Universidade de São Paulo

Instituto de Física

Comportamento térmico peculiar de dispersões aquosas do fosfolipídio aniônico DMPG

Karin do Amaral Riske

SBI-IFUSP

305M810T3511

Tese apresentada ao Instituto de Física
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

Comissão Examinadora:

M. Teresa Lamy Freund	(Orientadora)
Marcel Tabak	(IQSC-USP)
Iris Torriani	(IFGW-Unicamp)
Iolanda Cuccovia	(IQUSP)
Rosangela Itri	(IFUSP)

São Paulo

Prof. Armando Corbani Ferraz
Presidente da Comissão de Pós Graduação

2001

data da defesa 27/04/01.

512.57
R595C
D
ex. 1

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

Karin do Amaral Riske

Comportamento Térmico Peculiar de Dispersões
Aquosas do Fosfolípido Aniônico DMPG.
São Paulo, 2001.

Tese (Doutoramento) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física – Departamento de Física Geral

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund
Área de Concentração: Biofísica

Unitermos: 1. Lipídios Carregados;
2. DMPG; 3. EPR; 4. SAXS; 5. DSC.

USP/IF/SBI-026/2001

Agradecimentos

À Teresa, pela orientação sempre presente nesses vários anos, pelas discussões científicas e ensinamentos de EPR, pelo apoio intenso, pela confiança em mim, e pela amizade.

Ao Hans-Günther, meu orientador temporário durante meus dois estágios no Max Planck Institute of Colloids and Interface Science, na Alemanha, pelo apoio constante, pelas discussões proveitosas e por interessar-se pelo DMPG.

Aos colaboradores diretos deste trabalho: Barney Bales, Otaciro R. Nascimento, Carla Goldman, Lia Queiroz do Amaral, Hans-Günther Döbereiner, Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turchiello.

Aos que cederam seus aparelhos para realização de algumas experiências: Hans-Günther Döbereiner (microscópio ótico e DSC), Watson Loh (DSC e tensiômetro), Otaciro R. Nascimento (EPR de banda-Q e L), Iris Torriani (responsável pela linha de SAXS do LNLS), Gehard Brezezinsky (DSC), Lia Q. do Amaral e Rosângela Itri (anodo rotatório-SAXS), e Iolanda Cuccovia (condutivímetro e ITC).

Aos que deram uma mãozinha importante em algumas experiências: Roberto M. Fernandez, Rozane F. Turchiello, Amando Ito, Watson Loh e seu estudante Luis Henrique, Guinther e Tomás do LNLS, Lúcia Bianconi, e do Max Planck, Peter Petrov, Rumiana Dimova e Eurídice Vieira.

Aos que trouxeram importantes contribuições teóricas para este problema: Carla Goldman, que desenvolveu um modelo matemático para o problema do DMPG, Vera Henriques, Iolanda Cuccovia, Lia Q. Amaral, Hans-Günther Döbereiner e Roland Netz.

À Carla, pelo interesse contínuo neste trabalho e pela amizade.

Ao Roberto, técnico do laboratório, pela ajuda em muitas experiências.

Ao Rafael, estudante de iniciação, pela realização das medidas com DPPG.

À minha mãe, pelo apoio científico na parte de raio-X, e pelo apoio pessoal.

Aos meus companheiros de sala: Rozane, Roberto, Flávia, e mais recentemente, Cássia, Alessandro Garotinho e Rafael, pelo companheirismo, apoio e bate-papo.

À Dirce e Ivone, secretárias da FGE, e ao Alexandre, pelo suporte.

Ao pessoal da Biofísica e do corredor, pelo bom-humor, jogos de Volley, e principalmente pelas tão famosas e animadas festinhas.

Aos amigos do Max Planck, pelo apoio num país estrangeiro: Eurídice e André, pela grande amizade e pelas inúmeras horas de bate-papo em português (autêntico), Peter e Romy, pela ajuda no laboratório e pelas divertidas conversas búlgaras, Alberto, Vera, Tony e Isabel, pela amizade "latina" e Andreas, Michael e Henning pela amizade "germânica".

À Marcia e ao Munir, pela amizade constante, pelo coral, pelos jogos de poker, passeios gastronômicos, viagens, diversão, etc...

À Marisa, pela amizade desde os tempos do Curso de Ciências Moleculares.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado e apoio reserva técnica, que permitiu um estágio por 3 meses no MPIKG-Golm, Alemanha.

À CAPES e ao DAAD, pelo financiamento de outro estágio de 3 meses no MPIKG-Golm, Alemanha.

Ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), pelo financiamento parcial.

Nomenclatura

14-PCSL	1-Palmitoil-2-(14-doxilestearoil) fosfatidilcolina
16-MESL	16-doxil metil ester do ácido esteárico
16-PCSL	1-Palmitoil-2-(16-doxilestearoil) fosfatidilcolina
16-SASL	16-doxil ácido esteárico
A	anisotropia de fluorescência
a_o	desdobramento hiperfino médio (EPR)
dCAT1	iodeto de 4-trimetilamônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina- d_{17} -1-oxil
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-Fosfocolina
DMPG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] - sal de sódio
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC	calorimetria diferencial de varredura
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
GUV's	vesículas unilamelares gigantes
h_0/h_{+1}	razão entre as intensidades dos picos central e de campo baixo no espectro de EPR
Hepes	ácido de N- (2-Hidroxietil)-Piperazina-N'-2-etano sulfônico
LUV's	vesículas unilamelares grandes
L_α	fase lamelar fluida
L_β	fase lamelar gel
MLV	vesículas multilamelares
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
P	partição membrana água (# moles na superfície / # moles total)
SAXS	espalhamento de raio-X de baixo ângulo
SDS	dodecil sulfato de sódio
T_m	temperatura de transição principal (gel - cristal-líquido)
T_m^{off}	final da transição de fase principal (gel - cristal-líquido)
T_m^{on}	início da transição de fase principal (gel - cristal-líquido)
T_p	temperatura da pré-transição (gel - <i>ripple</i>)
Ψ_o	potencial eletrostático de superfície
$\tau_{//}, \tau_{\perp}$	tempos de correlação paralelo e perpendicular à direção principal de rotação

Resumo

Dispersões aquosas do fosfolípido aniônico DMPG (dimiristoilfosfatidil glicerol) apresentam um comportamento térmico muito peculiar e interessante, principalmente em baixa força iônica. Neste trabalho, mostramos que o DMPG em baixa força iônica apresenta dois regimes com comportamentos térmicos muito distintos, dependendo da concentração lipídica. Acima de uma certa faixa de concentração c' ($c' = 0,4 \pm 0,2$ mM), a transição principal gel - cristal-líquido do DMPG não se dá de uma forma brusca, em um intervalo estreito de temperatura, como em muitos dispersões lipídicas, mas apresenta uma região de transição gel - cristal-líquido delimitada por temperaturas aqui denominadas T_{m}^{on} e T_{m}^{off} . Na condição de força iônica mais estudada (tampão Hepes + 2 mM NaCl), $T_{m}^{on} = 17,5$ °C e $T_{m}^{off} \sim 35$ °C. Essa região é chamada, no presente trabalho, de fase intermediária, por estar entre as fases gel e fluida, e por conter propriedades específicas, tais como baixo espalhamento de luz e de raio-X de baixo ângulo, e alta condutividade elétrica e viscosidade. A extensão em temperatura da fase intermediária diminui com o aumento da força iônica e concentração lipídica, até que uma temperatura de transição de fase única, centrada em T_m , é observada. As diversas técnicas utilizadas neste trabalho (espalhamento de luz, calorimetria diferencial de varredura, ressonância paramagnética eletrônica, anisotropia de fluorescência, espalhamento de raio-X de baixo ângulo e microscopia ótica), sugerem que em T_{m}^{on} ocorre um aumento considerável no potencial eletrostático de superfície, levando a um aumento da repulsão entre cabeças polares adjacentes e possivelmente entre vesículas. Esse processo dispararia o início da fusão das cadeias hidrocarbônicas e só seria completado acima de T_{m}^{off} . A fase intermediária é caracterizada por um empacotamento não usual da membrana, que pode ser causado pela presença de regiões de altíssima curvatura com grande mobilidade e, possivelmente, com uma maior densidade superficial de cargas.

