ϕ_w são as frações volumétricas para DNA, lipídios e água, respectivamente. Φ_{DNA} é o diâmetro dos bastões e δ_m , a espessura das membranas. d e a são a periodicidade lamelar e a distância média entre cilindros.

Como as frações volumétricas formuladas são conhecidas *a priori*, é possível comparar essas previsões geométricas derivadas acima com as quantidades experimentais. Na Fig. 3.33, é apresentada uma comparação entre frações volumétricas previstas e experimentais para todas as amostras que exibem o pico (nemático) devido ao DNA. As linhas representam as previsões teóricas das expressões (3.7)–(3.9), enquanto os símbolos indicam as

frações volumétricas formuladas para lipídios, água e DNA. Como fica evidente a partir do gráfico, há um acordo muito bom entre dados experimentais e previsões teóricas, ressaltando a validade do modelo.

Figura 3.33: Frações volumétricas previstas e experimentais para todas as amostras que exibem o pico (nemático) associado ao DNA. As linhas representam previsões teóricas das expressões 3.7–3.9 e os símbolos preenchidos (círculos para lipídios, quadrados para água e triângulos para DNA) indicam as frações volumétricas experimentalmente formuladas.

Deve ser observado que as previsões das equações (3.7)–(3.9) são gerais para estruturas lamelares de bicamadas hospedando DNA nos canais aquosos, independente do arranjo dos nucleotídeos no interior da matriz (nemático, esmético, etc.). A interpretação de que, neste domínio, a simetria é do tipo L_{α}^N é justificada pela fraca correlação entre os bastões, revelada pelos ajustes de Lorentzianas.

Apesar da ausência de informação acerca da distância média entre bastões, as previsões derivadas das Eqs. (3.7)–(3.9) permitem fazer algumas considerações acerca da organização do DNA mesmo quando o pico difuso não é observado. Suponhamos, para tais formulações, que os nucleotídeos são distribuídos entre as membranas da mesma maneira esquematizada na Fig. 3.32(b). Segundo este esboço, os cilindros estão espalhados isotropicamente no plano das membranas. Para permitir a livre rotação de cada partícula em todo de seu centro de massa, a distância (média) mínima necessária deve então ser maior que a metade de seus comprimentos. Tomemos como exemplo representativo destas amostras a formulação mais hidratada deste domínio, veja a curva rosa na Fig. 3.31(b),

cuja periodicidade lamelar foi determinada em $d = 74,1 \text{ \AA}$. Usando a separação entre bastões de DNA como $a = 250 \text{ \AA}$ (a metade do comprimento dos fragmentos empregados aqui), as frações volumétricas teóricas derivadas de (3.7)–(3.9) são: $\phi_{DNA} = 0,017$, $\phi_{lip} = 0,493$ e $\phi_{wt} = 0,490$. Estes valores levam a uma razão lipídios/DNA $\rho = 29$, muito superior à razão experimental desse domínio, $\rho = 3,1$. Portanto, pode-se concluir que uma distribuição isotrópica de DNA para estas formulações é altamente improvável.

Continuando ao longo da linha de diluição, na direção de hidratações mais baixas, um novo domínio de coexistência de fases é encontrado (Figs.3.34). As frações volumétricas de lipídios correspondentes destas amostras estão situadas na faixa entre $\phi_{lip} = 0,545$ e $\phi_{lip} = 0,586$. Um conjunto de picos igualmente espaçados, indicados por setas vermelhas em 3.34, revela a presença de estruturas esmélicas no complexo. As periodicidades lamelares são aproximadamente constantes, em torno de $66 \text{ \AA}$, mostrando pequenas variações com a hidratação. Para duas amostras, a $\phi_{lip} = 0,586$ e $\phi_{lip} = 0,545$, o pico típico associado ao DNA aparece ladeado por ordens lamelares. Além desses picos lamelares, um segundo conjunto de reflexões, apontados por flechas pretas em 3.34, é observado em coexistência e pode ser perfeitamente indexado por simetrias hexagonais 2D (vide Eq. 2.12). O parâmetro de rede a também permanece praticamente inalterado em torno de $66 \text{ \AA}$ mostrando uma identidade aproximada com a periodicidade da fase lamelar em coexistência. Esta epitaxialidade é também encontrada em outros sistemas DNA-lipídios [9] e sua origem permanece obscura. Experimentos realizados na região WAXS revelam o pico difuso usualmente encontrado para membranas no estado fluido, próximo a $q = 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ (inserção na Fig. 3.34).

Microscopias de luz polarizada e de fluorescência também foram realizadas e imagens representativas deste domínio bifásico são exibidas nas Figs. 3.29(e) e 3.29(f). Apesar da presença de uma simetria hexagonal 2D revelada por raios X, **texturas mosaicas, típicas de fases lipídicas hexagonais, não são observadas**. Apenas padrões de birrefringência caótica, típicos de fases lamelares, são visualizados em **todas** as amostras.

Na região desidratada da linha de diluição, *i.e.* para $\phi_{wt} \leq 0,200$, um novo domínio monofásico aparece. Um padrão de SAXS típico deste domínio é exibido na Fig. 3.35. Os difratogramas 1-D reduzidos oriundos destas amostras são apresentados na Fig. 3.36. As frações volumétricas de lipídios correspondentes estão situadas no intervalo $0,604 < \phi_{lip} < 0,638$. Todas as reflexões de Bragg são perfeitamente indexadas a uma rede hexagonal 2D, sem necessidade de uma estrutura em coexistência. O sistema é altamente organizado de modo que, para amostras concentradas, $\phi_{lip} = 0,634$ e $\phi = 0,638$, reflexões nas posições $q = \sqrt{12}q_0$ e $q = \sqrt{13}q_0$ podem ser facilmente identificadas. A inspeção sob microscopia de luz polarizada, Fig. 3.29(g), mostra apenas a presença de

Figura 3.34: Difratomogramas de amostras com ϕ_{lip} na faixa de 0,545 a 0,586 e razão global lipídios/DNA $\rho = 3,1$. Flechas vermelhas apontam picos correspondentes a uma fase lamelar em coexistência, enquanto que as pretas apontam as reflexões indexadas por uma simetria hexagonal 2D.

texturas lamelares, enquanto em fluorescência, Fig.3.29(h), é verificado que o DNA está homogeneamente distribuído no interior da fase lipídica. O parâmetro de rede a relacionado a esta fase diminui lentamente à medida que a concentração de lipídios aumenta, atingindo o valor mínimo de $a = 64,8 \text{ \AA}$.

A componente de Bragg das curvas de raios X permite, novamente, múltiplas interpretação para o tipo de simetria observado. Na Fig. 3.37, são apresentadas duas estruturas candidatas para descrever a simetria dos difratogramas obtidos. Na primeira delas, Fig. 3.37(b), os bastões de DNA formam um rede hexagonal inserida nos canais aquosos de uma fase lamelar de lipídios (L_{α}^H). No segundo esquema, Fig. 3.37(a), a componente lipídica forma uma estrutura hexagonal inversa, onde os fragmentos de DNA estão inseridos dentro de cilindros de água (fase H_{II}^C). As expressões deduzidas nas Eqs. (3.7)–(3.9) são gerais para estruturas de prateleiras hospedando cilindros e são válidas para descrever o esquema desenhado na Fig. 3.37(b). Para a simetria H_{II} , a previsão de ϕ_{DNA} também permanece a mesma da Eq. (3.7). As expressões para ϕ_w e ϕ_{lip} , no entanto, são bastante diferentes:

Figura 3.35: Padrão de SAXS de uma amostra com $\phi_{lip} = 0.634$. A assinatura clássica de simetrias hexagonais 2D aparecem, conforme demonstrado pela presença de anéis nas posições $\sqrt{3}q_0$ e $\sqrt{7}q_0$.

$$\phi_w = \frac{\pi(a - \delta_m)^2}{4ad} - \phi_{DNA} \quad (3.10)$$

$$\phi_{lip} = 1 - \phi_w - \phi_{DNA} \quad (3.11)$$

Note-se que, ao escrever a Eq. (3.10), adicionou-se uma hipótese (presumivelmente não-restritiva) de que a espessura da membrana δ_m é idêntica ao tamanho dos domínios lipídicos ao longo das direções naturais na fase H_{II}^c .

Na Fig. 3.38, as previsões das Eqs. (3.8)–(3.11) são traçadas e comparadas às frações volumétricas experimentais de lipídios e de água. Apesar de alguns desvios em ambos os casos, observa-se um melhor acordo entre dados experimentais e previsões teóricas para a hipótese L_{α}^H . Este resultado está em bom acordo com aqueles publicados anteriormente para filmes orientados suportados [20]. Os parâmetros de rede obtidos a estão próximos a 65 Å, o que corresponde a periodicidades lamelares de $d = \sqrt{3}a/2 \approx 56$ Å. Subtraindo-se a espessura geométrica das bicamadas, o espaço disponível para os fragmentos de DNA é *c.a.* 19(1) Å, ligeiramente inferior ao limite geométrico e exigindo, portanto, pequenas deformações das membranas. Deve ser observado ainda que, nas considerações

Figura 3.36: Difratoigramas do domínio hexagonal monofásico.

(a) Hexagonal inversa, fase H_{II}^c

(b) Hexagonal entre lamelas, fase L_{α}^H

Figura 3.37: Representações esquemáticas correspondentes às hipóteses (A) H_{II}^c e (B) L_{α}^H , ambas compatíveis com os conjuntos de picos de Bragg observadas na região desidratada da linha de diluição.

geométricas, as membranas foram consideradas planas, o que poderia explicar desvios do modelo.

Figura 3.38: Comparação de ϕ_{lip} (círculos preenchidos: valores experimentais) e ϕ_w (quadrados preenchidos) para as estruturas hexagonais 2D desenhadas na Fig. 3.37. As linhas sólidas e tracejadas indicam, respectivamente, as previsões para as frações volumétricas de lipídios e de água. As previsões para fases L_{α}^H estão representadas em preto, enquanto, para H_{II}^c , elas aparecem em cinza.

Na Fig. 3.39 o comportamento dos parâmetros estruturais é exibido em função da fração volumétrica de lipídio ao longo da linha de diluição $\rho = 3,1$. A distância de repetição lamelar é representada por quadrados, enquanto os círculos estão associados à distância entre bastões. As fronteiras aproximadas entre os diferentes domínios são indicadas por linhas verticais. No domínio mais hidratado *I*, têm-se dois conjuntos de distâncias de repetição, associadas a fases lamelares em coexistência, oscilando em torno de 77 Å e 57 Å. No domínio II, a periodicidade da fase hospedeira apresenta uma dependência quase-linear em relação à hidratação, comportamento bastante similar ao observado no sistema sem DNA. É possível identificar espaçamentos lamelares entre 31,7 Å e 37,9 Å. Este espaço é suficientemente grande para acomodar bastões de DNA sem a necessidade de deformações nas membranas. Por sua vez, o espaçamento interaxial entre moléculas de DNA, obtido a partir da posição do pico difuso entre as segunda e terceira ordens lamelares, decresce suavemente com o confinamento imposto pela fase hospedeira até alcançar um valor mínimo em torno de 26 Å. Tal valor, um pouco maior que o diâmetro do cilindro de DNA, é grande o suficiente para acomodar algumas camadas de hidratação em torno dos bastões. No domínio III, tem-se a coexistência entre uma fase lamelar contendo DNA organizado em uma rede nemática entre as membranas e uma fase hexagonal 2D de bastões de DNA no interior de uma fase lamelar. É encontrada epitaxialidade entre o

parâmetro a da rede hexagonal e a periodicidade d da fase lamelar em coexistência. Duas amostras deste domínio, $\phi_{lip} = 0,545$ e $\phi_{lip} = 0,586$, mostram claramente o pico difuso típico de correlações DNA-DNA no plano das lamelas. As distâncias entre bastões, d_{DNA} , são $26,0 \text{ \AA}$ e $24,3 \text{ \AA}$, respectivamente.

No domínio mais ordenado, IV (ϕ_{lip} maior que *ca.* $0,60$), tanto a periodicidade lamelar quanto as distâncias DNA-DNA se tornam aproximadamente constantes, em torno de $d = 56,0 \text{ \AA}$ e $a = 65,0 \text{ \AA}$ respectivamente. Estes valores parecem ser característicos das estruturas mais compactas possíveis nesses sistemas. É também interessante notar que a distância entre moléculas de DNA é significativamente maior que aquela observada no domínio hidratado (L_α^N) e do que a observada em fases hexagonais de DNA em soluções aquosas estudadas por Livolant e colaboradores [144]. Estas observações sugerem a existência de interações repulsivas entre moléculas de DNA quando correlações de orientação camada a camada aparecem na fase L_α^H . Estas constatações apontam para a existência de fortes interações de volume excluído entre DNA e membranas, como será discutido nas próximas seções.

Figura 3.39: Comportamento dos parâmetros estruturais em função da fração de lipídio. Quadrados representam o passo esmético da fase hospedeira e círculos, a separação entre bastões de DNA. Linhas pontilhadas: guia para os olhos representando a localização aproximada das fronteiras entre domínios.

A auto-organização de DNA em camadas aquosas de fases lamelares depende fortemente do *confinamento* exercido pelas bicamadas. Segundo as interpretações acima descritas, pode-se resumir o comportamento de fases ao longo da linha de diluição $\rho = 3,1$

como se segue:

$$(DNA - \acute{a}gua) + L_{\alpha} + L_{\alpha}^N \rightarrow L_{\alpha}^N \rightarrow L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H \rightarrow L_{\alpha}^H$$

Répliques de amostras dos domínios monofásicos, L_{α}^N e L_{α}^H , também foram observadas em MET. Na Fig. 3.40, é mostrada a aparência em larga escala destes domínios. Um aspecto marcante é que, ao contrário de sistemas binários em concentrações bastante similares (ver Figs. 3.9(b) e 3.10(a)), não são observadas vesículas. Além disso, as fraturas ocorrem somente (ou pelo menos são muito mais prováveis) ao longo dos planos das membranas, o que pode ser um sinal da modificação das propriedades elásticas da fase pela incorporação de partículas. A razão para esta observação pode estar relacionada ao aumento de ordem esmética. Uma discussão mais detalhada a esse respeito será conduzida na Seq. 3.3.2.

(a) L_{α}^N , $\phi_{lip} = 0,488$ e $\rho = 3,1$.

(b) L_{α}^H , $\phi_{lip} = 0,634$ e $\rho = 3,1$.

Figura 3.40: Visualização de larga escala de réplicas dos domínios monofásicos com $\rho = 3,1$. Diferentemente do comportamento encontrado em misturas binárias de concentração parecida, vesículas não são observadas.

Analisando-se o domínio L_{α}^N em maior detalhe, alguns resultados interessantes são encontrados. Na Fig. 3.41, uma imagem de uma amostra contendo $\phi_{lip} = 0,488$ é mostrada à magnificação de $150000\times$. A direção de sombreamento é indicada por uma seta amarela, próxima a um degrau, possibilitando a determinação do sentido da deposição da platina. Como esperado a partir de dados de raios X e MOLP, terraços extensos livres de defeitos formam uma estrutura em camadas. No detalhe, a transformada de Fourier,

realizada sobre uma das camadas, mostra um padrão isotrópico, ligeiramente alongado na direção do jato de sombreamento. Visto que o processo de fratura tende a clivar as membranas no centro do núcleo hidrofóbico [145], não é possível, **neste caso**, visualizar anisotropias introduzidas pelas moléculas de DNA. No entanto, ainda assim, é possível verificar que a superfície das membranas exibem corrugações que não estavam presentes no sistema binário.

Figura 3.41: Imagem de MET sobre réplica de criofratura do domínio monofásico L_{α}^N . Terraços esméticos extensos podem ser facilmente identificados. A direção de sombreamento é indicada pela seta amarela. Detalhe: transformada de Fourier feita sobre o quadrado branco pontilhado revela isotropia no plano das fraturas (vide texto para detalhes).

Imagens de grande magnificação do domínio L_{α}^H revelam resultados bastante interessantes. Passos esméticos são observados através da réplica conforme indicado por setas brancas na Fig. 3.42(a). No entanto, estes terraços são mais suaves do que aqueles observados em réplicas do domínio L_{α}^N . No plano das camadas, identifica-se um grande número de estruturas cuja orientação camada a camada é conservada, em acordo com o comportamento esperado para redes hexagonais colunares entre lamelas. Na Fig. 3.42(c),

transformadas de Fourier efetuadas sobre duas camadas consecutivas confirmam tanto a forte anisotropia das partículas quanto a persistência de orientação.

Figura 3.42: Imagens de microscopia eletrônica sobre réplicas de criofratura de uma fase L_{α}^H . (a) Setas brancas apontam passos esméticos delimitando os planos ao longo dos quais estruturas de bastonetes aparecem altamente orientadas. A flecha amarela indica a direção de vaporização da platina. (b) Aumento sobre o quadrado tracejado na figura (a) mostrando as estruturas dos bastões em detalhe. (c) Transformadas de Fourier sobre os quadrados brancos de linhas sólidas indicados na figura (a), revelando a persistência de orientação camada a camada, como previsto para fases L_{α}^H .

Na Fig. 3.42(b), é possível observar a forma cilíndrica das partículas em detalhe. Estas estruturas possuem tamanhos típicos de $530 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$, em bom acordo com as dimensões esperadas para moléculas de DNA com 150 pb, levando-se em conta a camada de recobrimento de platina. O limite de resolução da técnica de criofratura, estimado em *ca.* $20 \text{ \AA}$ para **estruturas periódicas** [12], não possibilita medidas acuradas do diâmetro do DNA. Porém, a forma das partículas é destacada, como já observado anteriormente em contextos similares [146–148]. Além disso, as separações entre bastões, após análise estatística em algumas imagens, é determinada em *ca.* $61 \text{ \AA}$, novamente em bom acordo com dados de raios X.

A questão do por quê é possível observar moléculas de DNA em réplicas do domínio L_{α}^H , enquanto para o domínio L_{α}^N não, merece ser discutida aqui. No processo de sombreamento, átomos de platina e de carbono ou agregados oriundos da fase vapor que atingem a superfície têm uma certa mobilidade após adsorção no substrato. As energias de ligação são diferentes em cada sítio da superfície e a nucleação ocorre em torno de certos centros onde é possível a formação de agregados mais estáveis. O crescimento de grãos Pt-C ocorre, então, em alguns sítios preferenciais, segundo a energia de ligação local da superfície [149]. No caso do substrato ter uma estrutura periódica, a distribuição da cobertura também é periódica. Este fenômeno é conhecido na literatura como *decoração*. A amostra replicada do domínio L_{α}^N tem periodicidade $d = 71,3 \text{ \AA}$. Isso significa que o espaçamento intermembranar é grande o suficiente para acomodar os bastões sem a necessidade de deformações nas membranas. Portanto, a fase lamelar é composta por membranas planas e a fratura no núcleo hidrofóbico dá origem a monocamadas planas e amorfas cobrindo os nucleotídeos. No entanto, a periodicidade lamelar da amostra L_{α}^H é $d = 56,3 \text{ \AA}$, menor que aquela encontrada na fase L_{α}^N descrita acima, exigindo deformações de membranas. Portanto, pode-se esperar que a monocamada lipídica recobrindo os bastões após a fratura segue o relevo das partículas, provendo então um substrato periódico para o sombreamento. Enquanto o tamanho do grão em réplicas Pt-C preparadas sob as mesmas condições descritas aqui é estimado em *ca.* $50 \text{ \AA}$ [150], o fenômeno de decoração permite a visualização de detalhes mais finos que aqueles observáveis em superfícies amorfas [151].

Força iônica

Os resultados obtidos na Sec. 3.1.1 mostram que eletrostática não tem grande influência na estabilização da fase hospedeira usada aqui. Por outro lado, uma vez que a carga elétrica líquida da parte lipídica é supostamente nula, é também razoável supor que força Coulombianas entre nucleotídeos e membranas não estejam diretamente envolvidas na complexação. Porém, mesmo se efeitos eletrostáticos possuem um papel menor nas interações diretas DNA-membranas, não se podem negligenciar a liberação de contra-íons Na^+ que neutralizam os grupos fosfato do DNA. Como mencionado na Sec. 1.5.1, a introdução de sal (acetato de amônio no caso aqui) modifica o comportamento termodinâmico do sistema porque ela diminui o ganho de entropia associado à liberação de contra-íons [63]. Para se abordar essa questão, após o estudo do comportamento de fases lamelares binárias hidratadas com soluções salinas, algum esforço foi concentrado na análise do sistema ternário contendo DNA, sob uma condição iônica distinta resultante da adição de sal monovalente.

Figura 3.43: Imagem de MET de réplica do domínio monofásico L_α^H , à maior magnificação disponível, $300000\times$. A presença de estruturas anisotrópicas em forma de bastonetes é destacada e suas dimensões estão em acordo com o esperado para os fragmentos de DNA usados aqui. A flecha amarela mostra a direção de vaporização e no detalhe é mostrada a transformada de Fourier da área indicada pelo quadrado branco.

Para o complexo ternário DNA-lipídios-água estudado neste manuscrito, a concentração molar de **nucleotídeos na fase aquosa** (em unidades de mol/L) é dada em termos de ρ e ϕ_w através da relação:

$$C(\rho, \phi_w) = \frac{1.7 \times 10^3}{330} \frac{1}{(1 + \rho)} \left[\frac{1}{\phi_w} - 1 \right] \quad (3.12)$$

Da Eq. 3.12, é fácil derivar que, para as hidratações estudadas ao longo da linha de diluição $\rho = 3,1$, a concentração molar de grupos fosfato é compreendida entre ≈ 1 M e ≈ 5 M. Levando-se em conta a constante de renormalização de Manning, conclui-se que a quantidade de íons Na^+ liberada para a fase aquosa varia de $\approx 0,24$ M a $\approx 1,25$ M. Portanto, a introdução de sal monovalente, a concentração de 0,25 M, representa uma forte modificação do balanço iônico do complexo.

Algumas amostras contendo sal, preparadas com $\rho = 3,1$, foram analisadas por espalhamento de raios X. As curvas de $I(q)$ vs. q resultantes são exibidas na Fig. 3.44.