Por outro lado, o comportamento térmico do DMPG abaixo de c' é bem distinto. A fase intermediária não está presente e o sistema apresenta uma transição de fase centrada em uma única temperatura, T_m . O valor de T_m cresce de 27,5 °C em 0,1 mM DMPG para 41 °C em 5 μ M DMPG. Um valor tão alto de T_m no regime concentrado foi obtido somente em pH baixo, quando o DMPG encontra-se em seu estado protonado. Foi observado que o valor de T_m , contrário ao esperado em dispersões lipídicas carregadas, diminui consideravelmente com o aumento da concentração de NaCl. Propusemos, então, que abaixo de c' ocorre uma mudança acentuada na superfície da bicamada, tendo como consequência um enorme aumento da afinidade por prótons dos grupos fosfato do DMPG, levando à neutralização completa da superfície lipídica em torno de 5 μ M.

Os resultados obtidos no presente trabalho são muito interessantes do ponto de vista do estudo físico-químico de agregados anfífilos carregados. Além disso, as propriedades do fosfolípido aniônico DMPG podem ter alguma relevância biológica em domínios específicos de membranas de procariontes.

Abstract

Aqueous dispersions of the anionic phospholipid DMPG (dimyristoylphosphatidyl glycerol) present a very interesting and peculiar thermal behavior, mainly at low ionic strength. In this work, we show that DMPG at low ionic strength presents two regimes with very different thermal behaviors, depending on the lipid concentration. Above a certain concentration range c' ($c' = 0,4 \pm 0,2$ mM), the gel-fluid main transition of DMPG does not occur in a narrow temperature interval, as shown by many lipid dispersions, but rather presents a gel-fluid transition region delimited by temperatures here called T_{m}^{on} and T_{m}^{off} . At the standard ionic strength condition used (Hepes buffer + 2 mM NaCl), $T_{m}^{on} = 17.5$ °C and $T_{m}^{off} \sim 35$ °C. This region is called intermediate phase in the present work, since it occurs between the gel and fluid phases, and due to its specific properties, such as low light and small angle X-ray scattering, and high electrical conductivity and viscosity. The temperature extension of the intermediate phase decreases with the increase in ionic strength and lipid concentration, till a single main phase transition, centered at T_m , is observed. The different techniques used in this work (light scattering, differential scanning calorimetry, electron spin resonance, fluorescence anisotropy, small angle X-ray scattering and optical microscopy), suggest that a considerable increase in the electrostatic surface potential occurs at T_{m}^{on} , leading to an increase in the repulsion between adjacent headgroups, and possibly between vesicles. This process would trigger the beginning of the melting of the hydrocarbon chains, which would finish above T_{m}^{off} . The intermediate phase is characterized by a non usual membrane packing, that could be caused by the presence of highly curved regions presenting a loose packing, possibly with higher surface charge density.

On the other hand, the thermal behavior of DMPG below c' is very different. The intermediate phase is not present and the system displays a main phase transition centered at a unique temperature, T_m . The value of T_m increases from 27.5 °C at 0.1 mM DMPG to 41 °C at 5 μ M DMPG. Such a high T_m value was only found in concentrated DMPG dispersion at low pH, when DMPG is in its protonated state. We observed that the T_m value, contrary to the expected for charged lipid dispersions, decreases significantly with the increase in NaCl concentration. We propose, then, that below c' the surface bilayer markedly changes, resulting in a huge increase in the proton affinity to the DMPG phosphate groups, which would lead to a complete neutralization of the lipid surface around 5 μ M.

The results presented here are very interesting concerning the physical chemistry of charged amphiphilic aggregates. Furthermore, the properties of the anionic phospholipid DMPG might have some biological relevance in specific domains of prokaryotic membranes.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Nomenclatura	iii
Resumo	iv
Abstract	v
I. Introdução	1
II. Técnicas	12
1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	12
2. Espectroscopia de Fluorescência	27
3. Espalhamento e Difração de Raio-X	36
III. Materiais e Métodos	43
1. Materiais	43
2. Métodos	45
IV. Resultados e Discussões	50
1 Dispersões concentradas	50
1.1 Espalhamento de luz	51
1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	56
1.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	61
i) Interior da bicamada lipídica	62
a) 14-PCSL	62
b) 16-PCSL	65
ii) Superfície lipídica e estimativa do potencial de superfície Ψ_0	83
1.4 Anisotropia de Fluorescência	97
1.5 Espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS)	100
1.6 Microscopia Ótica	112
2. Dispersões diluídas	120
V. Conclusões	134
1. Caracterização do comportamento térmico do DMPG	134
2. Fase intermediária	136
3. Dispersões diluídas	139
4. Caminhos futuros	140
Apêndice	142
A.1 Modelo de Gouy-Chapman-Stern	142
A.2 Modelo de partição entre dois sítios	147
A.3 Modelo de densidade eletrônica da bicamada	149
Referências	151

I. INTRODUÇÃO

Membranas biológicas

(Gennis, 1989 e Sackmann, 1995)

A função mais importante de membranas biológicas é a separação seletiva que ela propicia, seja do meio extra-celular para o intra-celular, seja deste para o interior das organelas ou do núcleo. Essa separação foi certamente crucial para que a vida pudesse aparecer, ou pelo menos, para que ela prosperasse. As membranas biológicas são formadas basicamente por lipídios e proteínas, como mostra a Fig. I.1. Entretanto, são certamente os lipídios que dão a estrutura básica das membranas, devido a suas propriedades de auto-associação em meio aquoso, que serão discutidas no próximo item. A bicamada lipídica forma uma superfície flexível e estável que serve como uma matriz onde as proteínas inserem-se total ou parcialmente. Essas proteínas têm funções específicas, tais como transporte de moléculas ou íons através da membrana e transdução de sinais. A maioria dos principais processos bioquímicos tem pelo menos um passo envolvendo a membrana. Além da bicamada formada por lipídios e proteínas, as membranas plasmáticas possuem polissacarídeos na monocamada externa. A enorme especificidade das diferentes membranas de um ser vivo é proporcionada justamente por suas diferentes composições lipídicas e protéicas. Além disso, existe, em geral, uma grande assimetria entre as camadas interna e externa de uma mesma membrana, tanto na distribuição de proteínas quanto de lipídios.

Pode parecer, à primeira vista, que a fase lipídica só seria relevante por dar suporte às proteínas, que seriam então as grandes responsáveis pelos vários processos bioquímicos das células. Entretanto, mais e mais papéis essenciais desenvolvidos pelos lipídios são descobertos, assim como várias doenças causadas por uma disfunção na distribuição de lipídios em certas membranas. A grande assimetria na distribuição dos lipídios é uma forte indicação das funções específicas destes.

Fig. I.1 - Representação esquemática da membrana plasmática, mostrando os lipídios, com destaque para o colesterol, e glicolipídios, proteínas, açúcares. Fig. 11-21 em Voet & Voet, 1995.

Nas membranas biológicas encontramos vários tipos de lipídios, que são compostos por um grupo polar e por cadeias hidrocarbônicas. Em geral, lipídios naturais possuem duas cadeias acila, que podem ter entre 16 e 24 carbonos de comprimento, com até 6 insaturações (duplas ligações). Os grupos polares podem ser neutros, com carga total zero (iso-elétricos ou *zwitteriônicos*) ou negativamente carregados, o que confere às membranas uma carga total negativa. A grande maioria das membranas possui cerca de 10 mol% de lipídios negativos. A família de lipídios mais comum em membranas biológicas são os diacil-glicero-fosfolipídios, que contêm duas cadeias hidrocarbônicas e um grupo fosfato, ligados a um glicerol (Fig. I.2a). Diferentes grupos podem ligar-se ao grupo fosfato, formando a chamada cabeça polar do lipídio, tais como a colina (PC), a etanolamina (PE), a serina (PS), o glicerol (PG), o inositol (PI) ou simplesmente o hidrogênio (PA). Essa família de fosfolipídios tem sido vastamente estudada. Além desses lipídios existem os cerebrosídeos, esfingomielina, gangliosídeos e glicolipídios. Um grupo de lipídios também muito importante são os esteróis, como o colesterol, presente em praticamente todas as membranas, em geral em proporções bem altas.