Figura 3.44: Intensidades espalhadas a partir de amostras com $\rho = 3,1$, preparadas com soluções salinas de acetato de amônio a 0,25 M. Picos lamelares aparecem indicados por asteriscos e as reflexões oriundas do ordenamento do DNA estão apontadas por setas.

Novamente, um rico polimorfismo de mesofases é encontrado através da linha de diluição. Para amostras hidratadas, com $\phi_{lip} < 0,45$, duas fases lamelares aparecem em coexistência. Da mesma forma observada antes, uma destas fases tem ordem de longo alcance bem definida, resultando em até quatro picos de Bragg. A segunda fase esmética, por sua vez, é menos ordenada e dá origem a apenas duas reflexões, indicadas por asteriscos vermelhos na Fig. 3.44. Na medida em que o sistema é desidratado, um domínio monofásico aparece onde, para a maioria das amostras, é possível identificar o pico nemático típico convoluído entre a segunda e a terceira ordens lamelares. Finalmente, na região mais seca da linha, para $\phi_{lip} > 0,56$, uma simetria hexagonal é encontrada. Na região de altos ângulos, o pico largo característico a $q \approx 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ mostra que o estado fluido das cadeias carbônicas permanece inalterado com a adição de sal. Tal comportamento é

similar àquele observado para amostras preparadas com água pura, onde estes domínios apareceram na mesma sequência. A única diferença é que, aqui, a transição $L_\alpha^N \rightarrow L_\alpha^H$ ocorre sem a presença de um domínio intermediário de coexistência, talvez muito estreito para ter sido detectado.

Na Fig. 3.45, os parâmetros de cela unitária são indicados em função da fração de lipídio. Para permitir a comparação direta, dados de formulações sem sal, preparadas a partir dos mesmos lotes de DNA sonicado e das mesmas misturas lecitina-Simulsol, e analisadas na mesma rodada de experimentos síncrotron, são também apresentados na Fig. 3.45. É observado que os resultados concordam, não apenas qualitativamente, mas também quantitativamente, mostrando que a adição de sal não muda significativamente o comportamento de mesofases. Estas constatações reforçam e suportam a importância das forças entrópicas como atores maiores nas interações no interior do complexo, visto que as forças de hidratação e de Helfrich são relatadas na literatura como forças independentes das condições iônicas [47, 61]. Além disso, como discutido na Seq. 1.4.1, as interações de curto alcance entre moléculas de DNA são consideradas como sendo governadas por forças repulsivas de hidratação [46], o que concorda com a independência da presença de sal encontrada acima.

As amostras também foram analisadas em microscopias de polarização e fluorescência. Um par de imagens de cada domínio é exibido na Fig. 3.46. Texturas lamelares aparecem para todas as amostras ao longo da linha de diluição. Em fluorescência, a separação de fase é claramente observada para o domínio de coexistência representado na Fig. 3.46(b), onde uma solução concentrada contendo DNA é encontrada rodeada por uma fase lamelar aparentemente não complexada. Os outros dois domínios monofásicos têm distribuição homogênea de nucleotídeos co-localizada com a fase lipídica.

Linha de diluição $\rho = 5,1$

A linha de diluição com razão lipídios/DNA igual a $\rho = 5,1$ foi varrida do mesmo modo descrito acima. As hidratações globais das formulações variaram entre $\phi_{wt} = 0,127$ e $\phi_{wt} = 0,576$. As frações de lipídios correspondentes situaram-se no intervalo $0,356 \leq \phi_{lip} \leq 0,729$. Na Fig. 3.47, os espalhamentos de raios X a baixos e médios ângulos são exibidos, na forma reduzida $I(q)$ vs. q , para amostras diluídas com $\phi_{lip} \leq 0,543$.

Um conjunto de reflexões de Bragg regularmente espaçadas, indicadas por asteriscos na Fig. 3.47, mostra a presença de uma fase lamelar com uma ordem de longo alcance bem definida. Para a maioria das amostras, é também possível identificar um segundo conjunto de picos, apontados por setas pretas, oriundos de uma fase esmética fracamente ordenada. O deslocamento dos picos com a hidratação mostra que as periodicidades

Figura 3.45: Comportamento dos parâmetros estruturais em função da fração de lipídio, para amostras com $\rho = 3,1$. Quadrados representam a periodicidade da fase lamelar de longo alcance enquanto triângulos correspondem à periodicidade das fases lamelares em coexistência. Círculos representam o espaçamento interaxial entre bastões. Símbolos preenchidos indicam os parâmetros relativos a formulações contendo sal e símbolos vazios, amostras hidratadas com água pura. Linha pontilhadas: guia para os olhos com as fronteiras aproximadas dos domínios.

diminuem quando a concentração de lipídios aumenta, um comportamento semelhante ao observado em amostras binárias lipídios/água. Apenas duas formulações, com $\phi_{lip} = 0,421$ e $\phi_{lip} = 0,527$, são encontradas monofásicas. Seguindo o mesmo raciocínio usado na análise do domínio monofásico mais hidratado sobre a linha $\rho = 3,1$, estas formulações são interpretadas como pontos L_{α}^N . A presença de um pico largo em $q \approx 1,38 \text{ \AA}^{-1}$ indica que as membranas estão no estado fluido.

Microscopias de polarização e fluorescência (veja Figs. 3.48(a) e 3.48(b)) mostram texturas lamelares juntamente com inhomogeneidade na distribuição de DNA. Estas imagens mostram zonas que são claras em fluorescência e opticamente isotrópicas em MOLP, sugerindo a formação de fases aquosas concentradas de DNA juntamente com fases lamelares contendo nucleotídeos (em quantidade indeterminada) entre as bicamadas.

Na Fig. 3.49(a), os perfis de espalhamento de um domínio bastante estreito são mostrados para frações de lipídio situadas no intervalo $0,564 < \phi_{lip} < 0,601$. Trata-se de uma região de coexistência bastante complexa onde simetrias altamente ordenadas são encontradas juntamente com fases lamelares. Os picos associados a estas fases lamelares

Figura 3.46: Imagens representativas de MOLD e de fluorescência para amostras preparadas com $\rho = 3, 1$ e hidratadas com soluções salinas. Barras de escala: $100\mu m$.

são apontados por setas azuis e vermelhas. **Uma característica nova deste domínio é a aparição súbita de redes retangulares-colunares 2D**, cujos picos de Bragg estão identificados por setas pretas, com os índices de Miller correspondentes entre parênteses. A amostra com $\phi_{lip} = 0, 601$ se destaca por ser uma formulação trifásica, sendo possível também a identificação do pico difuso de DNA oriundo de ordenamento nemático no interior de uma das fases lamelares. Em MOLD (ver Fig. 3.48(c)), apenas texturas lamelares são observadas, levando à conclusão de que a parte lipídica é auto-organizada segundo estruturas esmélicas e que as simetrias retangulares se originam do arranjo supramolecular de DNA entre membranas. Em fluorescência, as amostras são inhomogêneas com o DNA apresentando diferentes concentrações nas fases em coexistência. A aparição

Figura 3.47: Curvas de $I(q)$ vs. q de amostras com $\rho = 5,1$ e ϕ_{lip} variando de 0,356 a 0,543. Asteriscos indicam picos oriundos de uma fase lamelar com ordem de longo alcance bem definida e setas apontam reflexões oriundas de uma estrutura lamelar de curto alcance. Inserção: WAXS mostra que a membranas se encontram no estado fluido.

de picos (h, k) com $h + k = 2n + 1$ significa que tais simetrias são retangulares simples como destacado na Fig. 3.49(b). Os parâmetros de rede a e b são indicados juntamente aos respectivos difratogramas em 3.49(a). Possivelmente esta rede retangular seja um estágio intermediário no ordenamento do DNA até a simetria hexagonal 2D observada em amostras mais desidratadas.

Na região mais desidratada, isto é, para ϕ_{lip} variando de 0,612 a 0,730, raios X mostram um domínio de coexistência entre simetrias hexagonais e retangulares. As respectivas curvas de espalhamento, $I(q)$ vs. q , são apresentadas na Fig. 3.50. Os picos oriundos de estruturas esmétricas são identificados por setas vermelhas enquanto aqueles indexados a redes hexagonais são apontados por flechas pretas. A reflexão difusa na região de alto ângulo confirma o estado fluido das membranas. A rede hexagonal encontrada aqui é semelhante àquela observada ao longo da linha $\rho = 3,1$, isto é, o parâmetro a é aproximadamente constante em torno de $65 \text{ \AA}$ o que leva à interpretação dessa fase como sendo

Figura 3.48: Imagens de MOLP e de fluorescência de amostras representativas da linha de diluição $\rho = 5,1$. Todas as formulações ao longo da linha mostraram texturas birrefringentes associadas à inhomogeneidade na distribuição de nucleotídeos em fluorescência.

uma L_{α}^H . Por outro lado, o período esmétrico da fase em coexistência depende fortemente da hidratação. Estas observações significam que, uma vez formada a estrutura hexagonal no complexo, ela é estável e as modificações na quantidade global de água são então associadas à fase lamelar em coexistência. Microscopia de luz polarizada revela apenas texturas lamelares, enquanto a microscopia de fluorescência mostra inhomogeneidades na distribuição de nucleotídeos (ver Figs. 3.48(e) e 3.48(f)).

Na Fig. 3.51, o comportamento dos parâmetros de rede em função da fração de lipídios é mostrado. Quadrados indicam periodicidades lamelares da fase lipídica e círculos representam a distância entre bastões de DNA. O comportamento é dominado por dois

Figura 3.50: Difratoogramas de amostras com $\rho = 5, 1$ e ϕ_{lip} entre 0,612 e 0,730. Simetrias hexagonais são identificadas juntamente com fases lamelares.

quantidade de DNA em cada fase poderia ser a realização de análise de imagens sobre os registros de fluorescência e comparar as intensidades de luz entre zonas claras e escuras [23]. Porém, tendo em vista que a fluorescência do YOYO depende intimamente da orientação, e a impossibilidade de se assegurar linearidade na detecção, esta abordagem poderia ser usada apenas como uma estimativa qualitativa, não havendo sentido em uma extração de informação quantitativa. Portanto, não é possível aqui determinar-se precisamente a organização dos nucleotídeos no interior dos canais aquosos deste domínio.

O domínio desidratado *III* também apresenta uma coexistência entre duas fases. Uma dessas fases hospeda uma estrutura 2D hexagonal de nucleotídeos. Semelhantemente ao comportamento observado ao longo da linha $\rho = 3, 1$, o parâmetro de rede a decresce suavemente à medida que a concentração de lipídios aumenta, atingindo valor mínimo de $a = 64,1 \text{ \AA}$. A organização dos nucleotídeos dentro da outra fase lamelar é mais complicada

de se determinar. Novamente, a falta de conhecimento acerca da exata concentração de DNA não permite estabelecer a estrutura. Para concentrações nas vizinhanças de $\phi_{lip} \approx 0,625$, são observadas as mesmas características de epitaxialidade encontradas ao longo da linha $\rho = 3,1$, com a fase lamelar em coexistência apresentando periodicidades em torno de 65 Å. Isto leva à conclusão de que, para estas amostras, a organização dos nucleotídeos é nemática. Por outro lado, para amostras com $\phi_{lip} > 0,650$, a distância de repetição é bem menor, em torno de 45 Å. Obviamente, neste último caso, não há DNA inserido entre as membranas.

O domínio intermediário *II* é uma região de transição. Esta característica é evidenciada quando se olha o comportamento da periodicidade lamelar como a continuação do domínio hidratado *I* (valores em torno de 70 Å). A fase em coexistência, por sua vez, também parece ser continuada no domínio seco *III* (valores em torno de 55 Å). Uma das fases lamelares hospeda redes de DNA com simetria retangular 2D. O ordenamento dos nucleotídeos na outra fase lamelar é nemático para uma concentração global $\phi_{lip} = 0,601$. Para as outras amostras, a organização não poder ser determinada exatamente devido às razões descritas acima.

Figura 3.51: Comportamento dos parâmetros estruturais para linha de diluição $\rho = 5,1$. Quadrados representam o passo esmético da fase lipídica e os círculos, a separação entre bastões. Linhas tracejadas: guia para os olhos representando a localização aproximada das fronteiras entre domínios. Domínio I: lamelar + lamelar, domínio II: lamelar + retangular, domínio III: lamelar + hexagonal.

Em contraste com os dados observados ao longo da linha $\rho = 3,1$, aqui não são encontrados domínios monofásicos. A interpretação do comportamento de mesofases ao

longo da linha $\rho = 5,1$ pode ser sumarizada como se segue:

Linha de diluição $\rho = 8.1$

Amostras com $\rho = 8,1$ foram preparadas com frações volumétricas de lipídio compreendidas no intervalo entre 0,382 e 0,773. A faixa de hidratações equivalente está situada no intervalo $0,128 < \phi_{wt} < 0,572$.

Na Fig. 3.52, são exibidas as curvas de espalhamento de amostras diluídas para as quais a quantidade de lipídios é $\phi_{lip} < 0,535$. De modo semelhante às duas linhas descritas anteriormente, dois conjuntos de picos de Bragg são encontrados, tendo origem em duas fases lamelares distintas. Um destes conjuntos, apontados por asteriscos, corresponde a uma estrutura de longo alcance bem ordenada enquanto a outra, indicada por setas pretas, é associada a um ordenamento de curto alcance. O comportamento dessa periodicidade é também análogo àquele observado nas outras duas linhas. Na região WAXS, o pico largo típico de caudas carbônicas fluidas é encontrado acompanhado de uma reflexão associada à água. Microscopia de polarização (ver Fig. 3.55(a)) exhibe clássicas texturas lamelares, enquanto fluorescência mostra forte inomogeneidades. A presença de zonas claras em fluorescência, co-localizadas com isotropia óptica, aponta a formação de uma fase separada (diluída) de DNA.

Seguindo a linha de diluição na direção de maiores quantidades de lipídios, um domínio mais ordenado e complexo aparece. Na Fig. 3.53, as curvas de $I(q)$ vs. q são mostradas para amostras na faixa $0,556 < \phi_{lip} < 0,648$. Raios X revelam a presença de uma região bifásica com fases lamelares em coexistência com estruturas retangulares 2D, de modo semelhante aos resultados encontrados sobre a linha $\rho = 5,1$. Os picos da fase esmética em coexistência estão indicados por setas vermelhas enquanto as reflexões associadas aos arranjos retangulares aparecem apontadas por setas pretas juntamente com os respectivos índices de Miller entre parênteses. O espalhamento a alto ângulo revela que o estado de fluidez das membranas não se modifica.

Para amostras com $\phi_{lip} = 0,623$ e $\phi_{lip} = 0,648$, a indexação inequívoca das simetrias cristalográficas é extremamente difícil e problemas relacionados às intensidades dos picos aparecem. Na Fig. 3.54, estas formulações foram indexadas usando uma rede retangular 2D em coexistência. Como esta super rede de DNA está inserida entre membranas de uma fase lamelar, alguns picos da rede retangular aparecem convoluídos com reflexões esméticas. Esse é o caso dos picos indexados por $hk = (02), (04), (06), \dots$. Porém, em princípio, poder-se-ia esperar valores mais altos de intensidades nesses picos em re-

Figura 3.52: Difratoograma de amostras com $\rho = 8,1$ e ϕ_{lip} entre 0,382 e 0,535. Fases lamelares de longo alcance são indicadas por asteriscos enquanto fases lamelares de curto alcance aparecem apontadas por setas. Detalhe: WAXS mostra o estado fluido das membranas.

lação àqueles oriundos de reflexões atribuídas somente ao DNA - $hk = (11), (13), \dots$. Para examinar outras simetrias, indexações com os grupos cúbicos $Pn3m$, $Ia3d$ e $Im3m$, tradicionalmente encontrados em lipoplexos e em vários outros sistemas com surfactantes [84, 127, 128, 152, 153], também foram testadas. No entanto, estas simetrias não foram capazes de descrever adequadamente as posições dos picos. Além disso, fases cúbicas são opticamente isotrópicas e, em MOLP, apenas texturas lamelares são observadas nestes complexos (Fig. 3.55(c)). Microscopia de fluorescência, por sua vez, mostra não uniformidade na distribuição de DNA nestas amostras, Fig. 3.55(d), um resultado consistente com domínios bifásicos. Nesse contexto, uma rede retangular 2D coexistindo com uma fase esméctica é a melhor indexação que acomoda o conjunto de observações, embora as intensidades relativas não sejam consistentes.

O grau de ordem no sistema aumenta significativamente com o incremento na concentração de lipídios. Para composições situadas na faixa de $0,668 < \phi_{lip} < 0,714$, uma fase colunar hexagonal aparece com parâmetro de rede em torno de $65 \text{ \AA}$. Esta é a região de maior complexidade ao longo da linha de diluição. Os difratogramas correspondentes

Figura 3.53: Curvas de espalhamento para amostras com $\rho = 8,1$ e ϕ_{lip} entre 0,556 e 0,648. Estruturas lamelares estão indicadas por setas vermelhas enquanto a indexação retangular 2D está apontada por setas pretas com os respectivos índices de Miller entre parênteses. Inserção: WAXS mostrando o estado fluido das membranas.

a estas amostras são mostrados na Fig. 3.54. A formulação com quantidade global de lipídios $\phi_{lip} = 0,668$ apresenta uma fase lamelar em coexistência com uma estrutura hexagonal. As outras duas amostras, por sua vez, têm uma rede retangular 2D juntamente com a simetria hexagonal. À medida que a concentração de lipídios varia, mudanças ocorrem apenas na fase que hospeda a estrutura retangular, enquanto o arranjo contendo a estrutura hexagonal permanece relativamente estável. WAXS confirma o estado L_α das membranas e MOLP mostra claramente texturas lamelares. Em fluorescência, inhomogeneidades confirmam o caráter multifásico.

Figura 3.54: Curvas de $I(q)$ vs. q de amostras com ϕ_{lip} entre 0,668 e 0,714 e $\rho = 8,1$. Setas pretas apontam picos de estruturas hexagonais 2D enquanto setas vermelhas apontam indexações retangulares 2D. Detalhe: WAXS mostra o estado fluido das membranas.

Figura 3.55: Microscopia de polarização e de fluorescência de amostras representativas observadas para $\rho = 8,1$. Todas as amostras apresentaram texturas birrefringentes e fluorescência inhomogênea.

A região mais concentrada da linha de diluição mostra a coexistência entre estruturas lamelares e hexagonais 2D. Os difratogramas correspondentes a este domínio são apresentados na Fig. 3.56. O parâmetro de rede da fase hexagonal permanece constante em torno de $65 \text{ \AA}$ enquanto a periodicidade lamelar da fase esmética associada muda com o grau de hidratação.

Figura 3.56: Difratogramas do domínio mais seco sobre a linha $\rho = 8,1$. Simetrias hexagonais são apontadas por setas pretas e o pico lamelar em coexistência é indicado por setas vermelhas. Inserção: WAXS mostrando o estado fluido das bicamadas.

O comportamento dos parâmetros estruturais obtidos a partir de raios X é sumariado na Fig. 3.57. O domínio hidratado *I*, assim como o domínio mais seco *IV*, são mais fáceis de interpretar. O primeiro apresenta a coexistência entre fases lamelares. Dois conjuntos de periodicidades são observados. A periodicidade maior varia de $71,3 \text{ \AA}$ a $86,1 \text{ \AA}$, próximo ao limite de diluição. Estes valores levam a espaçamentos intermembranares

grandes o suficiente para acomodar bastões de DNA sem dificuldades estéricas: a periodicidade mínima para possibilitar geometricamente a incorporação de DNA na fase lipídica é $\Phi_{DNA} + \delta_m = 56.5 \text{ \AA}$. A segunda faixa de periodicidades compreende valores entre $53,7 \text{ \AA}$ e $62,9 \text{ \AA}$. Neste caso, pode-se ter tanto formulações contendo nucleotídeos quanto fases lipídicas não complexadas. A organização exata das moléculas dentro da matriz lamelar, porém, permanece desconhecida pelas mesmas razões discutidas nas linhas anteriores. O domínio seco *IV* corresponde a uma coexistência entre uma fase lamelar de lipídios com $d \approx 45 \text{ \AA}$ e a agora já “tradicional” estrutura hexagonal de nucleotídeos hospedados entre as lamelas de uma fase lipídica. A primeira fase lamelar não tem espaço suficiente para acomodar DNA e é, portanto, não complexada.

Figura 3.57: Comportamento dos parâmetros estruturais ao longo da linha $\rho = 8, 1$. Quadrados representam o espaçamento esmétrico da fase lipídica e círculos, a separação entre bastões. Linhas tracejadas: guia para os olhos representando as fronteiras aproximadas entre domínios.

Os domínios *II* e *III* são consideravelmente mais complexos e determinações cristalográficas apropriadas são muito difíceis. No domínio *II*, tais formulações foram indexadas por uma coexistência entre uma rede retangular 2D de DNA (inserida numa fase lamelar) juntamente com uma segunda fase lamelar. A periodicidade da estrutura esmétrica em coexistência é próxima ao limite de diluição, possuindo espaço suficiente para acomodar bastões de DNA com diâmetro $20 \text{ \AA}$. Imagens de fluorescência indicam a presença de DNA em ambas as fases, porém, como a concentração é desconhecida, o ordenamento dos nucleotídeos dentro dessa fase não pode ser determinado com exatidão. Apesar disso, para duas amostras, com $\phi_{lip} = 0,623$ e $\phi_{lip} = 0,648$, distâncias de *ca.* $26 \text{ \AA}$ podem ser

identificadas entre os nucleotídeos (círculos na parte de baixo do domínio), o que é uma evidência de ordenamento nemático. Os parâmetros de rede das estruturas retangulares são virtualmente iguais, com $a = b$. Isto significa que os cilindros formam uma estrutura 2D *quasi*-quadrada inserida entre membranas. No domínio *III*, um aspecto marcante é a presença de coincidências epitaxiais entre d_{rect} and a_{hex} [127].

O comportamento de fase ao longo da linha $\rho = 8,1$ pode ser resumido da seguinte forma:

$$(DNA - \acute{a}gua) + L_{\alpha}^? + L_{\alpha}^? \rightarrow L_{\alpha} + L_{\alpha}^? \rightarrow L_{\alpha}^? + L_{\alpha}^R \rightarrow L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^R \rightarrow L_{\alpha}^R + L_{\alpha}^H \rightarrow L_{\alpha} + L_{\alpha}^H$$

Diagrama de fases

Na Fig. 3.58, o diagrama de fase completo, levantado experimentalmente neste trabalho, é apresentado. O rico polimorfismo de mesofases do sistema, assim como transições estruturais entre arranjos cristalinos dirigidas pelo confinamento são evidenciados. Exceto por duas formulações ao longo da linha $\rho = 5,1$ ($\phi_{lip} = 0,53$ e $\phi_{lip} = 0,37$), que foram identificadas como fases L_{α}^N , todas as formulações com $\rho \neq 3,1$ foram encontradas em coexistência. A fronteira do domínio pode ser próxima à composição nominal correspondendo à amostra com $\phi_{lip} = 0,53$ e $\rho = 5,1$, e passos menores em ρ precisariam ser investigados para clarificar este aparente caráter “re-entrante”. Microscopia de polarização mostra texturas lamelares em toda faixa de hidratações investigadas, apontando a persistência de uma organização esmética para as fases lipídicas. Portanto, além das estruturas lamelares observadas em raios X, os picos são presumivelmente oriundos do arranjo supramolecular de bastões de DNA hospedados entre membranas.

A questão do por quê o DNA é completamente incorporado apenas para *grandes* quantidades de nucleotídeos é bastante interessante porque, diferentemente dos complexos baseados em lipídios catiônicos, aqui a atração eletrostática de origem iônica não é um candidato óbvio na complexação. A carga globalmente neutra dos grupos polares da lecitina, assim como a neutralidade do surfactante auxiliar, requer outros mecanismos para explicar a formação do complexo. Este assunto já foi tratado teoricamente usando uma abordagem de Flory e os autores da Ref. [16] desenvolveram um diagrama de fase teórico que está em bom acordo com os experimentos conduzidos aqui. Infelizmente, o modelo não inclui uma descrição da região seca onde arranjos altamente ordenados são encontrados. Esta dificuldade em se lidar com domínios desidratados é parcialmente devida à restrição de ondulações em geometrias fortemente confinadas, assim como outras interações fortes, de curto alcance, que se tornam relevantes. Para complexos fortemente confinados, a espessura dos canais aquosos se torna semelhante ao diâmetro dos bastões

Figura 3.58: Diagrama de fase completo resultante do presente trabalho. Domínios monofásicos são sistematicamente observados apenas ao longo da linha $\rho = 3,1$, em acordo qualitativo com previsões teóricas da Ref. [16]. Símbolos preenchidos indicam pontos monofásicos: $\blacktriangle = L_{\alpha}^N$, $\bullet = L_{\alpha}^H$. Símbolos vazios representam coexistência de fases: $\triangle = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^N$ ou $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}$, $\circ = L_{\alpha}^H + L_{\alpha}^N$ ou $L_{\alpha}^H + L_{\alpha}$, $\diamond = L_{\alpha}^H + L_{\alpha}^R$, $\square = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$ ou $L_{\alpha} + L_{\alpha}^H$.

de DNA. Esta proximidade aumenta forças estéricas e outras interações de curto alcance entre bicamadas e nucleotídeos de tal modo que um modelo consistente descrevendo o sistema deve compulsoriamente levar em conta esse balanço, o qual está além de uma abordagem do tipo Flory.

3.2.2 Membranas com proporção PC-Simulsol 50:50

O comportamento de fase de complexos DNA-lipídios preparados a partir de membranas com razão PC-Simulsol 50:50 também foi investigado. Visto que nos estudos anteriores a presença sistemática de domínios monofásicos foi encontrada apenas ao longo da linha

$\rho = 3, 1$, esta razão lipídios/DNA foi também escolhida para estas últimas investigações. Duas séries de amostras foram preparadas da mesma maneira descrita anteriormente, variando 19 pontos ao longo da linha de diluição. Dez delas foram hidratadas com água pura enquanto as outras nove foram hidratadas com soluções salinas. Os experimentos de raios X foram conduzidos na linha síncrotron de alta resolução descrita na Seção 2.3.1. As curvas de espalhamento 1-D, resultantes das preparações com água pura, são exibidas nas Figs. 3.59.

Figura 3.59: Difractogramas de amostras hidratadas com água pura, com membranas com razão PC-Simulsol 50:50. Os picos lamelares são indicados por asteriscos. Os picos associados ao DNA são apontados por setas. Os números entre parênteses são os planos cristalográficos (h, k) de simetrias retangulares 2D. Inserções: WAXS mostrando a fluidez das membranas.

O comportamento de fases geral é bastante similar àquele observado para amostras

preparadas com membranas 70:30 (PC:Simulsol), porém algumas diferenças aparecem. Formulações contendo baixas quantidades de lipídios, isto é, $\phi_{lip} \lesssim 0.370$, são caracterizadas por duas estruturas lamelares em coexistência. Uma destas fases possui ordem de longo alcance, exibindo até três picos de Bragg. Deve ser destacado que para a mesma formulação preparada com uma membrana mais rica em lecitina quatro ordens foram observadas nos difratogramas (ver a amostra com $\phi_{lip} = 0,346$ na Fig. 3.28, por exemplo). Esta observação pode ser interpretada como uma consequência direta da diminuição da rigidez das membranas. A outra fase é de curto alcance, exibindo não mais que dois picos.

Continuando na direção de menores quantidades de água, a formação de um domínio monofásico, com difratogramas compostos por picos igualmente espaçados, é observada. Novamente, esta região é interpretada como um arranjo nemático de cadeias de DNA intercalado nos canais aquosos de fases lamelares. Em algumas destas amostras a presença de um pico difuso convoluído entre a segunda e a terceira ordens lamelares pode ser notada.

Para amostras com $\phi_{lip} = 0,566$ e $\phi_{lip} = 0,603$, o comportamento de fase é bastante complexo. A aparição de simetrias retangulares 2D é observada em ambas as formulações. A mais diluída é indexada por uma coexistência entre uma fase retangular e uma fase lamelar. Na outra amostra, a simetria em coexistência é indexada como sendo uma L_{α}^H . Na extremidade da linha de diluição, a formulação mais concentrada com $\phi_{lip} = 0,636$ apresenta uma estrutura monofásica L_{α}^H .

Os dados da série contendo sal são apresentados na Fig. 3.60. O comportamento de fase é o mesmo das amostras sem sal. Um exceção observável é a região de transição entre os domínios L_{α}^N e L_{α}^H . Aqui, a coexistência entre duas fases lamelares, uma delas contendo claramente um pico nemático, é observada.

Dados da região WAXS novamente mostram o estado fluido das caudas alifáticas em ambos os casos. Os parâmetros estruturais de cela unitária encontrados nestes complexos são destacados na Fig. 3.61. As linhas pontilhadas são guias para os olhos delimitando as fronteiras entre domínios. O domínio *I* é caracterizado pela coexistência entre uma fase de longo alcance e outra de curto alcance. O domínio *II* é uma região monofásica onde os bastões têm orientação nemática no plano das membranas de uma fase esmética. A região *III* é um domínio complexo de coexistência onde fases retangulares aparecem. No domínio menos hidratado, têm-se uma outra região monofásica caracterizada por uma simetria hexagonal.

Comparando-se os parâmetros de rede apresentados na Fig. 3.61 com aqueles obtidos para a outra composição de membrana (Fig. 3.39), observam-se similaridades quantitativas. Os parâmetros de rede das estruturas hexagonais, por exemplo, estão em torno de 65 Å, o mesmo valor obtido antes. A faixa de periodicidades e de distâncias DNA-DNA

Figura 3.60: Difratomogramas 1-D de preparações usando soluções de 0,25 M de acetato de amônio como solvente. A parte lipídica foi obtida a partir da mistura PC-Simulsol na razão 50:50. Picos lamelares são indicados por asteriscos. Picos de DNA são apontados por setas. Detalhe: WAXS mostrando o estado fluido das membranas.

também estão bastante próximos em termos quantitativos. O comportamento de fase acima descrito pode ser sumariado como se segue:

Figura 3.61: Parâmetros estruturais de células unitárias em função da fração de lipídios para preparações com parte lipídica composta de PC-Simulsol na razão 50:50. Quadrados representam a periodicidade lamelar e círculos, a distância entre fragmentos de DNA. Símbolos sólidos correspondem a amostras com água pura, enquanto marcadores vazios representam amostras com soluções salinas.

3.3 Discussões

3.3.1 Variando a quantidade de DNA

Na Fig. 3.62, dados de difração de amostras com diferentes quantidades de DNA são apresentados conjuntamente. Na medida em que a fração volumétrica de água é mantida constante, as periodicidades lamelares resultantes são aproximadamente a mesma para todas as formulações, com $d \approx 73 \text{ Å}$.

Com esta simples comparação, é possível notar duas distâncias de repetição esmética em coexistência para $\rho > 3,1$. A segunda fase lamelar é aparentemente formada com um excesso de lipídios, constituindo uma fase não complexada. Na medida em que a quantidade de DNA aumenta, porém, os picos associados a essa segunda estrutura diminuem em intensidade e, para $\rho = 3,1$, apenas reflexões de uma única fase lamelar são observados. Esta observação é uma clara ilustração da dependência em ρ para a complexação nestes sistemas formulados com lipídios neutros.

Na Fig. 3.63, esta mesma comparação é feita com dados obtidos a partir de membranas com razão 50:50. Desta vez, exceto por um pequeno ombro na curva da formulação com

Figura 3.62: Comparação entre amostras com diferentes valores de ρ , preparadas com membranas com razão PC-Simulsol 70:30. A periodicidade lamelar é aproximadamente a mesma para todas as formulações com $d \approx 73$ $\text{\AA}$.

$\rho = 8,1$ (curva azul na Fig. 3.63(b)), as amostras são monofásicas. Este achado sugere que as propriedades elásticas da fase hospedeira também desempenham papel relevante na complexação. Isso reforça a importância das interações estéricas de ondulação na condução das relações intermoleculares no interior do sistema estudado neste trabalho e suporta, qualitativamente, a abordagem de Flory proposta pelos autores da Ref. [16].

Figura 3.63: Comparação entre amostras com diferentes valores de ρ , preparadas a partir de membranas com razão PC-Simulsol 50:50. A periodicidade lamelar é aproximadamente a mesma para todas as formulações com $d \approx 73$ $\text{\AA}$.

A seguir, algumas consequências da introdução de nucleotídeos nos canais aquosos da

fase hospedeira são discutidas.

3.3.2 Efeitos do DNA no ordenamento esmético de fases L_α

Além da formação de super redes polimórficas inseridas entre membranas, foi observado também que a introdução de DNA tem efeitos dramáticos sobre o grau de ordenamento esmético da fase lipídica. Na Fig.3.64, é apresentada uma comparação entre três curvas de amostras com e sem nucleotídeos que possuem aproximadamente a mesma periodicidade. A composição de membrana neste caso é 70:30. Os sistemas contendo DNA foram investigados sob as duas condições iônicas já descritas, ou seja, com e sem acetato de amônio (0,25 M) no solvente. Pode-se notar que, apesar da grande semelhança de periodicidades, as fases contendo DNA são significativamente mais ordenadas que o sistema equivalente sem nucleotídeos. Este aumento de ordem esmética é claramente evidenciado pela aparição de uma terceira e de uma quarta ordens lamelares, juntamente com o afinamento dos picos de Bragg. O espalhamento difuso também é marcadamente distinto. Enquanto no sistema binário existe um máximo do fator de forma em torno de $q \approx 0,370 \text{ \AA}^{-1}$, no complexo ternário esta região é caracterizada por uma reflexão muito forte (a quarta ordem) próxima a um mínimo do fator de forma. Esta diferença entre os fatores de forma pode estar associada a mudanças introduzidas pelo caráter aniônico do DNA no perfil de densidade eletrônica do sistema [93]. Além disso, como discutido anteriormente, o sinal difuso entre a segunda e a terceira ordem lamelar é oriundo de correlações entre nucleotídeos, ou seja, é devido a uma contribuição do fator de estrutura.

As amostras cujas curvas estão representadas na Fig. 3.64 têm fração de lipídios em torno de 0,51. Esta composição permite colocar os dados de raios X destas formulações no mesmo contexto daquelas amostras analisadas por TEM e exibidas nas Figs. 3.12(c) e 3.40(a), as quais mostram diferenças no espaço direto de amostras com e sem DNA. No caso da formulação livre de nucleotídeos, Fig. 3.12(c), é possível observar as corrugações nas bordas das membranas enquanto na amostra contendo DNA, Fig. 3.40(a), elas virtualmente desaparecem.

Estes achados mostram que a adição de DNA induz um tipo de “endurecimento” no sistema, aumentando o número de camadas correlacionadas e diminuindo a amplitude das flutuações. Numa tentativa no sentido de explicar este efeito, apresentam-se duas conjecturas aqui. Na primeira delas, interações diretas de curto alcance entre membranas adjacentes seriam mediadas pelas partículas inseridas. A natureza “suave” das forças envolvidas na estabilização de fases lamelares (van der Waals, hidratação e ondulações) seria então modificada pela estrutura rígida da cadeia de DNA a qual atuaria como um tipo de “cimento” no complexo. Na segunda conjectura, os bastões entre as bicamadas

Figura 3.64: Comparação das curvas de espalhamento de amostras com e sem DNA. A periodicidade lamelar nos três casos está em torno de $68 \text{ \AA}$. A inserção de nucleotídeos entre as bicamadas aumenta significativamente o ordenamento esmétrico, dando origem à terceira e quarta ordens lamelares assim como à diminuição da largura de todos os picos. Diferenças entre a formulação com e sem sal são desprezíveis.

restringiriam o espaço disponível para as flutuações de membranas, resultando em um efeito puramente estérico onde a repulsão seria reforçada, como tem sido observado em fases lamelares hospedando partículas coloidais esféricas [154–156]. Tal restrição diminuiria a desordem, permitindo o aumento do número de camadas correlacionadas. Além disso, este mecanismo poderia também estar relacionado à formação de redes organizadas de DNA. Na verdade, em outros estudos na literatura, a aparição de fases ordenadas no seio de fases multilamelares parece ser intimamente ligada à redução de flutuações. Nas Refs. [66] e [157], fases retangulares centradas aparecem associadas a transições $L_\alpha \rightarrow L_\beta$. Na Ref. [67], uma rede retangular simples surge com a diminuição de temperatura e, em um trabalho recente do nosso grupo [20], fases hexagonais são obtidas através de confinamento em amostras orientadas. Em todos esses casos, um aspecto comum é a redução das flutuações de membranas de modo que este último poderia ser um agente geral conduzindo o comportamento de fase.

Com o objetivo de se obter alguma estimativa quantitativa deste efeito, uma amostra típica do domínio L_α^N , com $\rho = 3,1$ e $\phi_{lip} = 0,508$ e passo esmétrico $d = 66,4 \text{ \AA}$, foi selecionada e ajustada de acordo com o mesmo procedimento descrito na Seq. 3.1.1. Deve ser enfatizado que o modelo de Nallet et al. foi originalmente desenvolvido para descrever o espalhamento de radiação por fases liotrópicas lamelares puras (membranas + solvente)

e, portanto, não leva em conta a presença de nucleotídeos entre as bicamadas. No entanto, esse mesmo modelo já foi usado em outros trabalhos para descrever dados de raios X de fases lamelares dopadas com polímeros [94, 95]. Aqui, para amostras do domínio L_α^N , o pico de DNA é bem localizado entre a segunda e a terceira ordem lamelar. Tendo em vista que a faixa de interações entre nucleotídeos é curta, contribuições de ordens superiores devido a correlações DNA-DNA são assumidas como desprezíveis. Portanto, se a região contendo o pico difuso é excluída do processo de ajuste, o fator de estrutura do sistema ternário é, em uma primeira aproximação, descrito por $S(q)$ tal como ele dado na Eq. 1.22. Por outro lado, a parte relacionada ao fator de forma não é corretamente modelada pela abordagem de Nallet et al. Então, para os propósitos dos estudos conduzidos aqui, os parâmetros de $P(q)$ são deixados completamente livres para serem ajustados e os valores obtidos não têm significado físico. O melhor ajuste obtido com a tentativa descrita acima é mostrado na Fig. 3.65.

Figura 3.65: Difratoograma de uma amostra típica do domínio L_α^N , com $\phi_{lip} = 0,508$ (70:30 PC-Simulsol) e $\rho = 3,1$, ajustada com o modelo de Nallet et al. O pico difuso oriundo da correlação DNA-DNA, em cinza, foi excluído do processo de ajuste o qual levou aos seguintes parâmetros: $d = 66.4 \text{ \AA}$ e $\eta = 0.02(1)$. N foi estimado em 60 camadas. Inserção: fator de estrutura do sistema contendo DNA comparado com uma amostra equivalente da fase hospedeira sem nucleotídeos.

Comparando o difratograma apresentado na Fig. 3.65 e uma amostra binária com periodicidade equivalente (vide a amostra com $\phi_{lip} = 0,550$ na Tab. 3.1 e Fig. 3.17(a)), o parâmetro de Caillé diminui de $\eta = 0,13(1)$, no sistema sem DNA, para $\eta = 0,02(1)$, quando nucleotídeos são inseridos entre membranas. Semelhantemente, a amplitude das

flutuações, calculadas com a Eq. 3.3, diminuem de $\sigma = 7,6(5)$ Å para $\sigma = 3,2(1,0)$ Å. Apesar destes resultados serem apenas estimativas grosseiras, eles permitem declarar que a incorporação de DNA na fase esmética aumenta o ordenamento por um fator ≈ 6 , em termos de η , enquanto a amplitude de flutuações é reduzida. Deve ser observado que estes efeitos não estão associados a transições de fase $L_\alpha \rightarrow L_{\beta'}$ nas membranas, uma vez que o pico difuso na região de alto ângulo aparece em todos os casos. Por outro lado, tal comportamento é invariante sob adição de sal. Portanto, o incremento de ordem aparentemente é induzido por interações estéricas entre cilindros de DNA e bicamadas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS DINÂMICOS

4.1 Simulações

Algumas simulações foram realizadas com o objetivo de testar o conceito introduzido na Seq. 1.8 e avaliar a consistência do procedimento de análise. A idéia básica consistiu no uso da equação de dinâmica Browniana, 1.26, para gerar imagens de FRAP para serem ajustadas posteriormente pela expressão 1.33.

Estes “experimentos virtuais” foram desenvolvidos com uma rotina em ambiente Matlab gentilmente fornecida pelos autores da Ref. [113]. Além disso, o código original foi modificado para contemplar o caso de difusão anisotrópica de fragmentos de DNA no interior de fases lamelares. Esse software permitiu a simulação de difusão no interior de apenas um canal aquoso. Uma segunda ferramenta computacional, especialmente construída com a plataforma *ImageJ* [158], foi usada para fazer a convolução de várias camadas e contemplar o cenário de membranas homeotropicamente alinhadas ao longo do eixo óptico do microscópio. Para tornar essas imagens geradas artificialmente mais realistas, um ruído aleatório de 2 % foi introduzido. Os parâmetros simulados foram os coeficientes de difusão $D_{\parallel}$ e $D_{\perp}$, o intervalo de tempo entre registros, o número total de imagens geradas, a duração do processo de bleach e a relação de escala do experimento.

4.1.1 Caso isotrópico

O caso de difusão isotrópica foi estudado numa primeira etapa. Uma sequência temporal de imagens de FRAP foi gerada com $D_{\parallel} = D_{\perp} = 0,025\mu m^2/s$. A duração do pulso de bleach foi definida em 2 s e o fator de escala foi mantido em 0,05 pixel/ μm . O número

total de imagens foi 15, totalizando 30 segundos de difusão. Na Fig. 4.1, alguns exemplos selecionados dessa série de imagens são exibidos juntamente com seus respectivos perfis espaciais.

Figura 4.1: (a)-(c) Evolução tempo de manchas de bleach simulando difusão isotrópica. Em (d), os perfis espaciais aparecem ajustados por funções Gaussianas.

A evolução temporal da mancha de bleach é facilmente observada, com um aumento significativo da largura seguido da diminuição da amplitude ao longo do tempo. O perfil de fluorescência é perfeitamente ajustado por funções Gaussianas, o que atesta o caráter isotrópico da difusão. A evolução temporal das variâncias ao longo do processo é exibido na Fig. 4.2. A taxa de mobilidade é extraída a partir da inclinação da reta ajustada, fornecendo um valor de $D = 0,0257(4)\mu m^2$, em excelente acordo com o valor simulado.

4.1.2 Caso anisotrópico

Após a análise desse caso mais simples de difusão isotrópica, a atenção foi concentrada no caso anisotrópico. Como um passo preliminar, uma série temporal de imagens de FRAP, simulando o processo difusivo no interior de apenas UMA camada, foi produzida com $D_{\parallel} = 2,5 \times 10^{-3}\mu m^2$ e $D_{\perp} = 2,5 \times 10^{-3}\mu m^2$. O intervalo entre registros foi estipulado

Figura 4.2: Comportamento temporal da variância de manchas de bleach ao longo de uma série simulando difusão isotrópica. A inclinação da reta ajustada fornece um valor de $D = 0,0257(4)\mu m^2/s$ para o coeficiente de difusão.

em $\Delta t = 10s$, com um número total de 15 imagens geradas. O fator de escala foi o mesmo utilizado no caso anterior.

Como esperado, as manchas resultantes apresentaram forma elíptica com os semi-eixos maior e menor paralelos à $D_{\parallel}$ e $D_{\perp}$, respectivamente. Visto que a taxa de mobilidade é simulada com base no movimento Browniano, o perfil espacial ao longo dos semi-eixos são adequadamente descritos por funções Gaussianas. Um exemplo típico dessas manchas anisotrópicas é apresentado juntamente com o respectivo perfil 3D na Fig. 4.3. A forma elíptica é explicitada. Na imagem 3D, é possível observar o perfil Gaussiano ao longo do semi-eixo maior.