Fig. 1.2 - a) Representação geral de glicero-fosfolipídios com duas cadeias hidrocarbônicas. O grupo X, ligado ao grupo fosfato, pode ser uma colina, etanolamina, serina, glicerol, inositol ou um hidrogênio. As cadeias hidrocarbônicas podem ter diversos comprimentos e quantidade de duplas ligações (HC=CH). b) Cadeia hidrocarbônica nas configurações *all-trans*, esperada em lipídios na fase gel; com duas dobras *gauche* (+ e -), que ocorrem com frequência na fase fluida; e com uma ligação *cis*, o tipo mais comum de insaturação em lipídios naturais. A barreira de energia entre uma ligação *trans* e uma *gauche* é de 3,5 kcal/mol.

O caráter negativo das membranas, gerado pela presença de lipídios negativos e por proteínas de membrana com carga total negativa, é essencial em vários processos, pois facilita a aproximação de proteínas globulares, peptídeos, hormônios e íons positivamente carregados. Após a aproximação, a bidimensionalidade da membrana, facilita o encontro das moléculas com seus respectivos receptores.

Outro aspecto fundamental da membrana é sua fluidez, que permite uma alta difusão lateral dos lipídios e proteínas. As células regulam suas membranas de forma que, nas condições de temperatura, pressão, pH e força iônica presentes, elas apresentem uma fluidez apropriada a seu funcionamento. O colesterol é certamente um regulador importante da fluidez da membrana, já que sua forma rígida empacota a membrana como um todo, mas desestabiliza uma possível fase gel, como visto em estudos com membranas modelo. Entretanto, podem existir domínios mais rígidos em membranas biológicas, sendo até relevantes em processos específicos.

Muitos estudos de processos bioquímicos são feitos em sistemas modelo, visto a complexidade de membranas biológicas. O modelo mais simples da membrana biológica é uma bicamada lipídica formando uma vesícula. A partir desse modelo é possível o estudo de interação ligante/lipídio, permeabilidade, fluidez, elasticidade de bicamadas e etc... Mais especificamente, o estudo de vesículas lipídicas negativamente carregadas é de suma importância, já que a atração

eletrostática entre a membrana negativa e ligantes positivos é vastamente utilizada biologicamente para facilitar a comunicação da célula com o exterior.

Propriedades gerais de lipídios e vesículas

Lipídios são moléculas anfifílicas, ou seja, moléculas que possuem uma região polar e uma apolar, esta última formada por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas. O estudo de sistemas anfifílicos em geral, é também muito interessante do ponto de vista físico-químico, independente de sua relevância biológica. Como será mostrado neste item, as moléculas anfifílicas possuem propriedades muito interessantes, principalmente em meio aquoso. Além disso, diferentes modelos teóricos têm sido aplicados a sistemas anfifílicos. Esses sistemas formam, então, um campo de pesquisa inter-disciplinar muito rico e interessante.

Em meio aquoso, o balanço das contribuições energéticas e entrópicas da interação entre moléculas apolares e de água; da formação de pontes de hidrogênio entre moléculas de água; e de interações de Van der Waals, faz com que as regiões apolares se “escondam” da água, deixando somente a parte hidrofílica exposta. Esse fenômeno é chamado de efeito hidrofóbico, que é ainda muito discutido na literatura (Israelachvili, 1992; Guisoni & Henriques, 2000). A biologia, ou melhor dizendo, a vida, aproveitou esse efeito e muito, tanto na formação de bicamadas lipídicas quanto no tão estudado e discutido processo de *protein folding*.

Em meio aquoso, então, moléculas anfifílicas se agregam de forma a minimizar o contato da região hidrofóbica com as moléculas de água. Dependendo basicamente da forma geométrica do anfifílico, diferentes estruturas serão formadas, como ilustrado esquematicamente na Fig. I.3. Lipídios com duas cadeias formam, em geral, bicamadas (Fig. I.3c), como a encontrada em membranas biológicas, enquanto que detergentes, que possuem somente uma cadeia, tendem a formar micelas (esquematizadas na Fig. I.3a), que proporcionam um alto raio de curvatura. Alguns fosfolipídios de relevância biológica, como a fosfatidiletanolamina (PE) tendem a formar fases hexagonais reversas (Fig. I.3b) em certas condições de temperatura e concentração, devido à sua cabeça polar pequena. É bem provável que a presença desses lipídios seja relevante em processos biológicos de fusão de membranas (o volume 81(2) de 1996 da revista *Chemistry and Physics of Lipids* é inteiro devotado a lipídios não formadores de bicamadas e suas possíveis funções biológicas).

As estruturas formadas por moléculas anfifílicas dependem fortemente da quantidade relativa de água e da temperatura. É muito comum nesses sistemas transições de fase liotrópicas (obtidas por variação na concentração de anfifílicos) e termotrópicas (obtidas por variação de temperatura).

Fig. I.3 - Representação esquemática das possíveis estruturas formadas por lipídios e detergentes. a) micela e fase hexagonal (H_I). b) micela reversa, formada em presença de solvente orgânico no meio externo e de água no interior das micelas, e fase hexagonal reversa (H_{II}). c) bicamada, que pode formar a fase lamelar (L_a), vesícula multilamelar (MLV) e vesícula unilamelar.

Geralmente, lipídios neutros e *zwitteriônicos* tendem a formar uma fase lamelar, na qual se formam bicamadas adjacentes com uma camada aquosa entre elas. As bicamadas podem estar na fase fluida (L_α) ou na fase gel (L_β), como será discutido no item seguinte. Em muitos casos, a fase lamelar existe na forma $L_\alpha + H_2O$, com a presença de vesículas multilamelares (MLV) em coexistência com o meio aquoso. É comum encontrar a fase lamelar pura em concentrações lipídicas muito altas e vesículas multilamelares em concentrações mais baixas. Lipídios carregados tendem a formar unilamelas ou multilamelas com uma distância grande de repetição para minimizar a repulsão eletrostática entre lamelas adjacentes.

As membranas biológicas são, no entanto, compostas por uma lamela somente. Existem métodos de formação de vesículas unilamelares que mimetizam melhor a membrana natural. Essas vesículas unilamelares foram caracterizadas de acordo com seu tamanho como: pequenas (SUV's), da ordem de 200 Å; grandes (LUV's), entre 1000 e 5000 Å; e gigantes (GUV's), da ordem de microns. As SUV's tem um alto raio de curvatura comparado a membranas biológicas, com alguns problemas de empacotamento. Em geral, é preferível utilizar LUV's e GUV's em estudos de relevância biológica, devido ao baixo raio de curvatura destas. As GUV's oferecem certas vantagens, por terem tamanhos similares ao de células e por poderem ser visualizadas por um microscópio ótico. Entretanto, mesmo as vesículas multilamelares (MLV) apresentam várias características similares às unilamelares, sendo portanto também muito utilizadas em estudos bioquímicos.

As propriedades elásticas e mecânicas de vesículas lipídicas têm sido também muito estudadas desde o trabalho pioneiro de Helfrich, 1974 e Evans, 1974. Esse campo de estudo, desenvolvido principalmente pela observação ótica de vesículas gigantes unilamelares (GUV's) e da aplicação de modelos físicos, revelou propriedades muito importantes de bicamadas lipídicas (Winterhalter & Helfrich, 1988; Mitchell & Ninham, 1989; Lipowski, 1991, Käs & Sackmann, 1991, Farge & Devaux, 1992, Sackmann, 1994, Döbereiner et al., 1995 e 1997; Seifert, 1997, Méléard et al., 1997). Na fase fluida, a bicamada lipídica apresenta uma grande flexibilidade, apresentando grandes flutuações de forma. Entretanto, ela oferece uma alta resistência à compressão lateral. Essas características da membrana lipídica parecem ser de grande importância para as membranas biológicas.

Vesículas lipídicas podem ser usadas para administração de drogas no organismo. Devido ao processo de fusão, essas vesículas podem liberar as drogas no interior das células. Tem-se buscado uma especificidade de ação destas, a partir da composição da bicamada da vesícula transportadora, de forma que ela libere seu conteúdo somente em membranas de alguma forma compatíveis com ela. Esse é um campo que tem crescido bastante ultimamente (Rosoff, 1996), e o estudo de sistemas lipídicos modelo pode ser bastante útil no desenvolvimento desta tecnologia.