A projeção ao longo do eixo z foi obtida realizando-se a média de 180 manchas elípticas, rotacionadas em passos de 1 grau em torno de seu centro. Este procedimento é equivalente à média angular realizada na Eq. 1.30 e corresponde à superposição de várias camadas equivalentes com diretores nemáticos locais distribuídos no intervalo $[0, \pi]$. As manchas resultantes desse procedimento têm simetria circular bastante semelhante àquela observada no caso isotrópico (Fig. 4.1(b)).

Os perfis de intensidade de fluorescência ao longo de secções transversais, no entanto, são bem diferentes da forma Gaussiana observada na difusão isotrópica. Na Fig. 4.4, uma imagem resultante deste processo é apresentada junto com seu respectivo perfil espacial. As linhas sólidas em 4.4(b) correspondem a ajustes feitos com uma função Gaussiana (em vermelho) e pela forma modificada na Eq. 1.33 (verde). O caráter não-gaussiano fica

Figura 4.3: Mancha de FRAP simulando difusão anisotrópica no interior de uma única camada aquosa onde as partículas apresentam ordem local nemática.

evidenciado, especialmente na região das caudas e do pico, onde os dados estão muito longe da curva tradicionalmente utilizada no caso isotrópico. Pelo contrário, os dados são muito melhor descritos pela forma funcional de 1.33, com dois parâmetros distintos. A queda mais suave das caudas, assim como os picos mais pronunciados, são satisfatoriamente ajustados neste último caso.

O comportamento temporal das duas variâncias ajustadas, $w_{\parallel}^2$ e $w_{\perp}^2$, é apresentado na Fig.4.5. Os coeficientes de difusão encontrados são $D_{\parallel} = 0,0220(7)\mu m^2/s$ e $D_{\perp} = 0,0023(1)\mu m^2/s$. Estes valores estão em bom acordo com os parâmetros simulados, especialmente no que diz respeito à relação de anisotropia $D_{\parallel}/D_{\perp} = 9,6$ (para um valor esperado de 10).

É importante destacar que as simulações descritas acima foram realizadas de forma *independente* do procedimento de análise. Em outras palavras, a equação utilizada para ajustar os dados não foi empregada na criação da imagens FRAP. As séries temporais foram geradas a partir da expressão bidimensional da difusão Browniana, Eq. 1.26, enquanto a convolução das várias camadas foi obtida por adição e média de vários frames rotacionados.

O fato do modelo permitir a distinção entre os casos isotrópico e anisotrópico, e fornecer valores quantitativos de coeficientes de difusão em estreito acordo com os simulados, confirma a robustez da proposição de Dobrint. Com essa certificação acerca da confiabilidade do modelo, a etapa seguinte foi voltada a experiências com sistemas reais.

Figura 4.4: (a) Imagem de FRAP resultante da soma e média de 180 frames, uniformemente girados no intervalo $[0, \pi]$. (b) Perfil espacial da intensidade de fluorescência. As linhas sólidas correspondem a ajustes por uma função gaussiana (vermelho) e pela forma modificada proposta na Eq. 1.33 (verde).

4.2 Experimentos

4.2.1 Sistema DNA-água: difusão isotrópica

As investigações sobre dinâmica foram iniciadas pela análise da difusão de fragmentos de DNA em uma solução aquosa, sem a presença fase lipídica lamelar. O objetivo desta etapa preliminar foi a sondagem dos parâmetros instrumentais envolvidos nos ensaios de FRAP, além da obtenção de experiência com o procedimento de análise sob condições experimentais reais.

Um estudo sistemático de difusão em soluções aquosas de DNA, usando a mesma ferramenta de análise empregada neste trabalho, foi realizado anteriormente na Ref. [109]. Aqui, são apresentados os resultados obtidos para uma amostra contendo 80 mg de DNA por ml ¹. Nesta concentração, é previsto que os fragmentos estejam na fase isotrópica, perto da fronteira com o chamado *domínio pré-colestérico* [31]. Uma cela de vidro construída a partir de um conjunto de lâmina e lamínula para microscopia foi preparado de acordo com o procedimento descrito na Sec. 2.6. A duração do pulso de *bleach* foi de 500 ms. O intervalo entre registros foi fixado em 326 ms e o número total de imagens gravadas foi de 13.

¹Os experimentos em soluções aquosas de DNA foram realizados em colaboração estreita com Cássio Alves, estudante de doutoramento do IFUSP.

Figura 4.5: Comportamento temporal das duas variâncias obtidas a partir da Eq. 1.33 para dados simulados. Os coeficientes de difusão obtidos são $D_{\parallel} = 0,0220(7)\mu m^2/s$ e $D_{\perp} = 0,0023(1)\mu m^2/s$, em bom acordo com os valores simulados.

Três exemplos selecionados das séries temporais obtidas a partir desta amostra são exibidos na Fig. 4.6. Apesar do sinal de fluorescência ser bastante ruidoso devido à concentração relativamente baixa de fluoróforos, é possível observar que formas Gaussianas dão uma descrição muito boa para os perfis ao longo das manchas. Este comportamento corresponde à assinatura clássica de difusão Browniana em meios isotrópicos.

O comportamento temporal das variâncias dos perfis de bleach é exibido na Fig. 4.7. A partir da inclinação da reta ajustada, o valor de $D = 25,6(1,4)\mu m^2/s$ é obtido. Este valor é um pouco menor do que aquele previsto para bastões de mesmo fator de aspecto em soluções não-interagentes, $D_{teor} = 30\mu m^2/s$ [103,104,108]. Portanto, pode-se concluir que as partículas estão provavelmente em um regime de fraca interação, fato que concorda com um estado intermediário antes de transições isotrópico-colestéricas observadas em concentrações ligeiramente superiores, $C_{DNA} \approx 100$ mg/ml [31,58].

4.2.2 Complexos DNA-lipídio-água: difusão anisotrópica

Em uma etapa posterior, foi possível obter amostras bem orientadas para duas composições do sistema ternário DNA-lipídio-água com frações volumétricas, respectivamente, iguais a $\phi_{wt} = 0,50$, $\phi_{DNA} = 0,08$ e $\phi_{lip} = 0,42$ para a amostra mais hidratada, com uma carga relativamente menor em nucleotídeos, e $\phi_{wt} = 0,38$, $\phi_{DNA} = 0,15$ e $\phi_{lip} = 0,47$ para a outra amostra, mais rica em DNA. Imagens em microscopia de luz polarizada e

Figura 4.6: Manchas de bleach observadas um experimento de FRAP em solução aquosa de DNA com concentração de 80 mg/ml. Abaixo de cada spot, o perfil de fluorescência correspondente aparece devidamente ajustado por uma função gaussiana.

fluorescência destas formulações são mostradas na Fig. 4.8, onde as regiões de interesse selecionadas para o FRAP são delimitadas por círculos vermelhos pontilhados. Note-se que estas zonas têm ancoramento homeotrópico, como atesta o padrão escuro observado sob polarizadores cruzados.

Ambas as amostras são macroscopicamente homogêneas e seus difratogramas em SAXS, mostrados na Fig. 4.9 com 4 picos Bragg na proporção 1:2:3:4, são característicos de um empilhamento multilamelar [19]. Embora apenas a formulação menos hidratada apresente o pico difuso associado à ordem nemática dos fragmentos confinados entre as membranas, a outra amostra muito provavelmente também apresenta essa mesma estrutura. Para esta última composição, a partir de raios-X, é possível determinar que os canais aquosos possuem largura de 39,7 Å implicando que bastões de DNA com 500 Å de comprimento permaneçam restritos ao plano das membranas. A concentração de DNA em água é muito superior à concentração que permitiria distribuição isotrópica das partículas - estimada em torno de $\phi_{DNA} = 0,03$ - e, portanto, uma estrutura desordenada de DNA é inverossímil [19, 24].

Figura 4.7: Evolução temporal da variância, obtida a partir de ajustes Gaussianos, para FRAP em solução aquosa contendo DNA a 80 mg/ml. A inclinação da reta fornece um valor de $D = 25,6(1,4)\mu m^2$.

Os experimentos foram realizados com uma objetiva de $40\times$ e a duração do bleach foi de 4 s para ambas as amostras. Para a formulação mais rica em DNA, o intervalo de tempo entre as imagens gravadas foi de 20 s e o número total de imagens foi de 80. Para a outra composição, o intervalo de tempo entre as imagens foi de 15 s, enquanto o número total de registros foi de 40.

Nas Figs. 4.10, exemplos selecionados da região de bleach são exibidos juntamente com seus respectivos perfis 3D (falsa cor). As manchas têm simetria circular em toda a série, com as intensidades de fluorescência e as larguras dos perfis claramente em evolução no tempo.

Os perfis de recuperação de fluorescência desviam significativamente da forma Gaussiana para ambas as amostras, onde funções considerando apenas um coeficiente de difusão não são capazes de descrever adequadamente a região de cauda dos dados. Estes desvios são claramente delineados na Fig. 4.12, onde dados típicos destas séries são comparados a ambos os tipos de ajustes aqui utilizados, seja a uma função Gaussiana ou à forma de Bessel modificada Eq. 1.33.

Como exemplo ilustrativo, a evolução temporal dos primeiros 28 perfis de fluorescência para a amostra com $\rho = 5,1$ são exibidos na Fig. 4.13 juntamente com ajustes Gaussianos e ajustes por funções de Bessel modificadas (linhas vermelhas). A análise desses perfis ao longo do tempo revela que, quando a distribuição espacial de fluorescência desvia da forma Gaussiana em um dado instante t , esse desvio ocorre sistematicamente para

Figura 4.8: Imagens de polarização e fluorescência sobre amostras ternárias. Regiões homeotropicamente orientadas, indicadas por círculos vermelhos pontilhados nas imagens de polarização, foram selecionadas para a realização de FRAP. Além disso, a homogeneidade da fluorescência assegura a presença de um domínio monofásico.

qualquer instante $t' > t$. Esta observação indica que as formas não-Gaussianas dos perfis não podem ser atribuídas à saturação no instante inicial do processo de bleach, uma vez que um processo de relaxação levaria a formas Gaussianas no limite de tempos longos.

O comportamento temporal das variâncias obtidas a partir do ajuste 1.33 aos perfis de fluorescência da amostra com $\rho = 5.1$ são exibidos na Fig. 4.14. Estes parâmetros são claramente distintos em todos os instantes ao longo da série, o que evidencia, agora em termos quantitativos, a forma não Gaussiana dos perfis mencionados acima. Importante ressaltar que essas variâncias também são distintas para $t = 0s$, enquanto a descrição do modelo dada pela Eq. 1.33 implica em uma forma inicialmente Gaussiana. Este desvio pode estar associado à forma do feixe do laser ao longo do eixo óptico, o qual seria similar a um hiperbolóide de revolução e não a um cilindro. Neste caso, a projeção das várias

Figura 4.9: Difrátogramas de raios X obtidos a partir das duas formulações analisadas em experimentos de FRAP: ○ correspondem à amostra com $\rho = 5.1$ e periodicidade $d = 76,2$ Å. △ representam dados da amostra com $\rho = 3,1$ e $d = 69$ Å.

fatias nas diferentes alturas do feixe resultaria em uma mancha, com simetria azimutal, cujo perfil ao longo da secção transversal desvia da forma Gaussiana.

Os coeficientes de difusão obtidos são $D_{\parallel} = 1,3(1) \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D_{\perp} = 2,8(1) \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, o que leva a uma taxa de anisotropia $D_{\parallel}/D_{\perp} \approx 4.5(5)$. Observe-se que os valores absolutos da constante de difusão são várias ordens de grandeza menores que aquele encontrado em soluções aquosas na fase isotrópica, refletindo, em parte, os efeitos da concentração e do confinamento sobre as propriedades dinâmicas.

Resultados bastante semelhantes são obtidos para a amostra mais rica em DNA. A aparição sistemática de perfis não Gaussianos foi encontrada ao longo da série e o comportamento temporal das variâncias obtidas a partir do ajuste de 1.33 é mostrado na Fig. 4.15. Foi observado que, nos instantes iniciais (até $t \approx 250\text{s}$), nem a função Gaussiana, nem o modelo de Bessel modificada, foram capazes de fornecer uma descrição satisfatória para os dados experimentais. Essa discrepância pode ser atribuída, possivelmente, para às aproximações feitas na derivação do modelo. No entanto, isso implica em sua invalidação, pelo menos no limite de tempos longos. Como fato objetivo temos que, na Fig. 4.15, ambas as variâncias são bem descritas para $t \geq 250$ s. Não obstante a falha do modelo

(a) $t = 0$ s (b) $t = 0$ s (c) $t = 300$ s (d) $t = 300$ s (e) $t = 600$ s (f) $t = 600$ s

Figura 4.10: Evolução temporal da zona de bleach juntamente com os respectivos perfis 3D (falsa cor). A relação lipídios-DNA é $\rho = 5,1$, com fração de água $\phi_{wt} = 0,498$.

(a) $t = 0$ s (b) $t = 0$ s (c) $t = 800$ s (d) $t = 800$ s (e) $t = 1600$ s (f) $t = 1600$ s

Figura 4.11: Evolução temporal da zona de bleach para amostra com $\rho = 3,1$ e $\phi_{wt} = 0,376$, junto com os respectivos perfis 3D (falsa cor).

para t próximo a zero, esse comportamento na região de tempos longos é uma assinatura usual de dinâmica Browniana. Neste caso, consideramos aqui que as inclinações das retas na Fig. 4.15 estão diretamente relacionadas aos dois coeficientes de difusão, $D_{\parallel}$ e $D_{\perp}$. Em termos quantitativos, os coeficientes de difusão obtidos são $D_{\parallel} = 2,7(2) \times 10^{-3} \mu m^2/s$ e $D_{\perp} = 6,6(5) \times 10^{-5} \mu m^2/s$, com taxa de anisotropia $D_{\parallel}/D_{\perp} \approx 40(5)$.

A partir dos resultados acima descritos, o modelo proposto na Sec. 1.8 provou ser adequado para a análise de perfis de FRAP na difusão de DNA entre bicamadas lipídicas. Ainda que a convolução dos perfis de fluorescência ao longo do eixo óptico leve a manchas axialmente simétricas, é possível extrair os coeficientes de difusão paralelo e perpendicular ao vetor diretor da fase nemática na qual os fragmentos se encontram alinhados [24].

Tanto o confinamento quanto a concentração foram simultaneamente variados neste complexo ternário, com frações volumétricas de DNA (com relação ao solvente) e largura dos canais aquosos, respectivamente, iguais a 16% e 39,7 Å para uma das amostras, e 44,7% e 32,5 Å para a outra formulação. Visto que o diâmetro dos bastões é de cerca de 20 Å, em ambos os casos as partículas estão altamente confinadas.

A taxa de anisotropia entre os coeficientes paralelo e perpendicular aparecem intimamente relacionadas à concentração. Para a formulação contendo uma carga mais baixa de nucleotídeos, esta taxa foi de $\approx 4,5$, enquanto para a composição mais rica em DNA esse valor foi de ≈ 40 . Este comportamento é qualitativamente consistente com simulações numéricas [32, 159], onde a anisotropia aumenta com o incremento de ordem nemática, o que é naturalmente esperado acontecer com o aumento de concentração. Por outro lado, este comportamento também é consistente com o aumento do confinamento imposto pelas paredes membranares.

(a) $t = 300\text{ s}$, $\rho = 5, 1$, Ajuste Gaussiano.

(b) $t = 300\text{ s}$, $\rho = 5, 1$, Ajuste de Bessel modificada.

(c) $t = 800\text{ s}$, $\rho = 3, 1$, Ajuste Gaussiano.

(d) $t = 800\text{ s}$, $\rho = 3, 1$, Ajuste de Bessel modificada.

Figura 4.12: Dados de recuperação de fluorescência obtidos a partir de amostras homeotropicamente orientadas. As linhas sólidas em vermelho são ajustes de funções Gaussianas (à esquerda) ou à forma funcional Eq. 1.33.

Figura 4.13: Evolução temporal dos 28 primeiros perfis de recuperação de fluorescência para amostra com $\rho = 5,1$ ajustados segundo (a) funções Gaussianas e (b) de acordo com a Eq. 1.33.

Figura 4.14: Comportamento temporal dos dois parâmetros de variância extraídos com a Eq. 1.33 para uma amostra ternária com $\phi_{DNA} = 0,08$. As linhas correspondem a ajustes lineares aos dados, levando à coeficientes de difusão $D_{\parallel} = 1,3(1) \times 10^{-2} \mu m^2$ (○) e $D_{\perp} = 2,8(1) \times 10^{-3} \mu m^2$ (△).

Figura 4.15: Comportamento temporal dos dois parâmetros de variância para um domínio orientado em uma amostra com $\rho = 3,1$. As inclinações dos ajustes lineares levam à coeficientes de difusão $D_{\parallel} = 2,7(2) \times 10^{-3} \mu m^2/s$ (○) e $D_{\perp} = 6,6(5) \times 10^{-5} \mu m^2/s$ (△).

CONCLUSÕES

Ao longo da presente tese, as propriedades estruturais e dinâmicas de um complexo hidratado entre fragmentos de DNA (150 pb) e membranas zwitteriônicas foram estudadas. A fase hospedeira foi obtida a partir da adição de PCs e Simulsol, uma mistura de tensoativos eletricamente neutros. Os nucleotídeos foram obtidos por sonicação de longas cadeias de DNA. Uma contribuição do trabalho ao estado da Arte é o levantamento sistemático do diagrama de fases deste sistema, incluindo a região de baixa hidratação, estudada aqui pela primeira vez. A completa incorporação de nucleotídeos pela fase hospedeira ocorre apenas quando grandes quantidades de DNA estão presentes no sistema, denotando importância maior de interações de volume excluído na complexação e no comportamento de fase. Além disso, análises sobre a interação intermembranar no interior da matriz lamelar sugerem que forças de flutuação e de hidratação são atores importantes no complexo. Um outro resultado proveniente desta tese é a validação de uma proposição teórica para a extração de coeficientes de difusão anisotrópica nas condições bastantes particulares onde fases ordenadas de DNA encontram-se inseridas nos canais aquosos de uma fase lamelar com orientação homeotrópica.

Três características singulares dos complexos merecem ser sublinhadas nestas considerações finais. Primeiro, a ausência de carga líquida nas membranas permite excluir a atração DNA-membrana como um agente direto na complexação. Como consequência, este fato oferece uma condição singular para a investigação de outras interações, particularmente aquelas de origem entrópica, no balanço de forças em geometrias nanoscópicas confinadas. Em segundo lugar, visto que o sistema é formulado abaixo de seu limite de hidratação, a organização das partículas entre as bicamadas é governada através do *confinamento* exercido pela matriz fluida. Uma terceira característica peculiar ao sistema é o fato de que o solvente fica restrito ao espaço entre as membranas, sem trocas com

uma solução em *bulk*. Este atributo provavelmente tem consequências diretas no processo de liberação de contra-íons. Uma vez que os íons Na^+ permanecem aprisionados entre as membranas, o ganho entrópico associado à sua liberação deve ser limitado quando comparado com a situação onde os íons são expulsos do espaço intermembranar e têm liberdade para ganhar entropia de translação numa solução. Este contexto exige mudanças na interpretação tradicional do mecanismo implicado na formação de lipoplexos, onde os contra-íons têm papel central. Por consequência, um outro mecanismo deve entrar em cena, envolvendo possivelmente efeitos interfaciais. O mecanismo exato que induz correlações entre DNA e membranas não é claro e permanece uma questão difícil de ser respondida. Um problema está relacionado ao fato de que, à primeira vista, o DNA não deveria se inserir entre bicamadas lipídicas, pois um cenário onde cargas aparecem rodeadas por um meio de baixa constante dielétrica não deveria ser favorecido. Uma perspectiva para abordar experimentalmente este ponto seria a realização, no futuro, de um estudo da absorção de nucleotídeos em interfaces óleo-água através da preparação de filmes de Langmuir a partir de surfactantes zwitteriônicos e soluções de DNA.

O trabalho foi iniciado com o estudo da fase hospedeira, isto é, o sistema sem DNA composto apenas por lipídios e solvente. Uma análise detalhada mostrou que esta matriz se auto-organiza em fases lamelares ao longo de uma vasta gama de hidratações. Esta afirmação é suportada por dados de raios X e também por observações em microscopia óptica e eletrônica. Dois regimes característicos são encontrados no domínio de diluição: o primeiro é governado por uma lei de diluição usual do tipo $d = \delta_m / (1 - \phi_{wt})$, explicitando a relação linear entre periodicidade e quantidade água. Além disso, a análise do comportamento do parâmetro de Caillé mostrou que as interações repulsivas entre membranas são descritas por um balanço misto entre forças de Helfrich e de hidratação. Aplicando-se uma proposição feita por Petrache et al. [132], foi possível determinar que o comprimento de alcance desta interação “híbrida” é cerca de três vezes maior que os valores usualmente encontrados em sistemas baseados puramente em lecitinas (sem co-surfactantes). Estes achados mostram que a adição de Simulsol às membranas incrementa a importância de forças entrópicas no sistema, além de ampliar o domínio de diluição.

Em uma etapa seguinte, complexos contendo DNA foram também investigados. As propriedades de diluição da fase hospedeira foram usadas para controlar o passo esmético e ajustar o confinamento imposto pelas paredes lipídicas sobre os nucleotídeos inseridos no interior dos canais aquosos. Além dos contra-íons de sódio responsáveis pela neutralização dos grupos fosfatos do DNA, não foram introduzidos outros íons para mediar a complexação. Um rico polimorfismo de mesofases de DNA, inseridas entre lamelas lipídicas, foi demonstrado. A formação de domínios monofásicos foi encontrada em íntima correlação

com a quantidade de nucleotídeos no sistema, tendo sido observada apenas para formulações ricas em DNA, quando a composição da membrana era baseada em lipídios na proporção 70:30 (PC:Simulsol). Isto sugere um papel proeminente das limitações ligadas ao empacotamento do sistema e de forças de curto alcance na complexação. O confinamento teve efeitos dramáticos sobre o arranjo supramolecular do complexo. Modelos geométricos simples foram propostos e se mostraram uma maneira adequada para descrever tais organizações, especialmente quando as separações entre membranas são grandes o suficiente para acomodar bastões de DNA sem a necessidade de deformações das bicamadas. Deve ser notado que as transições de fase nas redes de DNA não estão associadas a transições $L_\alpha \rightarrow L_{\beta'}$ nas membranas.

Quando a proporção entre PC e Simulsol no sistema é 50:50, a completa incorporação de nucleotídeos às lamelas também é observada para quantidades menores de DNA. No entanto, o comportamento de fase em função da hidratação (ou em função do confinamento) permanece bastante semelhante àquele encontrado em complexos preparados com a outra (provavelmente mais rígida) composição de membranas. Além disso, a introdução de sal, que presumidamente diminui o ganho entrópico associado à liberação dos contra-íons de sódio [63], também não teve efeitos observáveis na formação do complexo. Esta constatação está em acordo com o modelo tipo Flory apresentado na Ref. [16]. Por outro lado, o confinamento parece ser o agente predominante na organização da partículas no interior da matriz lamelar.

A adição de fragmentos de DNA aumenta o nível de ordenamento das fases esmécticas e um mecanismo baseado na redução das flutuações membranares é sugerido. A redução do espaço entre membranas implica na diminuição do grau de liberdade para as flutuações, permitindo a organização do DNA em estruturas fortemente correlacionadas. Uma abordagem usando o modelo de Nallet et al. foi aplicada a este sistema numa tentativa de quantificar este efeito. Os resultados mostram que as flutuações decaem de aproximadamente uma ordem de grandeza quando da inserção de DNA na fase hospedeira. No entanto, visto que o modelo de Nallet et al. não foi originalmente desenvolvido para dar conta das partículas inseridas na fase lamelar, o método forçosamente não é capaz de descrever completamente as curvas de espalhamento. Uma perspectiva bastante promissora para uma descrição adequada dos fatores de forma e de estrutura de um complexo DNA-lipídio-água está em curso de desenvolvimento por Oliveira et al. [160]. Esta proposta é baseada em técnicas de elementos finitos que são empregadas na simulação de curvas de espalhamento de raios X (ou neutrons eventualmente). Isso permitira desacoplar os fatores de forma e estrutura associados ao complexo. Um exemplo deste tipo de cálculo é mostrado na Fig. 4.16.

Figura 4.16: Simulação com método de elementos finitos: (a) Pilhas de lipídios com bastonetes de DNA entre as membranas, construídas a partir de sub-unidades esféricas. (b) Difratoogramas resultantes do modelo (figuras cordialmente cedidas por C.L.P. Oliveira).

No que tange às análises dinâmicas, o modelo proposto por Dobrindt mostrou-se capaz de analisar perfis de fluorescência nas condições de simetria do sistema estudado aqui: fases nemáticas locais de DNA, promediadas ao longo de um eixo perpendicular aos diretores nemáticos. Ainda que a projeção de diversos perfis elípticos conduza a uma mancha de FRAP de simetria axial, os coeficientes de difusão paralelo e perpendicular à direção nemática puderam ser obtidos usando essa abordagem. O confinamento e a concentração de DNA foram variados simultaneamente, com razão lipídios/DNA e largura dos canais aquosos, respectivamente, $\rho = 5, 1$ e $39, 7$ Å para uma amostra, e $\rho = 3, 1$ e $32, 5$ Å para a outra. Visto que o diâmetro do DNA mais uma camada de hidratação é cerca de 24 Å, em ambos os casos, o confinamento é alto. O confinamento dos fragmentos pelas bicamadas lipídicas parece ser bastante eficaz na redução do movimento das partículas, pois foram observados coeficientes de difusão mais baixos na amostra mais confinada. Por outro lado, o aumento da anisotropia de difusão, $D_{\parallel}/D_{\perp}$, pode, em princípio, ser atribuído a um efeito de concentração. Investigações mais detalhadas, as quais se encontram além do escopo deste trabalho, precisariam ser empreendidas para esclarecer essa questão. Este fato abre uma perspectiva de estudos dos efeitos interfaciais implicados na interação entre DNA e membranas, posto que a fricção das partículas no plano das membranas muito provavelmente depende também do confinamento. As análises estruturais e dinâmicas

levadas a termo neste trabalho devem ser vistas de forma complementar, uma vez que foi demonstrado que o perfil de fluorescência também carrega informação acerca da estrutura.

A maioria dos resultados aqui apresentados foram objetos de publicação ao longo do trabalho, podendo ser encontrados nas Refs. [19, 20, 24]. Novos trabalhos, explorando os efeitos da mudança de composição de membrana sobre o comportamento de fase, estão em andamento e deverão ser publicados num futuro próximo.

APÊNDICE A

PROTOCOLOS

A.1 Dessalagem de DNA e sonicação

- Em um tubo de ensaio, pôr 100 mg de DNA (timo de boi) + 10 ml de água pura. Agitar durante 1 ou 2 horas e então deixe descansar uma noite.
- Adicione 1/10 deste volume de acetato de sódio a 3 M, pH 5,2 (solução de acetato de sódio para biologia molecular, Sigma-Aldrich. Ref. S7899-500ml).
- Então adicione 2,5 vezes o volume (25 ml) de etanol ultra puro e agite. Vê-se o DNA precipitar como um algodão. Congele a -20°C durante a noite.
- No dia seguinte, centrifugue o tubo a 5200 rpm (3500g) por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante é descartado e o DNA é retirado em 10 mL de etanol 70%.
- Agite o tubo manualmente e deixe à temperatura ambiente por 1 hora. Então centrifugue do mesmo modo, 5200 rpm, 4°C , por 15 minutos.
- Após a terceira repetição do processo acima, o sobrenadante é descartado e então o DNA é seco em um evaporador rotatório por 20 minutos para remover qualquer traço de etanol (40°C a temperatura máxima para não degradar o DNA, pressão baixa).
- Caso haja água não evaporada não é um problema, visto que o DNA será diluído em H₂O para sonicação.
- O DNA é então colocado em H₂O, a 10 mg/ml. Então os tubos são sonicados em um banho de ultrassom. Esta técnica é preferida ao invés de um sonicador com ponteira

porque esta última polui o sistema (partículas de titânio que se despreendem da ponteira).

- A sonicação no banho é longa, demandando 33 horas. Durante este tempo, os tubos devem ser mantidos dentro de uma mistura de água líquida e gelo para controlar a temperatura do banho.
- Após cerca de 30 horas de sonicação, inspecionar o tamanho das cadeias por eletroforese.
- Se o tamanho está OK, congele as amostras e faça liofilização padrão.

A.2 Marcação do DNA

YOYO-1 (491/509) da Invitrogen é comprado em soluções de 1 mM. Para preparação de 150 mg de DNA marcado com YOYO:

- Coloque 150 mg de fragmentos de DNA sonicado (liofilizado) e em água pura ($\approx 10\text{ml}$).
- Agite por 1 hora.
- Adicione $49,5\ \mu\text{l}$ da solução-mãe de YOYO.
- Agite por 1 hora, **ao abrigo da luz**.
- Congele a -80°C por 2 horas (mínimo) antes da liofilização.

A.3 Preparação de lipídios

Para a preparação de 1 g de premix (PC-Simulsol 70:30):

- Pôr 300 mg de Simulsol em um tubo de ensaio.
- Adicione 700 mg de PC.
- Adicione 15 ml de ciclohexano.
- Agite por 1 hora.
- Congele a -80°C antes de liofilizar.

APÊNDICE B

COMPRIMENTO DE CORRELAÇÃO

Considere uma cadeia finita periódica (período d) .

Figura B.1: Cadeia finita periódica.

Seja um tamanho arbitrário ao longo da cadeia dado por:

$$L = (N - 1) \cdot d \quad (\text{B.1})$$

O fator de estrutura ideal é dado por:

$$\begin{aligned} S(q) &= \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \sum_{l=1}^N \exp[-iq(k-l)d] \\ &= \frac{1}{N} \left| \sum_{k=1}^N \exp[-iqdk] \right|^2 \\ &= \frac{1}{N} \left| \frac{1 - \exp[-iNqd]}{1 - \exp[-iqd]} \right|^2 \\ &= \frac{1}{N} \frac{\sin^2 Nqd/2}{\sin^2 qd/2} \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

Picos de Bragg são encontrados em:

$$q = k \times \frac{2\pi}{d} \quad (\text{B.3})$$

Próximo do pico de primeira ordem: $q = q_0 + \epsilon$, com $q_0 = \frac{2\pi}{d}$:

Figura B.2: Forma gráfica da Eq. B.4. Os primeiros mínimos são encontrados em $q - q_0 = \pm 2\pi/Nd$. A seta dupla aponta a posição da FWHM.

$$\begin{aligned}
 S(q) &= \frac{1}{N} \frac{\sin^2 \left[\frac{Nq_0d}{2} + \frac{Nd\epsilon}{2} \right]}{\sin^2 \left[q_0 \frac{d}{2} + \frac{\epsilon d}{2} \right]} \\
 &= \frac{1}{N} \frac{\sin^2 [Nd\epsilon/2]}{\sin^2 \epsilon d/2}
 \end{aligned} \tag{B.4}$$

Os segundos mínimos são encontrados em:

$$\epsilon = \pm \frac{2\pi}{Nd}$$

$$S(q_0 + HWHM) = \frac{1}{N} \frac{\sin^2 \left[N \times \frac{(HWHM)d}{2} \right]}{\sin^2 \frac{(HWHM)d}{2}} = \frac{N}{2} \tag{B.5}$$

$$\Rightarrow \sin \left(N \times \frac{(HWHM)d}{2} \right) = \frac{N\sqrt{2}}{2} \sin \left(\frac{(HWHM)d}{2} \right) \tag{B.6}$$

No limite onde $N \rightarrow \infty$:

$$HWHM \times d = \frac{2.783}{N} \tag{B.7}$$

O tamanho do domínio de correlação, denotado como ξ é $\approx Nd$, desde que N seja grande (vide Eq. B.1. Portanto:

$$\xi = \frac{2.783}{HWHM} \tag{B.8}$$

Ajuste por função Lorentziana ou Gaussiana

Na Eq. 2.7, o parâmetro Δq é igual a HWHM. Portanto, quando o pico é ajustado por uma função Lorentziana, o comprimento de correlação é dado por:

$$\xi = \frac{2.783}{\Delta q} \quad (\text{B.9})$$

Quando o pico é ajustado por uma função Gaussiana:

$$\begin{aligned} \exp \left[-\frac{HWHM^2}{2\Delta q^2} \right] &= \frac{1}{2} \\ \Rightarrow \frac{HWHM}{\sqrt{2}\Delta q} &= \sqrt{\ln 2} \end{aligned}$$

levando a comprimento de correlação:

$$\xi = \frac{2.364}{\Delta q} \quad (\text{B.10})$$

Esta expressão é deduzida a partir da largura do fator de estrutura de uma cadeia finita de bastões. Deve ser observado que a expressão usual $\xi = \frac{\pi}{\Delta q}$ também é uma boa aproximação para o comprimento de correlação.

ANNEXE C

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

C.1 Motivations et objectives

L'utilisation des phases lamellaires de tensioactifs comme des vecteurs d'ADN est envisagée comme une prometteuse alternative synthétique à des méthodes virales traditionnellement utilisées en thérapie génique [1–3]. D'un point de vue de recherche fondamentale, de tels complexes sont aussi regardés comme d'excellents systèmes modèles pour l'étude de l'auto-assemblage de biomolécules dans des milieux confinés. Ces systèmes offrent donc, plusieurs défis pour les théoriciens et les expérimentateurs. Dans la littérature, il y a une grande quantité de travaux qui décrivent (ou prévoient) l'existence de plusieurs organisations pour des acides nucléiques au sein de complexes [8–10, 15, 73]. D'un autre côté, il a été reconnu une relation directe entre le type de structure présentée par le complexe et son efficacité en transfection [7]. Cela étant, ces études sont majoritairement basées sur des lipides cationiques, lesquels présentent une toxicité limitante pour les applications *in vivo*. La recherche d'alternatives basées sur des lipides neutres apparaît donc comme un développement naturel de ce processus [64, 86].

Dans ce contexte, cette thèse apporte une contribution à l'état de l'Art en présentant une étude expérimentale des mésophases de superstructures d'ADN hébergées dans des phases multi lamellaires de lipides non-cationiques. C'est un travail sur les sciences de base, qui se concentre sur les propriétés fondamentales du complexe, particulièrement l'étude de son diagramme de phase. Le complexe est composé par une membrane zwitterionique, des fragments d'ADN et de l'eau. Les bicouches sont obtenues à partir d'un mélange de phosphatidylcholine et d'acides gras éthoxylés qui agissent comme co-tensioactifs. Les particules sont obtenues par sonication de l'ADN de thymus de veau, en fragments de $\approx$

150 paires de base. Notre approche consiste à varier l'hydratation du complexe de façon à changer la périodicité smectique de la phase lamellaire et, par conséquent, le *confinement* induit sur les biomolécules. La structure du complexe est suivie en utilisant un ensemble de techniques qui comprend la diffraction des rayons X, la microscopie électronique et la microscopie optique. Une autre contribution de ce travail est relative aux propriétés dynamiques. Le mouvement brownien des nucléotides entre les bicouches est évalué par la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP). L'extraction des coefficients de diffusion anisotropes est faite en utilisant une approche théorique récemment développée spécifiquement pour le système évalué ici.

C.2 Bases

C.2.1 Complexes d'ADN et lipides : état de l'Art

La première description précise de la structure des lipoplexes a été réalisée par Rädler et al. en 1997 [8]. En utilisant la diffusion de rayonnement synchrotron et des techniques de microscopie optique, ces auteurs ont démontré qu'un système ADN/DOTAP-DOPC s'auto-organise dans une structure L_{α}^c , où les nucléotides sont insérés dans les couches aqueuses d'une phase lamellaire. Inspiré par la nomenclature donnée dans des études pionnières de microscopie électronique [11, 12], cette conformation a été bientôt appelée structure de type "sandwich". Une représentation schématique de cette organisation est montrée dans la fig. C.1(a). Dans le plan (xy) des membranes, l'ADN est condensé dans une structure bidimensionnelle où l'espacement interaxial, d_{DNA} , dépend d'un équilibre délicat entre les charges positives des lipides et les charges négatives des macromolécules hébergées. Lorsque le nombre de charges introduites par les nucléotides dépasse le nombre de charges cationiques, une phase aqueuse contenant l'ADN seul apparaît. Inversement, quand le nombre des charges positives est supérieur au nombre d'anions, une phase lipidique non complexée apparaît. La complexation est optimisée au point isoélectrique, lorsque le système est globalement neutre.

Bien que les phases lamellaires lyotropes soient les structures les plus fréquemment trouvées dans la recherche des lipoplexes, elles ne sont pas le seul type d'agrégats dans ces systèmes. Des matrices hexagonales de lipides, des structures type "nid d'abeille", sont aussi souvent observées. Dans l'étude décrite dans la Ref. [9], par exemple, des mélanges de DOPE/DOTAP ont formé une phase hexagonale inverse, H_{II}^c . Cette structure est représentée dans la fig. C.1(b). Dans un autre travail plus récent [10], les lipides ont formé une phase micellaire hexagonale, avec les nucléotides hébergés dans l'interstice de la phase, H_I^c . Cette structure est montrée dans la fig. C.1(c).

FIGURE C.1 – Schéma des structures les plus fréquemment retrouvées dans lipoplexes : (a) structure type “sandwich”, avec l’ADN inséré entre des bicouches ; (b) structure hexagonale inverse, type “nid d’abeilles”, qui contient des bâtonnets d’ADN dans des cylindres d’eau et (c) structure hexagonale micellaire avec l’ADN dans l’interstice de la phase (figures aimablement fournies par G. Tresset).

D’autres types plus rares d’organisation ont été trouvés. En particulier, les groupes cristallographiques $Im3m$, $Ia3d$ et $Pn3m$, correspondant à des phases cubiques, ont été mis en évidence dans des systèmes basés sur les phosphatidylcholines [2, 84, 152].

Des études théoriques ont été également développées afin d’apporter un aperçu sur les mécanismes impliqués dans la formation des lipoplexes. Plusieurs modèles ont été proposés pour résoudre ce problème et expliquer le polymorphisme décrit ci-dessus [30, 68, 69]. Malgré la diversité des approches et plusieurs points restant encore obscurs, certains résultats consensuels ont émergé de ces études : parmi ces conclusions, on trouve que le comportement de phase dépend d’un équilibre complexe entre des forces élastiques, des interactions électrostatiques et les contraintes thermodynamiques [54].

Un autre résultat dérivé de ces efforts théoriques est lié au relargage des contre-ions. Pendant la formation des lipoplexes, les deux partenaires, nucléotides et tensioactifs, sont pénalisés au niveau de l’entropie translationnelle. Sans prise en compte d’un mécanisme pour compenser cette perte, le système violerait la deuxième loi de la thermodynamique. Un tel problème est surmonté par le relargage des contre-ions : lorsque les contre-ions associés aux membranes et aux bâtonnets sont libérés dans le solvant, l’entropie globale du système monte [76], fig. C.2. À cause de ce mécanisme, la complexation ADN-lipides cationiques est souvent dite être “entropiquement dirigée” [15, 47, 71, 76].

Quand les membranes utilisées pour la formation des lipoplexes sont non-cationiques, des mécanismes théoriques différents sont requis en raison de l’absence d’interactions directes (fortes) entre les nucléotides et les tensioactifs. Roux et al. [16] ont proposé un

FIGURE C.2 – Mécanisme de relargage des contre-ions : lors de l’adhésion entre ADN et membranes, les contre-ions sont libérés vers le solvant et l’entropie globale du système monte. (Figure tirée de [47]).

modèle stérique dans le contexte d’une approche de Flory. Dans ce travail, ils ont étudié la compétition entre les énergies associées à la transition isotrope/nématique de bâtonnets en solution et à leur incorporation à la phase lamellaire. La phase lamellaire a été considérée comme un réseau de sites qui pourraient être occupés (ou non) par les fragments. Les énergies libres ont été calculées pour les différentes configurations et un diagramme de phase théorique a pu être alors calculé.

Dans cette thèse, nous avons partiellement reproduit les données expérimentales de Roux et al. [16,86]. De surcroît, nous avons étendu les résultats de ces auteurs en explorant la région de basse hydratation du diagramme de phase. Nous démontrons également que l’insertion de l’ADN “durcit” l’ordre smectique de la phase lamellaire. En outre, nous évaluons le comportement du système pour des compositions différentes de la membrane et différentes conditions ioniques. Nous concluons finalement que les fluctuations et les forces d’hydratation à courte portée jouent un rôle fondamental dans le système.

C.2.2 Diffusion des rayons X par des phases lamellaires

Le modèle de Nallet et al.

Dans une courbe de diffusion des rayons X, il est facile de déterminer, à partir des positions des raies de Bragg, l’espacement lamellaire d d’un ensemble de bicouches empilées au travers de la relation $d = 2\pi/q_0$, où q_0 est le vecteur d’onde de la première raie. Toutefois, les diffractogrammes contiennent beaucoup plus d’informations que la seule distance de répétition des lamelles. La forme des raies, ainsi que le rayonnement diffus, c’est-à-dire l’intensité diffusée en dehors des raies de Bragg, permettent de sonder la structure du complexe avec plus de détails.

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire la diffusion du rayonnement par des phases lamellaires lyotropes [89–91]. L’objectif de ces modèles est d’obtenir des informations soit au niveau supramoléculaire, par le biais de l’extraction de paramètres tels que le paramètre de Caillé et le nombre de couches corrélées, soit au niveau de la structure fine du système, en déterminant le profil de densité électronique des bicouches de tensioactifs [42, 92].

Parmi ces modèles, nous avons utilisé dans ce travail celui proposé par Nallet et al. [93]. Selon cette proposition, les intensités des rayons X diffusés par une phase lamellaire lyotrope peuvent être décrites en fonction du vecteur d’onde q au travers de la relation :

$$I(q) = \frac{2V\pi P(q)\tilde{S}(q)}{dq^2} \quad (\text{C.1})$$

où $P(q)$ et $\tilde{S}(q)$, sont, respectivement, les facteurs de forme et de structure du système, donnés par :

$$P(q) = \frac{4\Delta\rho_H^2}{q^2} \left\{ \sin(q(\delta_H + \delta_T)) - \sin(q\delta_T) + \frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H} \sin(q\delta_T) \right\}^2 \quad (\text{C.2})$$

et

$$\begin{aligned} \tilde{S}(q_z) = 1 + 2 \sum_1^{N-1} \left(1 - \frac{n}{N} \right) \cos \left(\frac{q_z dn}{1 + 2\Delta q^2 d^2} \alpha(n) \right) \times \\ \times \exp \left\{ \frac{-2q_z^2 d^2 \alpha(n) + \Delta q^2 d^2 n^2}{2(1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n))} \right\} \times \\ \times \frac{1}{\sqrt{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}} \end{aligned} \quad (\text{C.3})$$

Les paramètres ajustables sur la partie relative au facteur de forme $P(q)$ sont : δ_H , qui correspond à la taille des têtes polaires des tensioactifs, δ_T , qui est la taille des queues aliphatiques et le rapport entre les contrastes électroniques des queues et des têtes, $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$.

Dans l’expression du facteur de structure, $\tilde{S}(q)$, Δq est la résolution instrumentale. Les paramètres ajustables sont : le nombre de couches corrélées, N , la périodicité des lamelles, d , et le paramètre de Caillé, η . Ce dernier se trouve intégré dans la fonction $\alpha(n)$:

$$\alpha(n) = \frac{\langle (u_n - u_0)^2 \rangle}{2d^2} = \frac{\eta n^2}{16}, \quad n \text{ small} \quad (\text{C.4a})$$

$$\alpha(n) = \frac{\langle (u_n - u_0)^2 \rangle}{2d^2} = \frac{\eta}{4\pi^2} [\ln(\pi n) + \gamma], \quad n \gg 1 \quad (\text{C.4b})$$

où γ est la constante d’Euler. Le paramètre de Caillé est relié aux constantes élastiques de la phase lamellaire par la relation :

$$\eta = \frac{q_0^2 k_B T}{8\pi \sqrt{KB}} \quad (\text{C.5})$$

Il y a donc une relation étroite entre η et les fluctuations des membranes dans une phase smectique. Pour un système idéal, où il n'y a pas d'effets de fluctuations, la valeur de η est zéro et le facteur de structure est constitué par un ensemble des raies de même intensité, dont la largeur est limitée seulement par la résolution instrumentale. Quand η est différent de zéro, les intensités des raies décroissent rapidement en fonction de q , et les largeurs des raies montent, comme il est montré dans la fig. C.3.