Mais especificamente, complexos de DNA com lipídios catiônicos têm-se mostrado um sistema promissor em terapias gênicas.

Transição de fase principal

Bicamadas lipídicas puras (formadas por somente um lipídio) apresentam uma transição de fase, chamada de principal, na qual as cadeias hidrocarbônicas passam de um alto empacotamento (fase gel) para uma membrana fluida (fase líquido - cristalina) em uma temperatura chamada T_m . Essa transição é considerada de primeira ordem, por gerar um pico bem pronunciado de calor específico e por apresentar mudanças bruscas em parâmetros que monitoram a microviscosidade da bicamada (Cevc & Marsh, 1987; Blume, 1991).

Na fase gel, praticamente todas as cadeias estão na configuração *all-trans*, que é a configuração de menor energia, na qual as cadeias estão estendidas ao máximo (Fig. I.2b). Devido à interação de Van der Waals as cadeias ficam muito próximas, ocupando uma pequena área. A área ocupada por duas cadeias saturadas (2Σ) é de cerca de $38 \text{ \AA}^2$. Os lipídios formam uma rede hexagonal bidimensional quase-cristalina. A área ocupada pela cabeça polar (S) depende do lipídio em questão. Em casos de grupos polares muito grandes haverá uma incompatibilidade entre a área das cadeias e a área da cabeça, como por exemplo em bicamadas de fosfatidilcolina (PC), onde a área por cabeça polar na fase gel é de cerca de $50 \text{ \AA}^2$ ($S > 2\Sigma$). Nesses casos, em geral, as cadeias se inclinam com relação à superfície da bicamada para que possam ficar mais próximas ($L_{\beta'}$, Fig. I.4). Já o grupo fosfatidiletanolamina (PE) tem uma cabeça polar bem menor, com $39 \text{ \AA}^2$ de área ($S \sim 2\Sigma$) e não é observada inclinação das cadeias (L_{β} , Fig. I.4). Na fase fluida, em geral, não ocorre essa incompatibilidade, já que a área das cadeias cresce para cerca de $50 \text{ \AA}^2$ devido à presença de dobras *gauche* nas cadeias hidrocarbônicas. Alguns lipídios na fase gel apresentam interdigitação das cadeias ($L_{\beta L}$, Fig. I. 4).

Alguns lipídios com cabeças polares grandes, como o PC, apresentam uma pré-transição a uma temperatura chamada T_p , na qual as cadeias continuam na fase gel, mas a superfície da membrana apresenta ondulações, chamada de fase *ripple* ($P_{\beta'}$ na Fig. I.4). Quando incubados em baixas temperaturas por algum tempo muitos lipídios formam uma fase cristalina.

Fig. I.4 - Representação dos diferentes arranjos da fase gel lipídica. L_{β} : fase gel de lipídios cuja área por cabeça polar (S) é compatível à ocupada pelas cadeias ($S \sim 2\Sigma$). $L_{\beta'}$: fase gel com inclinação das cadeias hidrocarbônicas com relação ao plano da bicamada ($S > 2\Sigma$). $L_{\beta I}$: fase gel interdigitada (na figura estão mostrados lipídios com duas cadeias de tamanhos bem distintos, embora esta não seja uma condição necessária para haver interdigitação das monocamadas). $P_{\beta'}$: fase *ripple* que aparece entre as fases $L_{\beta'}$ e L_{α} em lipídios com a cabeça polar grande. As cadeias permanecem na fase gel mas a superfície da membrana apresenta uma ondulação.

Acima de uma temperatura crítica, chamada de temperatura de transição de fase principal T_m (gel - cristal-líquido), as cadeias hidrocarbônicas apresentam algumas dobras *gauche*, como mostrado na Fig. I.2b. A presença dessas dobras na fase fluida diminui a espessura da membrana em $\sim 20\%$ e aumenta a área por lipídio em $\sim 25\%$, diminuindo drasticamente o empacotamento da bicamada, e portanto aumentando a liberdade de movimento de cada cadeia e a difusão lateral dos lipídios. A transição principal, no entanto, não leva as parafinas a um estado líquido, pois a ordem bidimensional continua existindo, e a estrutura básica da bicamada não é perdida. A Fig. I.5 mostra esquematicamente lipídios nas fases gel ($T < T_m$) e fluida ($T > T_m$).

A temperatura de transição de fase principal T_m depende tanto das interações entre as cadeias, quanto entre as cabeças polares. O valor de T_m aumenta muito com o número de carbonos da cadeia. Por exemplo, enquanto o DMPC, com 14 carbonos apresenta $T_m = 23^\circ\text{C}$, o DPPC, com dois carbonos a mais por cadeia, apresenta $T_m = 41^\circ\text{C}$. A presença de duplas ligações *cis* alteram drasticamente T_m , dependendo de sua posição, podendo diminuir até 20°C se localizada no centro da cadeia, ou aumentar 40°C se localizada nas extremidades. O tamanho das cabeças polares e a interação entre elas é também muito importante. Ainda comparando com o DMPC, que tem uma cabeça polar grande, o DMPE, que possui o mesmo número de carbonos e uma cabeça polar bem menor e com grande habilidade de formar pontes de hidrogênio na fase gel, devido à interação eletrostática entre cabeças polares adjacentes, apresenta $T_m = 49,5^\circ\text{C}$. Em lipídios carregados, condições externas como pH e concentração de íons mono e divalentes, são cruciais, já que terão influência direta na interação eletrostática entre cabeças polares vizinhas. O fosfolipídio negativo

DMPG, por exemplo, apresenta $T_m = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ em condição fisiológica e $T_m = 41\text{ }^{\circ}\text{C}$ em $\text{pH} = 1$ (Watts et al., 1978).

Fig. 1.5 - Representação das fases gel inclinada (esquerda) e fluida (direita) de bicamadas lipídicas de PC. Os lipídios estão representados no modelo *space filling*. A região em verde mostra a espessura da região hidrofóbica da bicamada. Fig. 11-17 em Voet & Voet, 1995.

Bicamadas lipídicas compostas de misturas de lipídios logo perdem a cooperatividade da transição de fase assim que um número pequeno de componentes coexistem, dada as grandes diferenças em T_m dos diferentes lipídios. Portanto, é de se esperar que membranas biológicas, compostas por vários lipídios distintos, e ainda proteínas, não apresentem uma transição de fase a uma temperatura definida.

DMPG

O comportamento térmico e outras características de lipídios *zwitteriônicos*, tais como o PC e PE, tem sido vastamente estudados. Os lipídios carregados, embora muito utilizados em estudos de interesse biológico, receberam um pouco menos de atenção, provavelmente devido à grande dependência de suas propriedades com as condições externas.

O dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) é um fosfolípido negativamente carregado com duas cadeias saturadas de 14 carbonos cada e com um grupo glicerol ligado ao grupo fosfato na cabeça polar (Fig. III.1). Lipídios com o PG na cabeça polar são encontrados apenas em membranas de procariontes, tais como a bactéria *E. Coli*. Mesmo assim, DMPG e DPPG têm sido muito utilizados como membranas modelo em estudos de interação peptídeo/lípido, pois, em pH neutro, possuem uma carga negativa proveniente do grupo fosfato (Heimburg & Biltonen, 1994; Biaggi et al., 1997; Turchiello et al., 2000; Fernandez & Lamy-Freund, 2000). Em condições

fisiológicas (pH neutro e força iônica da ordem de 100 mM), foi observado que o fosfolípido DMPC possui um comportamento térmico muito parecido com o de DMPC, ambos com uma temperatura de transição principal T_m em torno de 23 °C e de pré-transição T_p em torno de 13 °C. O aumento da força iônica ou a diminuição do pH, no entanto, diminuem consideravelmente a repulsão eletrostática entre cabeças polares vizinhas de PG, o que permite uma maior estabilidade da fase gel, fazendo com que T_m aumente. A adição de NaCl pode levar a T_m até 29 °C em 2 M NaCl (Cecv et al., 1980), enquanto que a diminuição do pH, que neutraliza completamente os grupos fosfato, aumenta T_m até 41 °C em pH = 1. Esse maior valor de T_m em pH baixo, em comparação ao obtido com a adição de NaCl, provavelmente reflete diferenças nas afinidades desses dois íons pelo grupo fosfato do DMPC, além de um menor tamanho da cabeça polar do PG, quando neutralizada pelo próton. Fica clara aqui a dependência da T_m de lipídios carregados a condições externas. Entretanto, muitos trabalhos na literatura assumem $T_m = 23$ °C para o DMPC, sem o cuidado de definir as condições externas, cruciais para o valor de T_m .

A motivação do presente trabalho surgiu da necessidade de entender o comportamento do DMPC, primeiramente por ser esse um lipídio muito utilizado pelo grupo em estudos de interação peptídeo/lipídio. Além disso, outros trabalhos na literatura mostravam as interessantes propriedades físico-químicas do DMPC (Epand & Hui, 1986; Gershfeld, 1986; Salonen et al., 1989; Epand et al., 1992; Kodama et al., 1993; Heimburg & Biltonen, 1994 e Zhang et al., 1997). Em baixa força iônica, vimos que o DMPC era transparente à temperatura ambiente e turvo a altas e baixas temperaturas, como mostrado no trabalho de Heimburg & Biltonen, 1994. Medindo o espalhamento de luz em função da temperatura observamos duas mudanças bruscas na turbidez da amostra, em temperaturas que chamávamos de T_m (~ 19 °C) e T_{post} (~ 35 °C), conforme proposto por Salonen et al., 1989. A adição de sal fazia esse intervalo de temperatura durante o qual a amostra era transparente reduzir consideravelmente, até em 100 mM NaCl desaparecer completamente. De fato, nessa condição esperava-se um comportamento do DMPC semelhante ao do DMPC.

Durante o mestrado fizemos medidas de espalhamento de luz a vários ângulos e de condutividade elétrica, em função da temperatura, que indicaram uma maior interação eletrostática entre os agregados de DMPC na região transparente, e portanto foi proposto que o grau de ionização dos lipídios aumentava consideravelmente em T_m . Espectros de EPR (ressonância paramagnética eletrônica) de marcadores de spin localizados no interior da bicamada indicaram uma grande diminuição da microviscosidade do interior da bicamada em T_m e nenhuma mudança relevante em T_{post} (Riske et al., 1997).

No presente trabalho de doutorado continuamos investigando o comportamento térmico do DMPC, em função basicamente da força iônica, mas também do pH, concentração lipídica e

presença de peptídeos. Primeiramente, tornou-se evidente que, em baixa força iônica, a transição de fase gel - cristal-líquido, que parecia ocorrer em T_m , ocorre na extensa faixa de temperatura caracterizada pelo baixo espalhamento de luz (entre T_m e T_{post}), e as temperaturas de transição foram renomeadas para $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$, que marcam o início e o final da transição de fase, respectivamente. Utilizamos diferentes técnicas e métodos para o estudo do DMPG, tais como DSC (calorimetria diferencial de varredura), anisotropia de fluorescência, EPR, SAXS (espalhamento de raio-X de baixo ângulo) e microscopia ótica.

Alguns estudos sobre o DMPG têm sido desenvolvidos por outros grupos, que propõem a formação de uma rede tri-dimensional lipídica na região de transição (Heimburg & Biltonen, 1994; Schneider et al., 1999 e Koshinuma et al., 1999), o que explicaria a alta viscosidade da amostra nessa região. Entretanto, experimentos com um marcador de spin, que serão aqui mostrados, indicam que o processo de fusão de vesículas, necessário para a formação de uma rede, não ocorre mesmo quando $T_{m^{on}}$ ou $T_{m^{off}}$ são cruzadas. A região de transição, também chamada de fase intermediária do DMPG, ainda não está completamente entendida, embora o presente trabalho acrescente muito à literatura e ao que sabíamos após o mestrado. Entretanto, alguns pontos ficaram em aberto e serão mostrados aqui em forma de resultados preliminares.

Durante o trabalho de doutorado, descobrimos que dispersões muito diluídas de DMPG em baixa força iônica, apresentam um comportamento térmico bem diferente do conhecido até então. Nesse regime diluído, o DMPG apresenta uma única T_m e com um valor que cresce com a diluição, chegando a 41 °C. Esse comportamento do DMPG não tinha sido relatado anteriormente na literatura. As causas para tal comportamento ainda não puderam ser totalmente elucidadas.

II. TÉCNICAS

II.1 - Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

(Bales, 1989; Marsh, 1981 e 1989; Knowles et al., 1976; Swartz et al., 1972 e Atherton, 1993)

Algumas substâncias na natureza, como alguns metais e radicais livres, possuem elétrons desemparelhados, resultando em um momento de dipolo magnético eletrônico total não nulo. Em presença de um campo magnético externo ocorre a quantização dos níveis de energia correspondentes aos diferentes valores do momento angular dos elétrons (spin). O eixo de quantização é dado pela direção do campo magnético externo aplicado, e é possível induzir transições entre esses níveis de energia utilizando radiação eletromagnética de energia correspondente à diferença de energia entre eles. A técnica de EPR consiste no estudo dessas transições. A forma de linha do espectro, primeira derivada da absorção em função do campo magnético estático, relaciona-se com propriedades do meio no qual a molécula paramagnética situa-se, tais como polaridade, viscosidade e anisotropia.

A técnica de EPR utiliza uma frequência de radiação eletromagnética fixa e varia o campo magnético externo para que a condição de ressonância seja satisfeita. A frequência mais utilizada é da ordem de 9 GHz (Banda-X), embora outras bandas sejam utilizadas também, como Banda-Q (35 GHz) e Banda-L (1,3 GHz).

Em sistemas biológicos, encontramos moléculas paramagnéticas somente em metaloproteínas e radicais livres, que em geral não são estáveis. É comum, entretanto, inserir moléculas paramagnéticas (chamadas de marcadores de spin) no sistema a ser estudado. Os marcadores de spin mais utilizados são moléculas relativamente estáveis que contêm o radical nitróxido (mostrado na Fig. II.2), com o elétron desemparelhado principalmente localizado no orbital $p\pi$ do nitrogênio. Esses marcadores podem, por exemplo, ser ligados a uma cadeia hidrocarbônica de uma molécula anfifílica, inserindo-se, portanto, no interior de bicamadas lipídicas.

Aspectos gerais

É possível escrever a Hamiltoniana de spin de um elétron desemparelhado de maneira simplificada, na qual está contida somente a interação Zeeman (1º termo) e a hiperfina (2º termo):

$$\mathcal{H} = \beta \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{S} \quad (\text{II.1})$$

onde β é o magneton de Bohr, H é o campo magnético estático aplicado, S e I são os operadores momento angular de spin do elétron desemparelhado e do núcleo, respectivamente, e g e A são tensores de 2ª ordem, relacionados à interação Zeeman com o campo magnético externo, e hiperfina com o campo magnético local devido à presença do núcleo, respectivamente. Os eixos moleculares do nitróxido (Fig. II.2) geralmente coincidem com os eixos principais dos tensores g e A , de forma que a anisotropia da molécula está toda contida nesses tensores.

O termo de interação Zeeman (interação spin-órbita) está relacionado à quantização do spin do elétron na presença do campo magnético externo aplicado. O elétron desemparelhado do grupo nitróxido possui $S = 1/2$, caracterizando um sistema de dois níveis. O segundo termo da Hamiltoniana de spin, o termo de interação hiperfina, aparece devido à existência de interação entre o spin nuclear (I) e o spin eletrônico (S). No caso do nitróxido, como o elétron desemparelhado encontra-se principalmente localizado próximo ao nitrogênio ($I = 1$), cada nível de energia será desdobrado em três, e serão observadas três transições ($\Delta m_S = \pm 1$ e $\Delta m_I = 0$), caracterizadas pela mesma frequência de microonda ($h\nu = g\beta H + Am_I$, onde m_I são os auto-valores de I), mas para valores distintos do campo magnético externo, como mostra a Fig. II.1. A separação entre as linhas de absorção está relacionada ao tensor desdobramento hiperfino A .

Fig. II.1 - Representação dos níveis de energia de spin ($m_S = \pm 1/2$) em função da magnitude do campo magnético H . Os níveis estão desdobrados pela interação do spin com o spin nuclear $I = 1$ ($m_I = 0, \pm 1$), dada pelo desdobramento hiperfino A . A diferença de energia entre os níveis de energia do spin é dada por $h\nu$.