FIGURE C.3 – Facteurs de structure simulés avec trois valeurs différentes du paramètre de Caillé : $\eta = 0$ (noir), $\eta = 0.1$ (rouge) et $\eta = 0.35$ (bleu). (adaptée à partir de la figure 6 de [93]).

C.2.3 Diffusion de l'ADN dans des phases lamellaires

Modèle de Dobrindt

L'analyse des propriétés dynamiques lorsque la diffusion se produit dans des milieux anisotropes nécessite des approches spécifiques selon le type de symétrie [111, 113, 114]. Dans le cas du système évalué ici, deux difficultés doivent être surmontées : l'anisotropie imposée par la phase lamellaire et l'anisotropie liée à l'auto-assemblage de molécules d'ADN elles mêmes. Récemment, un modèle théorique portant sur les caractéristiques spécifiques de ces systèmes a été développé par Jens Dobrindt au CRPP [23]. Dans cette thèse, quelques preuves qui soutiennent la validité de cette propositions sont montrées.

Considérons une phase lamellaire orientée de façon homéotrope. Dans les couches aqueuses de cette phase, des fragments d'ADN se trouvent organisés de façon nématique, sans aucune corrélation entre les vecteurs directeurs d'une couche à l'autre. À cause de cette anisotropie, les particules se propagent plus rapidement dans la direction parallèle à l'axe des molécules d'ADN et plus lentement dans la direction perpendiculaire. Pendant

une expérience de FRAP, les taches de blanchiment dans les couches adoptent une forme elliptique, avec le grand axe parallèle au directeur de la phase nématique locale. Vu que les différentes phases nématiques ne sont pas corrélées le long de l'axe optique, la tache résultante sur le plan focal image, composée à partir de la projection de plusieurs ellipses, a une forme de symétrie circulaire. Le profil de fluorescence de cette tache pendant une expérience de FRAP n'est pas adéquatement décrit par les fonctions gaussiennes, traditionnellement utilisées pour évaluer la diffusion isotrope. Dans le cas anisotrope d'intérêt, le modèle de Dobrindt propose l'expression suivante pour décrire le profil de fluorescence :

$$F_0(r, t) = F'_0(t) \exp \left[-r^2 \left(\frac{1}{w_{\parallel}^2} + \frac{1}{w_{\perp}^2} \right) \right] \times I_0 \left[r^2 \left(\frac{1}{w_{\parallel}^2} - \frac{1}{w_{\perp}^2} \right) \right] \quad (\text{C.6})$$

Les variances $w_{\parallel}^2$ et $w_{\perp}^2$ sont reliées aux coefficients de diffusion parallèle et perpendiculaire au travers des relations :

$$w_{\parallel}^2 = w_0^2 + 8D_{\parallel}t \quad (\text{C.7a})$$

$$w_{\perp}^2 = w_0^2 + 8D_{\perp}t \quad (\text{C.7b})$$

Le facteur de normalisation $F_0(t)$ est donné par :

$$F'_0(t) = \frac{2ZC_0}{\pi \sqrt{(w_0^2 + 8D_{\parallel}t)(w_0^2 + 8D_{\perp}t)}} \quad (\text{C.8})$$

C.3 Matériaux et méthodes

C.3.1 Constituants du système

Les fragments d'ADN sont obtenus par sonication, ce qui amène à des morceaux de 150 paires de base, en moyenne. La taille des bâtonnets formés est systématiquement vérifiée par électrophorèse. Afin de permettre des observations en lumière polarisée, les bâtonnets sont marqués avec un fluorophore, le YOYO. La partie lipidique est constituée d'un mélange entre la phosphatidylcholine (lipides zwitterioniques) et le Simulsol, un mélange d'acides gras éthoxylés neutres¹. Deux compositions de membranes ont été étudiées, avec des rapports PC/Simulsol dans les proportions de 70 :30 et 50 :50. Le solvant utilisé a été de l'eau dé-ionisée pour la plupart des formulations. Pour quelques échantillons, des solutions d'acétate d'ammonium, à la concentration de 0.25M, ont été employées.

¹La sonication de l'ADN et la préparation du mélange PC-Simulsol ont été réalisées par Annie Février, technicienne au CRPP.

C.3.2 Expériences de rayons X

La diffraction des rayons X a été la principale technique utilisée pour les études structurales. Les expériences ont été partagées entre la ligne SWING, sur le synchrotron SOLEIL, et des sources conventionnelles. Notamment, une machine Nanostar-Bruker et une anode tournante ont été employées au Centre de recherche Paul-Pascal, à Bordeaux. La diffusion du rayonnement a été étudiée aux petits et moyens angles, pour étudier la structure à l'échelle supramoléculaire, et aux grands angles, pour évaluer l'état des queues aliphatiques des membranes dans le complexe. Les détails des configurations utilisées, avec les principales caractéristiques instrumentales, sont résumées dans le tableau C.1.

TABLE C.1 – Principaux paramètres des configurations utilisées dans ce travail. La résolution totale $\Delta q/q$ a été estimée à la position $q = 0.215 \text{ \AA}^{-1}$.

Machine	Distance échant.-dét. (mm)	Domaine en q ($\text{\AA}^{-1}$)	$\Delta q/q$ ($\text{\AA}^{-1}$)
SWING-SOLEIL	1575.6	$0.0600 < q < 0.7000$	1.7×10^{-3}
	608.0	$0.0300 < q < 1.7450$	3.8×10^{-3}
Nanostar-Bruker	1060	$0.0100 < q < 0.2000$	1.5×10^{-3}
	250	$0.0400 < q < 0.8250$	6.3×10^{-3}
Anode tournante	383	$0.0660 < q < 0.8200$	5.1×10^{-3}
	133	$0.190 < q < 2.200$	8.1×10^{-2}

C.3.3 Microscopie d'épifluorescence et à lumière polarisée

Les préparations ont été systématiquement soumises à l'inspection visuelle par microscopie en lumière polarisée et d'épifluorescence. Les objectifs principaux de ces observations ont été l'évaluation de la biréfringence optique des échantillons ainsi que de vérifier l'homogénéité de la distribution d'ADN. Les analyses ont été faites sur un microscope *Leica* modèle *CTR Mic*.

C.3.4 Microscopie électronique et cryo-fracture

Des répliques pour des observations en microscopie électronique à transmission ont été préparées selon la technique de cryofracture² [129]. Le processus de fracture et de recouvrement avec du platine et du carbone a été fait dans une machine BALTEC BAF060.

²La préparation des répliques a été faite avec l'aide précieuse d'Isabelle Lee, technicienne au CRPP.

Les épaisseurs de Pt et de C ont été, respectivement, 4 nm et 30 nm. Les observations ont été faites avec un microscope à transmission Hitachi H600. Pour l'extraction des informations quantitatives et le traitement des images, le logiciel ImageJ a été utilisé.

C.3.5 La technique de FRAP

La technique employée a été la retour de fluorescence après photoblanchiment. Cette technique consiste à irradier une région de l'échantillon avec une impulsion de lumière intense et de courte durée. Ce processus détruit la fluorescence locale des molécules illuminées de façon irréversible [113, 114]. Ensuite, le faisceau est atténué et la migration des molécules situées au voisinage vers la zone "blanchie" provoque un retour de la fluorescence. Les études sur les propriétés dynamiques du complexe ont été faites avec un microscope confocal *Leica DMIRE*.

L'analyse des images de FRAP et l'obtention des coefficients de diffusion anisotropes ont été faites moyennant l'utilisation de l'éq. C.6. Un logiciel a été développé sur MatLab spécialement à cette fin.

C.4 Résultats structuraux

C.4.1 Système lipides-eau : la phase hôte

Membranes avec rapport PC-Simulsol 70 :30

Les analyses structurales ont été commencées par l'étude des phases hôtes préparées à partir de membranes avec un rapport PC-Simulsol égal à 70 :30. Les échantillons ont été formulés en utilisant de l'eau pure comme solvant avec des concentrations de lipides qui ont varié dans l'intervalle $\phi_{lip} = 0,25$ à $\phi_{lip} = 0,75$. Les principaux objectifs de cette étape étaient l'évaluation du domaine de dilution et de la limite d'hydratation, ainsi que la détermination de l'épaisseur des membranes formées. Par ailleurs, une autre tâche importante était la vérification de la fluidité des queues aliphatiques, L_α ou $L_{\beta'}$.

Des phases multilamellaires de bicouches, régulièrement espacées, sont présentes dans tout le domaine d'hydratation étudié. La diffusion aux grands angles indique que les membranes se trouvent toujours dans l'état fluide, L_α . Ces résultats présentent un excellent accord avec les observations en microscopie optique à lumière polarisée, lesquelles montrent des textures biréfringentes très caractéristiques des phases lamellaires.

Le comportement des périodicités en fonction de l'inverse de la fraction volumique des lipides est montré dans la fig. C.4. Deux domaines sont bien identifiés sur la fig. C.4. Le premier est gouverné par la loi usuelle de dilution, où la périodicité est décrite par $d =$

$\delta_m/(\phi_{lip})$. La pente d'une ligne droite ajustée aux données permet de déterminer l'épaisseur des bicouches comme étant $\delta_m = 36.5(3) \text{ \AA}$. Le deuxième domaine est caractérisé par une saturation, quand la périodicité maximale atteint une valeur de $D_{max} = 92(5) \text{ \AA}$.

FIGURE C.4 – Comportement de la périodicité lamellaire d en fonction de $1/\phi_{lip}$. Deux domaines sont identifiés : le premier obéit à la loi de dilution usuelle, dont la pente permet déterminer l'épaisseur des membranes en $\delta_m = 36.5(3) \text{ \AA}$. Le deuxième présente un excès d'eau, avec une limite de dilution à $D_{max} = 92(5) \text{ \AA}$. Les cercles noirs correspondent aux données montrées sur la fig.3.2, les triangles bleus correspondent aux données montrées sur la fig.3.3(a) tandis que les carreaux roses sont associés aux données montrées sur la fig. 3.3(b).

Quelques-unes de ces formulations ont été aussi observées en microscopie électronique. Sur la fig. C.5, on montre deux exemples de ces images, obtenues pour un échantillons avec $\phi_{lip} = 0,752$. De vastes régions exemptes de défauts y sont trouvées, lesquelles se composent de terrasses lamellaires magnifiques, fig. C.5(a). Lorsque les fractures se produisent perpendiculairement au plan des bicouches, fig. C.5(b), il est possible de voir une forte anisotropie et, par analyse d'image en utilisant des transformées de Fourier, on détermine la périodicité lamellaire en $d = 50 \text{ \AA}$, en très bon accord avec les donnée des rayons X, $d = 49 \text{ \AA}$.

Effets de l'addition de sel

Deux séries d'échantillons ont été préparées en utilisant des saumures comme solvant. Le sel utilisé dans les saumures a été l'acétate d'ammonium à 0,25 M. Le comportement résultant de la périodicité lamellaire, en fonction de l'inverse de la fraction volumique de lipides, est montré dans la fig. C.6. Aucune distinction notable n'est observée entre les données de formulations contenant du sel et de celles avec l'eau pure. L'épaisseur des

FIGURE C.5 – Images de microscopie électronique à transmission, obtenues sur un échantillon avec $\phi_{lip} = 0.752$. (a) Fractures parallèles aux plans des bicouches montrant de vastes terrasses lamellaires et (b) Fractures perpendiculaires montrant une forte anisotropie. L'analyse de Fourier a permis de mesurer la périodicité $d = 50 \text{ \AA}$, en très bon accord avec les données des rayons X, $d = 49 \text{ \AA}$.

membranes est trouvée valoir $\delta_m = 36.0(3) \text{ \AA}$ et la limite de dilution $D_{max.} = 89,3(6,5) \text{ \AA}$. Ces valeurs sont très proches de celles trouvés auparavant.

FIGURE C.6 – Périodicité lamellaire en fonction de $1/\phi_{lip}$ pour les échantillons préparés avec du sel et avec de l'eau pure. L'épaisseur des bicouches est $\delta_m = 36.0(3) \text{ \AA}$ tandis que la limite de dilution est $D_{max} = 89.3(6.5) \text{ \AA}$.

Le modèle de Nallet et al. a été utilisé pour décrire les courbes de diffusion des rayons X de ces phases hôtes. Les principaux paramètres étudiés ont été le paramètre de Caillé, η , les tailles des têtes polaires, δ_H , et des queues aliphatiques, δ_T . Le comportement du paramètre de Caillé en fonction de la périodicité lamellaire est montré dans la fig. C.7(a). Tel que discuté précédemment, η est un indicateur du degré d'ordre smectique des phases lamellaire et son comportement en fonction de l'espacement intermembranaire est bien connu pour être dépendant de l'origine des interactions répulsives qui empêchent l'effondrement des membranes sous l'effets des forces de van der Waals. Les lignes sur la fig. C.7(a) correspondent à des prédictions pour des forces répulsives d'origine purement stérique (ondulations Helfrich) ou d'origine électrostatiques [34,92,94]. Comme il est possible de l'observer, aucun des deux modèles ne décrit bien le comportement de η . Cela montre la nécessité d'un autre modèle, où les forces d'hydratation soient aussi prises en compte, pour faire une description appropriée des données expérimentales. Un tel modèle a été proposé par Petrache et

al. [132]. Selon ce modèle, il est possible d'extraire la moyenne quadratique de l'amplitude des fluctuations au travers de la relation :

$$\sigma^2 = \eta \frac{d^2}{\pi^2} \quad (\text{C.9})$$

Il est en outre possible de relier les amplitudes σ^2 aux séparations entre des membranes :

$$\sigma^{-2}(d'_w) = A_{fl} \exp\left(-\frac{d'_w}{\lambda_{fl}}\right) \quad (\text{C.10})$$

Dans la fig. C.7(b), le comportement de σ^{-2} en fonction de la séparation intermembranaire est montré. Comme on peut le voir, l'expression C.10 décrit bien les données observées. La longueur de décroissance des forces de fluctuation d'hydratation est trouvée être $\lambda_{fl} = 16.3(1.2)\text{\AA}$. Ce résultat est trois fois plus grand environ que les valeurs typiquement trouvées pour des membranes composées de lécithine pure. Donc, ici, on voit que l'introduction du Simulsol, en plus de faire monter la limite de dilution des lamelles formées, change la balance des interactions au sein de la phase lamellaire.

Membranes avec rapports PC-Simulsol 50 :50

Les mêmes procédures utilisées ci-dessus ont été employées dans la caractérisation des membranes avec le rapport 50 :50 entre PC et Simulsol. Avec l'addition de Simulsol, on présume que la rigidité des bicouches diminue. Seuls de petits changements ont été observés par rapport au comportement des membranes plus riches en lécithine. Un domaine d'hydratation régi par une loi de dilution usuelle a été aussi identifié et l'épaisseur des

FIGURE C.7 – (a) Comportement du paramètre de Caillé en fonction de la périodicité lamellaire. Les lignes sont des prédictions théoriques pour $\eta(d)$ quand les répulsions entre lamelles sont d'origine stérique (noire) ou électrostatiques (verte). (b) Comportement de σ^{-2} en fonction de la séparation entre membranes. La ligne pleine est l'ajustement de l'expression C.10 aux données.

membranes a été déterminée en $\delta_m = 38,4(6)$ Å. Cette fois, il n'a pas été possible de bien identifier la limite d'hydratation des lamelles. Toutefois, il a été observé que le système atteint des valeurs plus grandes de périodicité, ce qui a été interprété comme un changement des propriétés élastiques des phases formées.

Les modèles de Nallet et al. et de Petrache et al. ont été utilisés pour obtenir les paramètres de Caillé et étudier les fluctuations des membranes. Ici encore, il a été trouvé que les forces de van der Waals entre des bicouches sont équilibrées par un mélange de forces d'hydratation et de Helfrich.

Discussions

À partir des résultats décrits ci-dessus, on peut conclure que les phases hôtes utilisées dans ce travail s'auto-organisent dans des structures smectiques sur un domaine de dilution important. Pour les deux compositions de bicouches, il est possible d'obtenir des espacements intermembranaires plus grands que 20 Å, la séparation minimale géométriquement requise pour l'introduction de fragments d'ADN. En outre, il est également observé que le comportement de gonflement suit une relation linéaire classique, au moins dans une certaine gamme du domaine de dilution. Par conséquent, en contrôlant la concentration en lipides de la phase hôte, on peut contrôler le confinement exercé par la matrice lamellaire.

sur les particules insérées entre les membranes.

Pour les bicouches avec 70 :30 (PC :Simulsol), la limite d'hydratation se trouve à 92 Å environ. Pour l'autre composition de membrane, cette limite ne peut pas être déterminée avec précision. Cela témoigne de la modification introduite par l'ajout d'acides gras éthoxylés sur les propriétés des lamelles. En fait, la périodicité maximale dans les phases smectiques préparées à partir de lécithines pures (EPC, DMPC ou DPPC, par exemple) est généralement autour de 60 Å. En soustrayant les valeurs habituelles des épaisseurs de bicouches dans ces phases, l'espacement aqueux reste à 24 Å environ [132–135]. Une telle valeur est déjà proche de l'espacement minimal requis pour accommoder des molécules d'ADN et ne permet pas une étude systématique du confinement sur l'assemblage supramoléculaire des particules hébergées. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, l'ajout d'acides gras éthoxylés est fondamental pour élargir la gamme des espacements disponibles pour les nucléotides.

L'analyse du paramètre de Caillé a apporté quelques informations sur les interactions intermembranaires. Elle a révélé que les interactions qui préviennent l'effondrement des bicouches sous l'effet des forces attractives de van der Waals ne sont pas fondées sur la répulsion électrostatique. D'autre part, cette même analyse a montré que les interactions de Helfrich ne sont pas les seules forces de répulsion entre les membranes. Ces résultats montrent la nécessité d'un modèle hybride pour décrire l'équilibre des forces entre les bicouches. L'approche de Petrache et al. [132] s'est avérée être suffisante pour une telle analyse, en montrant qu'un mélange entre l'hydratation et les forces de fluctuations d'Helfrich est responsable de la répulsion dans les phases lamellaires. En outre, toujours selon cette méthodologie, la longueur de décroissance de cette force hybride est $\lambda_{fl} \approx 16.5$ Å, une valeur 3 fois plus élevée que celle généralement trouvée pour les bicouches de lécithines pures [134, 137, 138]. Ceci est une mesure quantitative de l'effet du Simulsol sur les propriétés élastiques des membranes utilisées ici. Ces résultats montrent que l'ajout d'acides gras éthoxylés joue un rôle clé pour agrandir l'espacement entre les membranes, ainsi que pour augmenter les effets des forces entropiques lesquelles, en l'absence d'interactions électrostatiques fortes entre ADN et membranes, sont un candidat sérieux pour induire la complexation.

C.4.2 Complexes lipides-ADN : polymorphisme structural

Membranes avec rapport PC-Simulsol 70 :30

Dans une deuxième étape, des échantillons contenant de l'ADN ont été étudiés. Contrairement à la plupart des études rapportées dans la littérature, où les complexes sont prépa-

rés dans un excès d'eau, ici, on a utilisé les propriétés de gonflement de la phase lamellaire afin de contrôler le confinement et induire l'organisation des nucléotides dans les complexes. La structure du complexe à des échelles mésoscopique et moléculaire a été suivie par SAXS et WAXS. L'addition de l'ADN n'a pas changé l'état liquide des queues aliphatiques. Un signal diffus à $q \approx 1.4 \text{ \AA}^{-1}$ a été observé pour toutes les formulations.

FIGURE C.8 – Diffractogrammes sélectionnés obtenus dans les deux domaines monophasiques trouvés sur la ligne $\rho = 3.1$. Les flèches indiquent le signal ayant pour origine les corrélations entre bâtonnets d'ADN. Encart : pic diffus aux grands angles montrant la fluidité des queues aliphatiques.

Les résultats le plus intéressants ont été observés sur la ligne $\rho = 3.1$. Deux domaines monophasiques y ont été trouvés. Le premier, placé dans une région plus diluée du diagramme ($0,40 \lesssim \phi_{lip} \lesssim 0,53$), est caractérisé par une symétrie nématique pour l'ADN inséré dans les couches aqueuses d'une phase lamellaire de lipides, L_{α}^N . Le deuxième domaine monophasique a été observé dans la région plus concentrée du diagramme ($\phi_{lip} \gtrsim 0,58$).

Les raies des diffractogrammes de cette région sont convenablement indexées par des symétries hexagonales. Les courbes de diffusion des rayons X obtenues dans ces domaines monophasiques sont montrées sur la fig. C.8.

Deux types d'organisations sont candidates pour expliquer la symétrie hexagonale observée dans le deuxième domaine : on peut avoir une phase lamellaire de lipides avec une phase hexagonale d'ADN intercalée entre ses membranes ou on peut avoir une phase hexagonale inverse de lipides contenant des bâtonnets d'ADN dans des cylindres d'eau. Les dessins schématiques de ces deux symétries sont montrés dans la fig. C.9.

FIGURE C.9 – Représentation schématique d'une phase hexagonale colonnaire d'ADN dans une phase lamellaire de lipides, L_{α}^H (a) et d'une phase hexagonale inverse de lipides avec des bâtonnets d'ADN dans les cylindres d'eau, H_{II}^c (b).