A Fig. II.2 mostra como a anisotropia do grupo nitróxido é observada nos espectros de EPR, quando ele se encontra como impureza em um cristal (a-c), e quando está em solução (d-e).

Fig. II.2 - Esquema do radical nitróxido e seus espectros de EPR em diferentes condições: como impureza em um cristal diamagnético com H_0 paralelo ao eixo-x (a), eixo-y (b) e eixo-z (c); em solução congelada (d) e em solução de baixa viscosidade (e). (Fig. 3 em Marsh, 1981).

O fato do elétron desemparelhado encontrar-se principalmente localizado no orbital $p\pi$ do nitrogênio (eixo-z), faz com que o sistema tenha uma anisotropia descrita aproximadamente por uma simetria axial. Obtendo espectros com o campo magnético externo alinhado paralelo a cada um dos eixos moleculares (Fig. II.2 a-c), fica evidente a grande assimetria entre os eixos z ($\parallel$), e x e y ($\perp$). Abaixo estão tabelados os valores principais dos tensores g e A calculados para o marcador doxil, que representam a simetria quase axial do radical nitróxido:

Tabela II.1

$A_{xx} = 5,9 \text{ G}$	$g_{xx} = 2,0088$
$A_{yy} = 5,4 \text{ G}$	$g_{yy} = 2,0058$
$A_{zz} = 32,9 \text{ G}$	$g_{zz} = 2,0022$

Vemos que $(A_{xx} \approx A_{yy}) = A_{\perp}$, e $A_{zz} = A_{//}$, da mesma forma $(g_{xx} \approx g_{yy}) = g_{\perp}$, e $g_{zz} = g_{//}$.

Ainda na Fig. II.2, vemos espectros de um radical nitróxido em solução para dois casos extremos: movimento muito lento (d) e movimento muito rápido (e). No primeiro caso, chamado de espectro de pó, o espectro observado é a soma dos espectros do radical nitróxido alinhado em todas as direções possíveis, pois como o movimento é lento para a escala de EPR, todas as direções são somadas. Já no caso de movimento rápido, todas as orientações são promediadas e o espectro resultante é caracterizado pela média das orientações, ou seja, obtemos um fator-g e um desdobramento hiperfino isotrópicos dados pelas médias dos valores mostrados na Tabela II.1: $g_o = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3$, e $a_o = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$.

Fica claro, então, que a forma do espectro de EPR dos radicais nitróxidos é extremamente dependente da orientação com o campo magnético externo e com sua mobilidade no meio. Na Fig. II.3 estão mostrados espectros de um marcador em soluções de diferentes viscosidades η . Como o movimento desse marcador é isotrópico, a viscosidade do meio está diretamente relacionada ao tempo de correlação rotacional τ da molécula.

Fig. II.3 - Espectros de EPR de Tempol em soluções de viscosidades crescentes de A a F. Os tempos de correlação foram calculados da equação de Stokes-Einstein ($\tau = 4\pi\eta r^3/3kT$). (Fig. 11.2 em Smith, 1972).

Portanto, para cada tempo de correlação rotacional, caracterizado pela velocidade com a qual a molécula se reorienta, temos uma composição diferente das anisotropias dos tensores g e A . É possível separar os tempos de correlação em quatro regiões distintas de mobilidade, de acordo com os tipos de informações que são possíveis obter dos espectros de EPR ($\nu \approx 9$ GHz, Banda-X):

$\tau < 10^{-11}$ s - Nessa região todas as anisotropias do sistema são promediadas, o espectro aparece com três linhas de igual intensidade, e só é possível obter os valores médios dos tensores g e A , ou seja, g_0 e a_0 (Fig. II.2e).

10^{-11} s $< \tau < 3 \times 10^{-9}$ s - Nesse intervalo de mobilidade ocorre um alargamento diferencial das três linhas (*motional narrowing*), a partir dos quais é possível calcular o tempo de correlação (τ) do movimento. O desenvolvimento teórico da forma e largura de linha, e de como τ pode ser calculado a partir dos espectros de EPR serão discutidos nas próximas seções. Espectros nessa região de mobilidade estão mostrados na Fig. II.3a e b.

3×10^{-9} s $< \tau < 10^{-7}$ s - Nessa região, além das linhas se alargarem à medida que o movimento diminui, a posição dos picos é também alterada (Fig. II.3c-f), e é necessário um tratamento teórico muito mais sofisticado, como o desenvolvido por J. H. Freed (Mingtao Ge & Freed, 1999).

$\tau > 10^{-7}$ s - Nessa escala de tempo, as moléculas paramagnéticas estão imóveis para o EPR. Portanto, os espectros resultantes contêm todas as orientações com relação ao campo somadas (espectro de pó, como visto na Fig. II.2d), e só é possível obter diretamente dos espectros o desdobramento hiperfino máximo (A_{zz}).

Forma e largura de linha de espectros de EPR

Para entender como o movimento da molécula paramagnética altera o espectro de EPR, é preciso entender o processo de relaxação dos spins para o estado de equilíbrio térmico. Vamos tratar o problema principalmente de forma clássica, embora seja possível tratá-lo quanticamente através do formalismo da matriz densidade. Se um campo externo B_0 é aplicado definindo o eixo-z, então haverá uma magnetização líquida M_0 nessa direção, dada pela soma das componentes dos momentos angulares $\bar{\mu}_i$ no eixo-z. No plano-xy não haverá magnetização líquida, pois não existe coerência das fases dos diferentes spins. Entretanto, se um campo externo oscilante (onda eletromagnética) é aplicado na direção do plano-xy, as componentes dos spins nesse plano passarão a ser coerentes. Quando esse campo oscilante é desligado, o sistema vai relaxar para o estado de magnetização M_0 no eixo-z (o campo estático B_0 continua ligado) e magnetização nula nos eixos x e y. Esses dois processos podem ser caracterizados por decaimentos exponenciais, embora não necessariamente com os mesmos tempos característicos. A relaxação do sistema para a

magnetização do eixo-z (M_0) é chamada de relaxação longitudinal, ou spin-rede, com tempo característico T_1 . Já a perda de coerência entre as fases dos spins no plano-xy é chamada de relaxação transversal ou spin-spin, com tempo característico T_2 .

As equações de movimento de Bloch para as componentes da magnetização incorporam essas observações fenomenológicas apresentadas acima às equações de movimento do momento angular $\vec{J}$ em função do torque $\vec{\mu} \times \vec{B}$ (significando que o momento angular gira em torno do campo magnético aplicado com uma frequência característica, chamada de frequência de Larmor). É necessário lembrar que $\vec{\mu} = -\gamma \vec{J}$, onde γ é o fator giromagnético; e que a magnetização total do sistema é dada pela soma dos momentos de dipolo induzidos ($\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i$). As equações de Bloch são:

$$\begin{aligned}\frac{dM_z}{dt} &= \gamma(\vec{B} \times \vec{M})_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \\ \frac{dM_x}{dt} &= \gamma(\vec{B} \times \vec{M})_x - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma(\vec{B} \times \vec{M})_y - \frac{M_y}{T_2}\end{aligned}\quad (II.2)$$

As equações de Bloch foram escritas para descrever o comportamento da magnetização causada pelos spins nucleares, mas tem a mesma validade quando tratamos os spins eletrônicos, sendo a única diferença que no lugar do fator giromagnético γ deve-se usar $g\beta$. Vamos entretanto manter a notação de γ por enquanto. O campo magnético total $\vec{B}$ na Eq. II.2 é dado por:

$$\vec{B} = B_0 \hat{k} + B_1 (\cos \omega t \hat{i} + \sin \omega t \hat{j}) \quad (II.3)$$

$\vec{B}_0$ é o campo estático na direção z e $\vec{B}_1$ é o campo oscilante com frequência ω no plano-xy. Em ressonância magnética nuclear ω é da ordem de centenas de Hz (ondas de rádio) enquanto que na ressonância paramagnética eletrônica $\omega \sim \text{GHz}$ (microonda).