Dans un travail antérieur, paru dans le contexte de la collaboration développée pendant cette thèse, des observations de microscopie optique en lumière polarisée et d'épifluorescence ont démontré que la symétrie L_{α}^H est le bon choix [20]. Ici, on complète ce cadre avec des observations en microscopie électronique. Dans la fig. C.10, des images de cryofracture d'un échantillon avec $\phi_{lip} = 0,634$ sont montrées. De nombreuses structures anisotropes sont visibles sur le plan des couches, fig. C.10(b). Ces structures en forme de bâtonnet ont en moyenne 530 Å de long, en bon accord avec la taille attendue pour des molécules de 150 paires de bases, en tenant compte de la couche d'ombrage. La limite de résolution de la technique de cryofracture, qui est estimée à ≈ 20 Å **pour des structures périodiques** [12], ne permet pas de mesures précises du diamètre de l'ADN. Cependant, la forme des molécules peut être bien rendues comme il a été observé auparavant dans des contextes similaires [146–148]. À un grossissement plus petit, fig. C.10(a), des tiges d'ADN coexistent avec des sauts entre couches, indiqués par des flèches blanches, ce qui confirme la présence d'une stratification lamellaire. Par ailleurs, les séparations entre les branches sont mesurées à 61 Å, en bon accord avec une séparation ADN-ADN égale à

65 Å obtenue à partir des rayons X. L'analyse d'image, réalisée par des transformées de Fourier, fig. C.10(c), suggère la conservation d'orientation d'une couche à l'autre, en conformité avec les comportements attendus pour une structure L_α^H .

FIGURE C.10 – Clichés de microscopie électronique sur une réplique d'un échantillon du domaine L_α^H . (a) Flèches blanches montrant des marches smectiques qui délimitent des plans sur lesquels des structures anisotropes de forme cylindrique apparaissent. (b) Zoom du carreau pointillé sur la fig. A qui montre les bâtonnets en détail. (c) Transformée de Fourier sur les carreaux solides indiqués sur fig. A qui montre la conservation de l'orientation couche-à-couche.

En plus de ces deux domaines monophasiques, deux autres domaines en coexistence sont aussi observés. Dans la région plus diluée du diagramme, on trouve la coexistence d'une phase L_α^N avec une phase lamellaire non complexée (sans ADN incorporé). Entre le domaine L_α^N et le domaine L_α^H , on trouve la coexistence entre ces deux domaines. L'ensemble des paramètres de cellules unitaires trouvés lors des analyses aux rayons X sur des formulations avec $\rho = 3,1$ est synthétisé dans la fig. C.11.

Avec l'objectif d'évaluer de possibles effets de l'introduction d'ions monovalents sur les comportements du système, quelques formulations ont été préparées sur la ligne $\rho = 3,1$, mais en utilisant des solutions d'acétate d'ammonium (0,25 M) comme solvant. Le comportement de phase des formulations préparées avec sel n'a pas présenté de changements remarquables par rapport aux formulations hydratées avec de l'eau pure.

Deux autres lignes de dilution, avec $\rho = 5,1$ et $\rho = 8,1$, ont été également étudiées.

FIGURE C.11 – Comportement des paramètres structuraux en fonction de la fraction volumique des lipides le long d’une ligne de dilution avec $\rho = 3, 1$. Les carreaux représentent le pas smectique de la phase hôte tandis que les cercles, la séparation entre bâtonnets d’ADN. Les lignes pontillées sont des guides pour l’œil qui représentent les frontières approchées entre domaines.

En général, un riche polymorphisme a été trouvé, avec un ordre plus faible à haute hydratation et l’émergence de domaines très organisés dans la région plus concentrée du diagramme. Pour ces lignes, on n’a pas retrouvé de domaines monophasiques. Exceptées deux formulations sur la ligne de $\rho = 5, 1$, avec $\phi_{lip} = 0,53$ et $\{phi_{lip} = 0,37$, qui ont présenté des symétries L_{α}^N monophasiques, toutes les structures ont été trouvées en coexistence. En plus, des observations de microscopie en lumière polarisée montrent des textures lamellaires dans toute la gamme d’hydratation étudiée, soulignant la persistance d’une assemblée smectique des phases lipidiques. En microscopie de fluorescence, il a été possible d’identifier soit une coexistence entre des phases avec et sans ADN, ou la présence simultanée de nucléotides dans les deux phases lamellaires. Outre les organisations nématique et hexagonale déjà trouvées auparavant, ces lignes de dilution ont également révélé des raies de Bragg qui pourraient être indexées selon des symétries rectangulaires de l’ADN dans des phases lamellaires de lipides, L_{α}^R . Dans la figure C.12, le diagramme de phase expérimental complet obtenu pendant cette thèse est montré.

FIGURE C.12 – Diagramme de phase complet résultant de ce travail. Des domaines monophasiques sont observés de façon systématique seulement le long de la ligne $\rho = 3.1$. Les symboles pleins indiquent des points monophasiques : $\blacktriangle = L_{\alpha}^N$, $\bullet = L_{\alpha}^H$. Les symboles vides représentent une coexistence de phase : $\triangle = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^N$ or $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}$, $\circ = L_{\alpha}^H + L_{\alpha}^N$ or $L_{\alpha}^H + L_{\alpha}$, $\diamond = L_{\alpha}^H + L_{\alpha}^R$, $\square = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$ ou $L_{\alpha} + L_{\alpha}^H$.

Membranes avec rapport PC-Simulsol 50 :50

Le comportement de phase des complexes ADN-lipides, préparés à partir de membranes avec le rapport 50 :50 (PC :Simulsol), a également été étudié. Vu que les études précédentes ont montré la présence systématique de domaines monophasique seulement le long de la ligne de dilution $\rho = 3,1$, les formulations ont été préparées avec ce rapport lipides :ADN. Un total de 19 échantillons a été formulé. Dix d'entre eux ont été hydratés avec de l'eau pure alors que les autres ont été dilués avec des saumures.

Le comportement de phase général est similaire à celui observé pour des échantillons préparés à partir de membranes de composition 70 :30 (PC :Simulsol). Les paramètres de cellule unitaire en fonction de la fraction volumique des lipides le long de la ligne de dilution est montré dans la fig. C.13.

FIGURE C.13 – Paramètres structuraux en fonction de la fraction volumique des lipides pour les formulations préparées à partir de membranes 50 :50 (PC :Simulsol). Le rapport lipides :ADN est $\rho = 3,1$. Les carreaux représentent les périodicités lamellaires et les cercles, les distances ADN-ADN. Les symboles pleins correspondent à des échantillons hydratés avec de l'eau pure et les symboles vides, à des échantillons hydratés avec de la saumure.

Discussions

Dans la fig. C.14, on montre des spectres de diffraction obtenus à partir d'échantillons avec ρ variable, pour des membranes de composition 70 :30 (PC :Simulsol). Comme le

montant de l'hydratation est maintenu constant, les périodicités résultantes sont approximativement les mêmes pour toutes les formulations, avec $d \approx 73 \text{ \AA}$.

FIGURE C.14 – Comparaison entre des formulations avec différentes valeurs de ρ , préparées à partir de membranes 70 :30 (PC :Simulsol). La périodicité lamellaire $d \approx 73 \text{ \AA}$ pour les quatre échantillons.

Avec cette simple comparaison, il est possible de vérifier la présence des phases en coexistence pour $\rho > 3,1$. La deuxième phase lamellaire est associée à un excès de lipides et forme une phase non complexée. À mesure que la quantité d'ADN augmente, les raies associées à cette deuxième structure diminuent et, pour $\rho = 3,1$, seulement les réflexions d'une unique phase lamellaire sont observées. Cette observation est un exemple clair de la dépendance de la complexation en ρ pour ces systèmes formulés à partir de lipides neutres.

Dans la fig. C.15, on montre des spectres de diffraction obtenus à partir d'échantillons à ρ variable. Comme le montant de l'hydratation est maintenu constant, les périodicités résultantes sont approximativement les mêmes pour toutes les formulations, avec $d \approx 73 \text{ \AA}$.

Dans la fig. C.15, la même chose est faite avec les données obtenues à partir des membranes 50 :50 (PC :Simulsol). La périodicité de ces échantillons est située autour de $73 \text{ \AA}$. Cette fois-ci les échantillons sont monophasiques, à l'exception d'un épaulement très faible sur l'échantillon à $\rho = 8,1$, courbe bleue dans la figure C.15(b). Cette constatation suggère que les propriétés élastiques de la phase hôte jouent également un rôle significatif sur la complexation, ce qui renforce l'importance majeure des interactions stériques dans la conduite des relations intermoléculaires dans le système étudié dans ce travail. En outre, ces constats soutiennent l'approche de Flory donnée par les auteurs de la réf. [16].

Outre la formation de superstructures polymorphes d'ADN entre bicouches, on a observé que l'introduction des nucléotides a des effets dramatiques sur l'ordre smectique de

FIGURE C.15 – Comparaison entre des formulations avec différentes valeurs de ρ , préparées à partir des membranes 50 :50 (PC :Simulsol). La périodicité lamellaire $d \approx 73 \text{ \AA}$ pour les quatre échantillons.

la phase hôte. Dans la fig. C.16, on présente une comparaison entre des spectres obtenus à partir d'échantillons avec et sans nucléotides. On peut noter que, malgré la *quasi* égalité des périodicités, les formulations contenant de l'ADN sont significativement plus ordonnées que le complexe sans ADN. Cette augmentation de l'ordre smectique est clairement attestée par l'apparition d'un troisième et d'un quatrième ordre lamellaires, ainsi que par l'affinement des raies de Bragg.

FIGURE C.16 – Comparaison entre des spectres obtenus à partir d'échantillons avec et sans ADN. La périodicité lamellaire est à peu près $d = 68 \text{ \AA}$. L'insertion d'ADN entre les bicouches augmente significativement l'ordre smectique. Les différences entre les formulations avec et sans sel sont négligeables.

C.5 Résultats dynamiques

C.5.1 Expériences de FRAP

On a réussi à obtenir des échantillons assez bien orientés pour deux compositions dans le ternaire ADN-lipides-eau, dont les fractions volumiques pour l'eau, l'ADN et les lipides sont, respectivement, 0,50, 0,08 et 0,42 pour l'échantillon le plus hydraté, avec une charge relativement plus petite en fragments d'ADN ($\rho = 5.1$), et de 0,38, 0,15 et 0,47 pour l'autre échantillon ($\rho = 3.1$), également plus riche en ADN.

Les deux échantillons sont macroscopiquement homogènes et leurs spectres qui aux petits angles montrent 4 raies de Bragg dans le rapports 1 :2 :3 :4, sont caractéristiques d'un empilement de bicouches lamellaires [19]. Bien que seulement l'échantillon moins hydraté présente aussi une bosse diffuse typique ayant pour origine l'ordre nématique des fragments confinés dans les couches d'eau, l'autre échantillon a probablement la même structure.

Les profils de retour de fluorescence s'écartent largement de la forme gaussienne pour les deux échantillons et les fonctions qui tiennent compte d'un seul coefficient de diffusion ne sont pas en mesure de bien décrire la région de la queue des données. Ces écarts sont clairement décrits dans la fig. C.17, où des profils typiques sont comparés et les ajustement faits soit avec une fonction de Gauss soit à partir de l'expression utilisant la fonction de Bessel modifiée, éq. C.6.

Le comportement temporel des deux variances obtenues pour l'échantillon avec $\rho = 5,1$ sont exposées dans la fig. C.18. Ces paramètres sont clairement distincts, à tout moment, ce qui témoigne, maintenant en termes quantitatifs, de la forme non gaussienne des profils de retour de fluorescence. Les coefficients de diffusion obtenus sont $D_{\parallel} = 1,3 \times 10^{-2} \mu m^2/s$ et $D_{\perp} = 2.8 \times 10^{-3} \mu m^2/s$, conduisant à un rapport d'anisotropie $D_{\parallel}/D_{\perp} \approx 4,5$.

Des résultats assez similaires sont obtenus pour l'échantillon plus riche en ADN. L'écart systématique des profils à la forme gaussienne a été observé tout au long de la série. Le comportement temporel des variances ajustées est montré dans la fig. C.19. Il a été observé que, au début de la série (jusqu'à $t \approx 250$ s), ni le profil gaussien, ni le modèle de Bessel modifié, n'ont été en mesure de donner une description satisfaisante des données expérimentales. Cet écart peut être éventuellement attribuée à la rusticité du traitement approximatif fait en établissant le modèle, mais cela ne devrait pas nuire à sa validité, au moins dans la limite des grandes valeurs de temps. En effet, la figure C.19 indique que les deux variances sont raisonnablement bien décrites par des lois linéaires pour $t \geq 250$ s. Malgré l'échec du modèle proche de $t = 0$, un tel comportement est la signature typique d'une dynamique brownienne. On a, donc, confiance à considérer les deux pentes résultant

FIGURE C.17 – Profils de fluorescence des expériences de FRAP sur d'échantillons ADN-lipides-eau, d'orientation homéotrope. Les lignes rouges sont des ajustements par des fonctions gaussiennes ou par l'éq. C.6.

d'une analyse des données basées sur C.6 comme étant directement liées aux deux coefficients de diffusion $D_{\parallel}$ et $D_{\perp}$. En termes quantitatifs, les coefficients de diffusion obtenus sont $D_{\parallel} = 2,7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_{\perp} = 6,6 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, avec un rapport d'anisotropie $D_{\parallel}/D_{\perp} \approx 40$.

À partir des résultats décrits ci-dessus, le modèle proposé par Dobrindt s'est révélé être approprié pour l'analyse par les profils de FRAP de la diffusion d'ADN entre des bicouches lipidiques. Des coefficients de diffusion parallèle et perpendiculaire à la direction nématique peuvent être extraits des données [24].

C.6 Conclusions et perspectives

Au long de cette thèse, les propriétés structurales et dynamiques d'un complexe hydraté formé à partir de fragments d'ADN (150 pb) et de bicouches non-cationiques ont été étudiés. La phase hôte a été obtenue

FIGURE C.18 – Variation temporelle des deux variances pour un échantillon avec $\rho = 5,1$ et $d = 77 \text{ \AA}$. Les lignes sont des ajustements linéaires qui conduisent à des coefficients de diffusion $D_{\parallel} = 1.3 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (○) et $D_{\perp} = 2.8 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Δ).

à partir de mélanges de phosphatidylcholines zwitterioniques et de Simulsol, un mélange de tensioactifs électriquement neutre. Les nucléotides, à leur tour, ont été obtenus par sonication de chaînes longues d'ADN de thymus de veau. Un accomplissement du travail est l'étude systématique du diagramme de phase de ce système, dont la région de faible hydratation a été étudiée ici pour la première fois. L'intégration complète des nucléotides à la phase lipidique a été observée pour être fortement liée à la quantité d'ADN dans le complexe, mettant en évidence l'importance des interactions de volume exclu sur la complexation et le comportement de phase. En outre, les analyses sur l'interaction des forces dans les phases lamellaires suggèrent que forces de fluctuation et d'hydratation sont des acteurs majeurs dans le complexe. Un autre résultat provenant de cette étude est la validation d'une proposition théorique pour l'extraction des coefficients de diffusion anisotrope dans les conditions très particulières de phases ordonnées d'ADN insérées dans les canaux d'eau d'une pile de membranes avec orientation homéotrope.

Trois caractéristiques spécifiques des complexes produits dans les conditions décrites ci-dessus méritent d'être soulignées dans ces remarques finales. En premier lieu, l'absence de charge nette sur les membranes permet d'exclure l'attraction entre des charges opposées comme acteur direct dans la complexation. Par conséquent, on a alors pour condition singulière d'étudier les effets des autres forces, en particulier celles d'origine entropique, dans l'interaction. Deuxièmement, puisque le système est formulé au dessous de sa limite d'hydratation, l'organisation des particules entre les bicouches est gouvernée par le *confinement* exercé par une matrice fluide, à l'échelle nanoscopique. Une troisième caractéristique re-

FIGURE C.19 – Variation temporelle des deux variances pour un échantillon avec $\rho = 3,1$ et $d = 69,6 \text{ \AA}$. Les lignes sont des ajustements linéaires qui conduisent à des coefficients de diffusion $D_{\parallel} = 2.7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (○) et $D_{\perp} = 6.6 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Δ).

marquable du système est la restriction du solvant à l'espacement intermembranaire, sans la présence d'échanges avec une solution en vrac. Cet attribut a vraisemblablement des conséquences directes sur le processus de libération de contre-ions. Vu que les ions Na^+ sont piégés entre les bicouches, le gain entropique associé au relargage de ces cations doit être limité quand on compare des systèmes où les ions sont expulsés de la phase hôte. Ce contexte exige des changements dans l'interprétation traditionnelle du mécanisme impliqué dans la formation des lipoplexes, où la libération de contre-ions a un rôle central. Par conséquent, un autre mécanisme doit être en scène ce qui, éventuellement, implique des effets interfaciaux dans les interfaces bicouches-eau et ADN-bicouches.

Le travail a commencé par étudier la structure de la phase hôte, c'est-à-dire, le système sans ADN composé uniquement par les lipides et le solvant. Une analyse détaillée montre que cette matrice lipidique s'auto-assemble dans des structures lamellaires à travers une large gamme d'hydratation. Cette affirmation est soutenue par des données des rayons X, ainsi que par des observations de microscopie électronique et optique. Deux régimes caractéristiques sont trouvés dans le domaine de dilution : le premier est régi par la loi de dilution usuelle $d = \delta_m / (1 - \phi_{wt})$. Dans le deuxième régime, un excès d'eau apparaît dans le système comme une conséquence de l'hydratation complète des membranes. Le comportement du paramètre de Caillé a montré que l'attraction de van der Waals est équilibrée par une interaction répulsive mixte résultant d'une combinaison entre forces d'hydratation et forces de Helfrich. En appliquant une approche proposée par Petrache et al. [132], on a été en mesure de déterminer la longueur de décroissance de cet interaction. La valeur trouvée est trois fois plus grande environ que celles généralement trouvées pour

des lamelles formées à partir de lécithines pures. Ces résultats montrent que l'ajout de Simulsol aux membranes accroît l'importance des forces entropiques dans le système.

Dans une deuxième étape, des complexes contenant de l'ADN ont été étudiés. Les propriétés de gonflement de la phase ont été utilisées pour contrôler le pas smectique et ajuster le confinement imposé par les couches des lipides sur les nucléotides insérés au sein de la phase. À part les contre-ions de sodium qui neutralisent les groupes phosphate de l'ADN, aucun ion supplémentaire n'a été introduit pour médier la complexation. Un riche polymorphisme supramoléculaire d'ADN, inséré dans des phases lipidiques multilamelaires, a été mis en évidence. La formation de domaines monophasiques a été trouvée être fortement dépendante de la quantité de nucléotides, étant observée uniquement pour des formulations riches en ADN, lorsque le rapport PC :Simulsol est 70 :30. Ceci suggère un rôle majeur des contraintes stériques et de forces à courte portée dans la complexation. Il a été trouvé que le confinement a des effets dramatiques sur l'assemblage supramoléculaire des complexes. Des modèles géométriques simples ont été proposés et ont été capables de bien décrire les organisations observées, en particulier lorsque les séparations entre membranes sont assez grandes pour accueillir des brins d'ADN sans besoin de déformations des bicouches. Il faut noter que les transitions entre mésophases n'apparaissent pas associées à des transitions $L_\alpha \rightarrow L_{\beta'}$ dans les membranes.

Lorsque la proportion PC :Simulsol est 50 :50, l'incorporation complète des nucléotides aux lamelles est également observée pour des quantités inférieures de l'ADN. Cependant, le comportement de phase en fonction de l'hydratation (ou du confinement) reste assez similaire à celui trouvé dans les complexes préparés avec les autres membranes (probablement plus rigides). En outre, l'ajout de sel, ce dont on présume qu'il diminue le gain d'entropie associé à la libération des contre-ions sodium [63], n'a eu aucun effet notable ni sur la formation du complexe, ni sur son comportement de phase. Ces observations renforcent le rôle des propriétés élastiques sur la formation du complexe, tel que calculé dans le modèle de volume exclu décrit dans la réf. [16], alors que le confinement semble être le moteur principal de l'organisation des particules entre des bicouches.

L'ajout d'acides nucléiques semble augmenter l'ordre de la phase smectique. La réduction de l'espace entre les membranes implique une diminution du degré de liberté pour les fluctuations, ce qui permet l'organisation de l'ADN dans des superstructures fortement corrélées. Une approche utilisant le modèle de Nallet et al. a été appliquée à ce système ternaire afin de quantifier cet effet. Les résultats montrent que les fluctuations chutent par un facteur d'environ un ordre de grandeur lors de l'insertion de l'ADN dans la phase hôte. Cependant, puisque le modèle de Nallet et al. n'a pas été développé pour tenir compte des particules insérées dans les canaux d'eau, la méthode n'est pas en mesure de bien ajuster

les spectres complets. Une perspective de bien décrire les facteurs de forme et de structure d'un tel complexe ADN-lipides-eau est en train de développement par Oliveira et al. [160]. La proposition est basée sur des techniques d'éléments finis qui sont utilisés pour simuler des courbes de dispersion des rayons X et découpler les facteurs de forme et de structure associés au complexe. Un exemple de ce calcul est montré dans la figure. C.20.

FIGURE C.20 – Simulation avec une méthode d'éléments finis : (a) Piles de lipides avec bâtonnets d'ADN entre des bicouches, construit à partir de sous-unités sphériques. (b) Diffractogrammes résultants obtenus à partir du modèle (figures aimablement fournies par C.L.P. Oliveira).

En ce qui concerne les analyses dynamiques, le modèle proposé par Dobrindt s'est avéré suffisant pour analyser les profils de FRAP dans des systèmes avec des conditions très spécifiques de symétrie pour les complexes étudiés dans ce travail : symétries locales nématiques de bâtonnets, moyennées le long d'un axe perpendiculaire aux directeurs nématiques. Même si la moyenne conduit à une symétrie axiale des profils de retour de fluorescence, les coefficients de diffusion parallèle et perpendiculaire au directeur nématique peuvent être extraits des données. Le confinement et la concentration des fragments d'ADN ont été variés simultanément, avec des rapports volumiques lipides :ADN et hauteur du canal de solvant, respectivement, $\rho = 5, 1$ et $40, 5$ Å pour un échantillon, $\rho = 3, 1$ et de $33, 1$ Å pour l'autre. Comme le diamètre de l'ADN, plus une couche d'hydratation, est d'environ 24 Å, dans les deux cas, le confinement des fragments d'ADN par les bicouches lipidiques est fort.