Como o campo magnético tem uma componente oscilante, o problema é melhor descrito em um referencial girante, que acompanha a rotação no plano-xy. Podemos definir duas novas coordenadas u e v como:

$$\begin{aligned}u &= M_x \cos \omega t + M_y \sin \omega t \\ v &= M_x \sin \omega t - M_y \cos \omega t\end{aligned}\quad (II.4)$$

Comparando a Eq. II.4 com a II.3 fica claro que u está em fase com B_1 , enquanto v está $\pi/2$ fora de fase com o mesmo. As equações de Bloch no referencial girante ficam:

$$\begin{aligned}
\frac{dM_z}{dt} &= -\gamma B_1 v + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \\
\frac{du}{dt} &= \gamma B_0 v - v\omega - \frac{u}{T_2} \\
\frac{dv}{dt} &= -\gamma B_0 u + u\omega + \gamma M_z B_1 - \frac{v}{T_2}
\end{aligned} \tag{II.5}$$

Resolvendo a Eq. II.5 para a condição estacionária (onda contínua) onde $\omega \sim \omega_0$, e $dM_i/dt = 0$ ($i = x, y, z$), lembrando que a frequência de Larmor $\omega_0 = \gamma B_0$, temos:

$$\begin{aligned}
M_z &= \left((1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2 \right) \frac{\bar{M}}{\gamma B_1} \\
u &= (\omega_0 - \omega) \bar{M} \\
v &= \frac{1}{T_2} \bar{M}
\end{aligned} \tag{II.6}$$

onde

$$\bar{M} = \frac{\gamma B_1 M_0}{\gamma^2 B_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \tag{II.7}$$

Voltando para o referencial do laboratório é possível escrever as componentes x e y da magnetização como:

$$\begin{aligned}
M_x &= \bar{M} \left\{ (\omega_0 - \omega) \cos \omega t + \frac{1}{T_2} \sin \omega t \right\} \\
M_y &= \bar{M} \left\{ (\omega_0 - \omega) \sin \omega t - \frac{1}{T_2} \cos \omega t \right\}
\end{aligned} \tag{II.8}$$

As componentes da magnetização são máximas quando $\omega = \omega_0$.

Como o campo B_1 aplicado em um experimento real pode ter a direção x , podemos escrevê-lo como $2B_1 \cos \omega t \hat{x}$. Esse campo pode ser escrito como a parte real do campo complexo $B_C = 2B_1 e^{i\omega t}$. Dessa forma, as componentes u e v (Eq. II.4) são proporcionais às susceptibilidades real e complexa, χ' e χ'' , respectivamente, pois $\chi = \chi' + i\chi''$ e $M_C = \chi B_C$. Logo, $u = 2\chi' B_1$ e $v = 2\chi'' B_1$. Comparando o fenômeno da susceptibilidade magnética a problemas de circuitos elétricos, vemos que χ' , ou u , está ligado à dispersão do sistema, enquanto χ'' , ou v , está ligado à sua absorção. A forma da linha $f(\omega)$ deve então ser proporcional à absorção χ'' (v nas Eq. II.6 e II.7):

$$f(\omega) = A \frac{\gamma M_0 (1/T_2)}{\gamma^2 B_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \tag{II.9}$$

onde A é uma constante de proporcionalidade. Essa função é máxima para $\omega = \omega_0$ e decresce para B_1 e T_1 grandes (saturação). B_1^2 é proporcional à potência da radiação aplicada, que pode ser mantida pequena. Dessa forma, o primeiro termo no denominador da Eq. II.9 pode ser desprezado frente a $(1/T_2)^2$. A forma da linha de ressonância em EPR fica:

$$f(\omega) \approx A \frac{g\beta M_o(1/T_2)}{(1/T_2)^2 + (\omega_o - \omega)^2} \quad (\text{II.10})$$

onde o fator giromagnético γ foi agora substituído por $g\beta$ para transições de spin eletrônicos. A Eq. II.10 é uma Lorentziana com largura $1/T_2$. É importante ressaltar que em EPR detecta-se a primeira derivada da Eq. II.10.

Vamos agora passar ao estudo dos motivos para que haja alargamento das linhas, ou seja, do que depende T_2 . Todo o desenvolvimento feito até aqui partiu das equações clássicas de Bloch, entretanto, é possível também obter a Eq. II.10 a partir de um formalismo quântico utilizando a matriz densidade e a teoria de Redfield (Atherton, 1993). Desse formalismo, obtém-se uma expressão para $1/T_2$, a partir do cálculo de uma função de correlação temporal do campo oscilante aplicado:

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{g\beta}{\hbar} \right)^2 \left\{ \overline{B_z^2} \tau_C + \frac{\tau_C}{2} \frac{\overline{B_x^2} + \overline{B_y^2}}{1 + \omega_o^2 \tau_C^2} \right\} \quad (\text{II.11})$$

onde τ_C é o tempo de correlação característico da molécula paramagnética. É importante ressaltar que essa expressão vale para uma certa região de mobilidade da molécula, chamada de *motional narrowing*, com τ_C menor ou da ordem de 10^{-9} s. O primeiro termo, chamado de secular, indica flutuações na componente z do campo aplicado, que não induzem transições entre níveis de energia dos spins. O segundo termo, não-secular, está ligado a flutuações no plano-xy que podem induzir transições, e portanto depende de T_1 . Em líquidos $T_2 \ll T_1$, e, portanto, o termo não-secular pode ser desprezado em comparação com o secular. Flutuações em B_z estão associadas a flutuações na frequência de ressonância, que é dada quanticamente por $\omega = g\beta B_z / \hbar$ (efeito Zeemann). A Eq. II.11 pode ser, então, reescrita como:

$$\frac{1}{T_2} \approx \overline{\Delta\omega^2} \tau_C \quad (\text{II.12})$$

Portanto, qualquer processo dinâmico que altere a frequência de ressonância irá causar alargamento da linha de absorção. Devido às anisotropias dos tensores g e A (Fig. II.2 e Tabela II.1), a frequência de absorção, e portanto a largura de linha, será sensível à difusão rotacional das moléculas paramagnéticas. Com movimento rápido comparado a ω as anisotropias dos tensores g e A serão promediadas, enquanto que em movimentos mais lentos não, como ilustrado na Fig. II.3.

De acordo com a Eq. II.1 a frequência de ressonância é dada por:

$$\omega = g \frac{\beta B_o}{\hbar} + a \frac{m_I}{\hbar} \quad (\text{II.13})$$

onde m_I são os autovalores do operador de spin nuclear I . O fator- g e o desdobramento hiperfino a variam, portanto $\overline{\Delta\omega^2}$ é:

$$\overline{\Delta\omega^2} = \overline{\Delta g^2} \left(\frac{\beta B_0}{\hbar} \right)^2 + 2\overline{\Delta g \Delta a} \frac{\beta B_0}{\hbar^2} m_I + \overline{\Delta a^2} \frac{1}{\hbar^2} m_I^2 \quad (\text{II.14})$$

Usando a Eq. II.14, podemos reescrever a Eq. II.12:

$$\frac{1}{T_2} = A + B m_I + C m_I^2 \quad (\text{II.15})$$

onde A, B, C dependem dos valores médios das anisotropias dos tensores g e A . Fica claro, então, que o alargamento é diferencial para cada linha correspondente a m_I . No caso do nitróxido $m_I = +1, 0, -1$, como visto na Fig. II.2. Os valores médios da Eq. II.14 podem ser escritos em termos dos produtos internos dos tensores g e A :

$$\begin{aligned} A &= \frac{2}{15} \left(\frac{\beta B_0}{\hbar} \right)^2 (g^\circ : g^\circ) \tau_C \\ B &= \frac{4}{15} \frac{\beta B_0}{\hbar} (g^\circ : A^\circ) \tau_C \\ C &= \frac{2}{15} \frac{1}{\hbar^2} (A^\circ : A^\circ) \tau_C \end{aligned} \quad (\text{II.16})$$

onde os termos $T^\circ : T^\circ$ (T° sendo a parte anisotrópica dos tensores $T = g$ ou A) representam uma soma dos produtos dos elementos de matriz dos tensores g e A . O termo A alarga as três linhas igualmente, devido à diferença entre $g_{\min}$ e $g_{\max}$. O termo C adiciona um alargamento simétrico com relação à $m_I = 0$, dependendo de $a_{\min}$ e $a_{\max}$. O termo misto B alarga as linhas diferentemente. Dependendo do sinal de B, o pico mais largo será o referente à $m_I = +1$ ou -1 .