Le confinement des fragments d'ADN par les bicouches lipidiques semble être très efficace dans le ralentissement du mouvement brownien des particules. En revanche, l'augmentation de l'anisotropie de diffusion $D_{\parallel}/D_{\perp}$ peut, en principe, être attribuée à un effet de concentration. Cela ouvre aussi une perspective d'étude des effets interfaciaux impli-

qués dans les interactions entre l'ADN et les membranes, car le frottement des particules dans le plan de bicouches pourrait être dépendant du confinement. Les analyses structurales et dynamiques menées dans ce travail doivent être considérées dans un cadre de complémentarité, car il a été démontré que le profil de fluorescence des taches apporte également des informations sur la structure.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Malmsten. *Soft Matter*, (2):760–769, 2006.
- [2] R. Koynova and B. Tenchov. *Soft Matter*, 5:3187–3200, 2009.
- [3] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and Surfaces Forces*. Academic Press Limited, London, 1991.
- [4] P. L. Felgner. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:7413–7417, 1987.
- [5] P. L. Felgner and G. M. Ringold. *Nature*, 337:387–388, 1989.
- [6] P. L. Felgner and G. Rhodes. *Nature*, 349:351–352, 1991.
- [7] C. Safinya. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 11:440–448, 2001.
- [8] J. O. Radler; I. Koltover; T. Salditt and C. R. Safinya. *Science*, 275:810–814, 1997.
- [9] I. Koltover; T. Salditt; J. O. Radler and C. R. Safinya. *Science*, 281:78–81, 1998.
- [10] K. K. Ewert; H. M. Evans; A. Zidovska; N. F. Buxsein; A. Ahmad and C. R. Safinya. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:3998–4006, 2006.
- [11] J. Gustafsson; G. Arvidson; G. Karlsson and M. Almgren. *Biochim. Biophys. Acta*, 1235:305–312, 1995.
- [12] B. Sternberg; F.L. Sorgi and L. Huang. *FEBS Lett.*, 356:361–366, 1994.
- [13] B. J. Battersby; R. Grimm; S. Huebner and G. Cevc. *Biochim. Biophys. Acta*, 1372:379–383, 1998.

- [14] V. A. Rakhmanova; E. V. Pozharski and R. C. MacDonald. *J. Membr. Biol.*, 200:35–45, 2004.
- [15] D. Harries; S. May; W.M. Gelbart and A. Ben-Shaul. *Biophys. J.*, 75:159–173, 1998.
- [16] A. Colin and D. Roux. *Eur. Phys. J. E*, 8:499–506, 2002.
- [17] R. Podgornik and V. Parsegian. *Langmuir*, 8:557–562, 1992.
- [18] M. Manciu and E. Ruckenstein. *Adv. Coll. Interf. Sc.*, 112:109–128, 2004.
- [19] E. R. Teixeira da Silva; E. Andreoli de Oliveira; A. Fevrier; F. Nallet and L. Navailles. *Eur. Phys. J. E*, 34:83, 2011.
- [20] E. Andreoli de Oliveira; E. R. Teixeira da Silva; E. Grelet; A. Fevrier; F. Nallet and L. Navailles. *Europhys. Lett.*, 91:28001, 2010.
- [21] C. Leal; D. Topgaard; R. W. Martin and H. Wennerstrom. *J. Phys. Chem. B*, 108:15392–15397, 2004.
- [22] B. Maier and J. Rädler. *Phys. Rev. Lett.*, 82:1911, 1999.
- [23] J. Dobrindt. Dna diffusion in concentrated aqueous solution and confined between lipid bilayers. Master’s thesis, University of Bordeaux-Centre de Recherche Paul-Pascal, 2006.
- [24] J. Dobrindt; E. R. Teixeira da Silva; C. Alves; C. L. P. Oliveira; F. Nallet; E. Andreoli de Oliveira and L. Navailles. *accepted by EPJE*, 2011.
- [25] C. R. Cantor and P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry part I*. W.H. Freeman and Company, 2002.
- [26] J. F. Faucon and P. Méléard. *Liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Les Editions INSERM, 1993.
- [27] J. Seeling; H. U. Gally and R. Wohlgemuth. *Biophys. Biochim. Acta*, 467:109–119, 1977.
- [28] P. G. de Gennes and J. Prost. *The physics of liquid-crystals*. Claredon Press, Oxford, 1993.
- [29] G. Tresset. *PMC Biophysics*, (2):doi: 10.1186/1757–5036/2/3, 2009.
- [30] D. Harries. *Electrostatic interaction between macromolecules and mixed lipid bilayers*. PhD thesis, Hebrew University Senate, 2001.

- [31] F. Livolant and A. Leforestier. *Prog. Polym. Sc.*, 21:1164–1996, 1996.
- [32] H. Lowen. *Phys. Rev. E*, 59:1989–1995, 1999.
- [33] R. Podgornik; H. H. Strey and V. A. Parsegian. *Curr. Op. Coll. Int. Sc.*, 3:534–539, 1998.
- [34] D. Roux; C. Safinya and F. Nallet. *Micelles, membranes, microemulsions and monolayers*, pages 303–346. Springer-Verlag, New York, 1994.
- [35] G. S. Smith; E. B. Sirota; C. R. Safinya and Clark N. A. *Phys. Rev. Lett.*, (60):813–816, 1988.
- [36] O. Diat; D. Roux and F. Nallet. *J. Phys. II France*, 3:1427–1452, 1993.
- [37] F. Nallet; D. Roux; C. Quiliet; P. Fabre and S. T. Milner. *J. Phys. II France*, 4:1477–1499, 1994.
- [38] F. Nallet; D. Roux and J. Prost. *Phys. Rev. Lett.*, 62:276–279, 1989.
- [39] T. Charitat and S. Lecuyer. *Biointerphases*, 3(2), 2008.
- [40] D. Sornette and N. Ostrowsky. *Micelles, membranes, microemulsions and monolayers*, pages 251–295. Springer-Verlag, New York, 1994.
- [41] W. Helfrich and R. M. Servuss. *Nuovo Cimento*, 3:137–151, 1984.
- [42] D. Roux and C. Safinya. *J. Phys. II France*, 49:307–318, 1988.
- [43] J. N. Israelachvili and H. Wennerstrom. *J. Phys. Chem.*, 96:520–531, 1992.
- [44] J. Faraudo and F. Bresme. *Phys. Rev. Lett.*, 94:07782, 2005.
- [45] D. M. LeNeveu; R. P. Rand; V. A. Parsegian and D. Gingell. *Biophys. J.*, 18:209–230, 1977.
- [46] S. Leikin; V. A. Parsegian and D. C. Rau. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 44:369–395, 1993.
- [47] R. Podgornik; D. Harries; J. DeRouchey; H.H. Strey and V. A. Parsegian. *Gene Therapy - therapeutic mechanisms and strategies*, chapter Interaction in macromolecular complexes used as nonviral vector for gene delivery, pages 443–478. 2003.
- [48] W. Helfrich. *Z. Naturforsch.*, 28c:693–703, 1973.

- [49] W. Helfrich. *Z. Naturforsch.*, 33a:305–315, 1978.
- [50] W. Gelbart; R. Bruinsma; P. Pincus and V. Parsegian. *Phys. Today*, 53:38–44, 2000.
- [51] J. D. Watson and F.H.C. Crick. *Nature*, (171):737–738, 1953.
- [52] C. R. Calladine; H. R. Drew; B. F. Luisi and A. A. Travers. *Understanding DNA*. Elsevier Academic Press, London, 2004.
- [53] A. Meyer-Koll; C. Fleck and H. von Gronberg. *J. Phys. Condens. Matter*, 16:6041–6052, 2004.
- [54] S. May and A. Ben-Shaul. *Curr. Med. Chem.*, 11:151–167, 2004.
- [55] M. Feig and B. M. Pettitt. *Biopolym.*, 48:199–209., 1998.
- [56] C. Leal; L. Wadso; G. Olofsson; M. Miguel and H. Wennerstrom. *J. Phys. Chem. B.*, 108:3044–3050, 2004.
- [57] G. S. Manning. *Biophys. Chem.*, 51:924–933, 1969.
- [58] T. E. Strzelecka and R. L. Rill. *Macromol.*, 24:5124–5133, 1991.
- [59] R. Podgornik; H. H. Strey; D. C. Rau and V. A. Parsegian. *Biophys. Chem.*, 57:111–121, 1995.
- [60] H. H. Stry; R. Podgornik; D. C. Rau and A. Parsegian. *Curr. Op. Struc. Biol.*, 8:309–313, 1998.
- [61] D.C. Rau; B. Lee and V. A. Parsegian. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 81:2621–2625, 1984.
- [62] G. Odriozola; F. Jimenez-Angeles and M. Lozada-Cassou. *Phys. Rev. Lett.*, 97:018102, 2006.
- [63] I. Koltover; K. Wagner and C. R. Safinya. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 97:14046–14051, 2000.
- [64] T. Pott and D. Roux. *FEBS Lett.*, 511:150–154, 2002.
- [65] H. Liang; D. Harries and G. C. L. Wong. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 102:11173–11178, 2005.
- [66] F. Artzner; R. Zantl; G. Rapp and J. O. Radler. *Phys. Rev. Lett.*, 81:5015–5018, 1998.

- [67] G. Caracciolo; D. Pozzi; R. Caminiti; G. Mancini; P. Luciani and H. Amenitsch. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:10092–10093, 2007.
- [68] O. Farago and N. Gronbech-Jensen. *Phys. Rev. Lett.*, 96:0181102, 2006.
- [69] L. Golubovic; T.C. Lubensky and C.S. O’Hern. *Phys. Rev. E*, 62:1069–1093, 2000.
- [70] C. S. O’Hern and T. C. Lubensky. *Phys. Rev. Lett.*, 80:4345–4348, 1998.
- [71] R. Bruinsma. *Eur. Phys. J. B*, 4:75–88, 1998.
- [72] A.G. Cherstvy. *J. Phys. Chem. B*, 111:7914–7927, 2007.
- [73] S. May; D. Harries and A. Ben-Shaul. *Biophys. J.*, 78:1681–1697, 2000.
- [74] O. Farago and N. Gronbech-Jensen. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:2875–2881, 2009.
- [75] O. Farago and N. Gronbech-Jensen. *Soft Mat.*, 7:4302–4306, 2011.
- [76] K. Wagner; D. Harries; S. May; V. Kahl; J. O. Radler and A. Ben-Shaul. *Langmuir*, 16:303–306, 2000.
- [77] R.S. Shirazi; K. K. Ewert; C. Leal; R. N. Majzoub; N. F. Bouxein and C. R. Safinya. *Biochem. Biophys. Acta*, page DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.04.020, 2011.
- [78] C. Leal; N.F. Bouxein; K. K. Ewert and C. R. Safinya. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:16841–16847, 2010.
- [79] N. F. Bouxein; C. S. McAllister; K. K. Ewert; C. E. Samuel and C. R. Safinya. *Biochem.*, 46:4785–4792, 2007.
- [80] C.R. Dass. *J. Mol. Med.*, 82:579–591, 2004.
- [81] M. C. Fillion and N. C. Phillips. *Biochem. Biophys. Acta*, 1329:345–356, 1997.
- [82] J. J. McManus; J. O. Radler and K. A. Dawson. *Langmuir*, 19:9630–9637, 2003.
- [83] J. J. McManus; J. O. Radler and K. A. Dawson. *J. Phys. Chem. B*, 107:969–9873, 2003.
- [84] A. Bilalov; U. Olsson and B. Lindman. *Soft Matt.*, 7:730–742, 2011.
- [85] D. Roux; P. Chenevier; T. Pott; L. Navailles; O. Regev and O. M. Monval. *Curr. Med. Chem.*, 11:169–177, 2004.
- [86] T. Pott; A. Colin; L. Navailles and D. Roux. *Interf. Sci.*, 11:249–257, 2003.

- [87] A. Caille. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 274:891–893, 1972.
- [88] E. Kurtisovski. *Relation structure-propriétés dans les bicouches gonflées de phases lamellaires*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, 2007.
- [89] G. Pabst; M. Rappolt; H. Amenitsch and P. Laggner. *Phys. Rev. E*, 62:4000–4009, 2000.
- [90] B. Pozo-Navas K. Lohner G. Pabst, R. Koschuch and P. Laggner. *J. App. Cryst.*, 36:1378 – 1388, 2003.
- [91] R. Zhang; R. M. Suter and J. F. Nagle. *Phys. Rev. E*, 50:5047–5060, 1994.
- [92] C. R. Safinya; D. Roux; G. S. Smith; S. K. Sinha; P. Dimon; N.A. Clark and A. M. Bellocq. *Phys. Rev. Lett.*, 57:2718–2721, 1986.
- [93] F. Nallet; R. Laversanne and D. Roux. *J. Phys. II France*, 3:487–502, 1993.
- [94] M. F. Ficheux; A. M. Bellocq and F. Nallet. *Eur. Phys. J. E*, 4:315–326, 2001.
- [95] G. Bouglet and C. Ligoure. *Eur. Phys. J. E*, 9:137–147, 1999.
- [96] B. Yang; J. Lal; P. Richetti; C. Marques; W. Russel and R. Prudhomme. *Langmuir*, 17:5834–5841, 2001.
- [97] I. Grillo; P. Levitz and Th. Zemb. *Eur. Phys. J. E*, 5:377–386, 2001.
- [98] G. Pabst. *Biophys. Rev. Lett.*, 1:57–84, 2006.
- [99] P. Moreau; D. van Effenterre; L. Navailles; F. Nallet and D. Roux. *Eur. Phys. J. E*, 26:225–234, 2008.
- [100] A. Pluen; P. A. Netti; R. K. Jain and D. A. Berk. *Biophys. J.*, 77:542–552, 1999.
- [101] S. Nehls; E. L. Snapp; N. B. Cole; K. J. M. Zaal; A.K. Kenworthy; T. H. Roberts; J. Ellenberg; J. F. Presley; E. Siggia and J. Lippincott-Schwartz. *Nature Cell Biol.*, 2:288–295, 2000.
- [102] V. Chan; D. J. Graves; P. Fortina and S.E. McKenzie. *Langmuir*, 13:320–329, 1997.
- [103] M. M. Tirado and J. Garcia de la Torre. *J. Chem. Phys.*, 71:2581–2587, 1979.
- [104] M. M. Tirado and J. Garcia de la Torre. *J. Chem. Phys.*, 81:2047–2052, 1984.
- [105] B. A. Scalettar; J. E. Hearst and M. P. Klein. *Macromol.*, 22:4550–4559, 1989.

- [106] L. Wang; M. M. Garner and H. Yu. *Macromol.*, 24:2368–2376, 1991.
- [107] K. Braeckmans; L. Peeters; N. N. Sanders; S. C. De Smedt and J. Demeester. *Biophys. J.*, 85:2240–2252, 2003.
- [108] S. A. Tartakova and D. A. Berk. *Phys. Rev. E*, 71:041913, 2005.
- [109] C. Alves. Propriedades dinâmicas de fases condensadas de dna. Master’s thesis, Universidade de São Paulo-Instituto de Física, 2010.
- [110] G. L. Lukacs; P. Haggie; O. Seksek; D. Lechardeur; N. Freedman and A. S. Verkman. *J. Biol. Chem.*, 275:1625–1629, 2000.
- [111] M.P.B. van Bruggen; H.N.W. Lekkerkerker; G. Maret and J.K.G. Dhont. *Phys. Rev. E*, 58:7668–7677, 1998.
- [112] J. Crank. *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press, Oxford, 1975.
- [113] S. Seiffert and W. Oppermann. *J. Microsc.*, 220:20–30, 2005.
- [114] G. Hauser; S. Seiffert and W. Oppermann. *J. Microsc.*, 230:353–362, 2008.
- [115] T. K. L. Meyvis; S. C. De Smedt; P. van Oostveldt and J. Demeester. *Pharm. Res.*, 16:1153–1162, 1999.
- [116] J. Dobrindt. Dna diffusion in concentrated aqueous solution and confined between lipid bilayers. Defence talk, 2006. Centre de Recherche Paul-Pascal.
- [117] C. Carlsson; A. Larsson; M. Jonsson; B. Albinsson and B. Norden. *J. Phys. Chem.*, 98:10313–10321, 1994.
- [118] A. Larsson; C. Carlsson; M. Jonsson and B. Albinsson. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:8459–8465, 1994.
- [119] Sigma Aldrich. Product information sheet n. p7443. Technical report, Sigma Aldrich, 2007.
- [120] D. Marsh. *Biophys. J.*, 61:1036–1040, 1992.
- [121] Seppic. Product information n. 38387a. Technical report, Seppic.
- [122] J. Perez; F. Artzner; P. Barois; C. Bourgaux; P. Davidson; O. Lyon; A. Naudon; P. Panine; P. Vachette and Th. Zemb. Proposal for a small-angle x-ray scattering instrument at soleil : scientific case and brief technical description. Technical report, Synchrotron SOLEIL, 2002.

- [123] B.D. Cullity. *Elements of X-rays diffraction*. Addison-Wesley, Massachussets, 1956.
- [124] T. C. Huang; H. Toraya; T. N. Blanton and Y. Wu. *J. Appl. Cryst.*, 26:180–184, 1993.
- [125] J. S. Pedersen; D. Posselt and K. Mortensen. *J. Appl. Cryst.*, 23:321–333, 1990.
- [126] O. Francescangeli; M. Pisani; V. Stanic; P. Bruni and T. M. Weiss. *Europhys. Lett.*, 67:669–675, 2004.
- [127] E. Shyamsunder; S. M. Gruner; M. W. Tate; D. C. Turner and P. T. C. So. *Biochem.*, 27:2332–2336, 1988.
- [128] P. Barois; S. Hyde; B. Ninham and T. Dowling. *Langmuir*, 6:1136–1140, 1990.
- [129] N. J. Servers. *Nature Protocols*, 2:547–576, 2007.
- [130] S. Seiffert and W. Oppermann. *Polym.*, 49:4115–4126, 2008.
- [131] G. I. Hauser. *Umsetzung eines Verfahrens zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten*. PhD thesis, Technische Universitat Clausthal, 2008.
- [132] H. I. Petrache; N. Gouliaev; S. Tristam-Nagle; R. Zhang; R. M. Suter and J. F. Nagle. *Phys. Rev. E*, 57:7014–7024, 1998.
- [133] H. I. Petrache. *Structure and interactions of fluid phospholipid bilayers measured by high resolution X-ray scattering*. PhD thesis, Carnegie Mellon University, 1998.
- [134] H. I. Petrache; S. Tristam-Nagle and J. F. Nagle. *Chem. Phys. Lip.*, 95:83–94, 1998.
- [135] J. Nagle and S. Tristam-Nagle. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 10:474–480, 2000.
- [136] T. McIntosh. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 10:481–485, 2000.
- [137] N. Kucerka; J. Nagle; J. Sachs; S. Feller; J. Pencer; A. Jackson and J. Katsaras. *Biophys. J.*, 95:2356–2367, 2008.
- [138] N. Kucerka; Y. Liu; N. Chu; H. I. Petrache; S. Tristram-Nagle and J. F. Nagle. *Biophys. J.*, 88:2626–2637, 2005.
- [139] S. D. Guler; D. D. Ghosh; J. Pan; J. C. Mathai; M. L. Zeidel; J. F. Nagle and Stephanie Tristram-Nagle. *Chem. Phys. Lip.*, 160:33–44, 2009.
- [140] P. Berntsen; C. Svanberg and J. Swenson. *J. Phys. Chem. B*, 115:1825–1832, 2011.

- [141] G. Pabst; N. Kucerka; M. Nieh; M. Rheinstadter and J. Katsaras. *Chem. Phys. Lip.*, 163:460–470, 2010.
- [142] J. Pan; S. Tristam-Nagle and J. F. Nagle. *Phys. Rev. E*, 80:021931, 2009.
- [143] T. Salditt; I. Koltover; J. O. Radler and C. R. Safinya. *Phys. Rev. Lett.*, 79:2582–255, 1997.
- [144] D. Durant; J. Doucet and F. Livolant. *J. Phys. II France*, 2:1769–1783, 1992.
- [145] P. Pinto da Silva and D. Branton. *J. Cell Biol.*, 45:598–605, 1970.
- [146] F. Livolant. *Physica A*, 176:117–137, 1991.
- [147] A. Leforestier and F. Livolant. *Biophys. J.*, 73:1771–1776, 1997.
- [148] F. Livolant; A. M. Levelut; J. Doucet and J. P. Benoit. *Nature*, 339:724–726, 1989.
- [149] S. Weinkauf and L. Bachmann. *Ultramicroscopy*, 46:113–134, 1992.
- [150] O. Mondain-Monval. *Curr. Op. Coll. Interf. Sc.*, 10:250–255, 2005.
- [151] M. D. Rogers. *J. Sci. Instrum.*, 43:390–391, 1966.
- [152] R. Koynova; L. Wang and R. MacDonald. *Mol. Pharmaceut.*, 5:739–744, 2008.
- [153] P. Alexandridis; U. Olsson and B. Lindman. *Langmuir*, 13:23–34, 1997.
- [154] V. Ponsinet and P. Fabre. *J. Phys. II France*, 6:955–960, 1996.
- [155] Y. Suganuma; M. Imai and K. Nakaya. *J. Appl. Crystallogr.*, 40:S303–S306, 2007.
- [156] J.P. de Silva; A.S. Poulos; B. Pansu; P. Davidson; B. Kasmi; D. Petermann; S. Asnacios; F. Meneau and M. Impérator. *Eur. Phys. J. E*, 34:4, 2011.
- [157] R. Koynova and R. MacDonald. *Nanoletters*, 4:1475–1479, 2004.
- [158] M. D. Abramoff; P. J. Magalhaes and S. J. Ram. *Biophot. Intern.*, 11:36–42, 2004.
- [159] M. P. Lettinga; J. K. G. Dhont; Z. Zhang; S. Messlinger and G. Gompper. *Soft Matt.*, 6:4556–4562, 2010.
- [160] C.L.P. de Oliveira. Private communication.