Cálculo de tempo de correlação a partir dos espectros de EPR

Para calcular os tempos de correlação é necessário analisar a dependência temporal da probabilidade de encontrar a molécula com orientação (ϕ, θ, ψ) no tempo t . A equação de difusão para $p(\phi, \theta, \psi, t)$ é:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D_\perp \left\{ \frac{1}{\sin(\theta)} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin(\theta) \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2(\theta)} \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} - \frac{2 \cos(\theta)}{\sin^2(\theta)} \frac{\partial^2}{\partial \phi \partial \psi} + \left(\cot^2(\theta) + \frac{D_{//}}{D_\perp} \right) \frac{\partial^2}{\partial \psi^2} \right\} p \quad (\text{II.17})$$

onde $D_{//}$ e $D_\perp$ são os coeficientes de difusão rotacional em torno dos eixos paralelo e perpendicular ao eixo de simetria do movimento, respectivamente. A função de correlação, dada pela média da Hamiltoniana de perturbação entre t e $t + \tau_c$ é:

$$G_\ell(\tau) \approx \sum_{k=-\ell}^{+\ell} g_{\ell k} e^{-\tau/\tau_{\ell,k}} \quad (\text{II.18})$$

onde ℓ é a ordem do tensor. Os tempo de correlação rotacional que satisfazem a Eq. II.18 são dados por:

$$\frac{1}{\tau_{\ell,k}} = D_\perp \ell(\ell+1) + (D_{//} - D_\perp) k^2 \quad (\text{II.19})$$

onde a ordem do tensor é $\ell = 2$.

Para o caso mais simples de movimento isotrópico $D_{\perp} = D_{//} = D$ e, portanto $\tau_{\text{iso}} = \tau_{20} = 1/6D$. Para marcadores de spin ligados a moléculas anfífilas que se intercalam em membranas, o movimento não pode ser descrito por um tempo de correlação isotrópico, pois o movimento é restrito pela anisotropia da membrana. Em marcadores de membrana o eixo-z do nitróxido alinha-se, em geral, com a direção paralela ao plano da membrana (Fig. II.4), e o movimento da sonda no interior da membrana permite um cancelamento parcial das anisotropias internas do nitróxido. Deve-se calcular então $\tau_{//}$, referente ao movimento em torno do eixo principal da molécula e $\tau_{\perp}$, perpendicular ao mesmo, dados a partir de $\tau_{\ell,k}$ por (Marsh, 1989):

$$\begin{aligned}\tau_{\perp} &= \tau_{2,0} \\ \tau_{//} &= \frac{2\tau_{2,2}\tau_{2,0}}{3\tau_{2,0} - \tau_{2,2}}\end{aligned}\quad (\text{II.20})$$

Os tempos de correlação $\tau_{2,0}$ e $\tau_{2,2}$ podem ser calculados dos valores de B e C (Eq. II.16):

$$\begin{aligned}\tau_{20} &= c_1(C + c_2B) \\ \tau_{22} &= b_1(B + b_2C)\end{aligned}\quad (\text{II.21})$$

onde c_1 , c_2 , b_1 e b_2 são parâmetros que dependem do eixo preferencial de rotação do marcador em questão. Para marcadores cujo eixo principal de rotação é o x, como é o caso do dCAT1, $c_1 = -2,85$ ns, $c_2 = 1,447$; $b_1 = 1,28$ ns e $b_2 = 1,912$ (Marsh, 1989). Para marcadores com movimento principal em torno do eixo-z (16-PCSL, 16-MESL e 16-SASL), $c_1 = 1,16$ ns; $c_2 = -0,0316$; $b_1 = -0,335$ ns e $b_2 = 1,13$.

Os valores de B e C podem ser inferidos das larguras de linha dos espectros de EPR. A Eq. II.10 mostra que a largura de espectros de EPR é uma Lorentziana. Entretanto, na prática, a linha experimental é composta por uma Lorentziana, dada pela Eq. II.10, e por uma Gaussiana, esta resultante de desdobramentos hiperfinos não resolvidos. A largura Gaussiana independe de m_I e da temperatura, sendo uma característica de cada sonda. Barney Bales (Bales, 1989) desenvolveu um método de, a partir da linha medida experimentalmente, separá-la numa componente Gaussiana e numa Lorentziana, senda que a largura desta última será sensível ao movimento. A largura Lorentziana do pico central $\Delta H_{\text{pp}}^L(0)$ pode ser calculada das larguras de linha total $\Delta H_{\text{pp}}^o(0)$ e Gaussiana $\Delta H_{\text{pp}}^G(0)$ através de:

$$\Delta H_{\text{pp}}^L(0) = \Delta H_{\text{pp}}^o(0) \left\{ 1 - \left(\frac{\langle \Delta H_{\text{pp}}^G \rangle}{\Delta H_{\text{pp}}^o(0)} \right)^2 \right\} \quad (\text{II.22})$$

onde o subscrito pp indica que as larguras de linha foram calculadas pela distância pico a pico e a largura Gaussiana $\langle \Delta H_{\text{pp}}^G \rangle$ é calculada tomando-se a média sobre larguras obtidas dos três picos a diferentes temperaturas. De acordo com a Eq. II.15 a largura de linha $\Delta H(m_I) = 1/T_2$ é dada por:

$$\Delta H(m_i) = A + Bm_i + Cm_i^2 \quad (\text{II.23})$$

Escrevendo a Eq. II.23 para $m_i = +1, 0$ e -1 , é possível obter A, B e C em função das larguras de linha. Como o espectro medido é a primeira derivada da Lorentziana, suas alturas são mais precisamente medidas que suas larguras de linha, e é possível substituí-las usando que $\Delta H_L^{PP}(m_i) \times \sqrt{h_{m_i}} = \text{área}$, igual para os três picos, onde h_{m_i} é a altura do pico medida pico a pico da derivada do sinal. Isso mostra que a medida da altura, ou da relação entre elas, também reflete o grau de movimento das sondas paramagnéticas, da mesma forma que a largura de linha. Esse parâmetro será usado durante o trabalho para quantificar o movimento. A, B e C podem ser escritos, então, como:

$$\begin{aligned} A &= \Delta H_L^{PP}(0) \\ B &= \frac{1}{2} \Delta H_L^{PP}(0) \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right] \\ C &= \frac{1}{2} \Delta H_L^{PP}(0) \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right] \end{aligned} \quad (\text{II.24})$$

onde $\Delta H_L^{PP}(0)$ é dado pela Eq. II.22.

Introduzindo uma correção aos valores de B e C, devida ao fato de não termos somente larguras Lorentzianas envolvidas, temos:

$$\begin{aligned} B_{\text{corr}} &= S(\chi_o) B \\ C_{\text{corr}} &= S(\chi_o) C \end{aligned} \quad (\text{II.25})$$

onde

$$S(\chi_o) = \frac{1 + 1.78\chi_o + 1.85\chi_o^2}{1 + 2.08\chi_o} \cdot \chi_o = \frac{\langle \Delta H_{PP}^G \rangle}{\Delta H_L^{PP}(0)} \quad (\text{II.26})$$

A partir dos parâmetros B_{cor} e C_{cor} (Eq. II.25) calculamos os tempos de correlação τ_{20} e τ_{22} dados pela Eq. II.21, e então é possível obter os tempos de correlação paralelo e perpendicular ao eixo de simetria da molécula, utilizando a Eq. II. 20.

Parâmetro de ordem

A membrana lipídica impõe uma anisotropia ao movimento do marcador de spin, devido à sua estrutura bidimensional, além de torná-lo mais lento. Marcadores de spin em membranas apresentam um cancelamento parcial da anisotropia, sendo este bem maior na fase fluida que na fase gel. Abaixo, na Fig. II.4, vemos um esquema de um grupo nitróxido inserido em uma bicamada. O eixo-z do nitróxido tende a alinhar-se paralelo à direção normal da bicamada, que será chamada de orientação paralela.

Fig. II.4 - (a) Orientação dos eixos moleculares do nitróxido em marcador de spin de cadeia acila; (b) marcador de spin inserido na bicamada lipídica, com cadeia acila fazendo um ângulo β com a normal à bicamada. (Fig. 6.20 em Knowles et al., 1976)

Os eixos x e y são paralelos à superfície da membrana (orientação perpendicular). O movimento do marcador dentro da bicamada pode ser visualizado como formando um cone de ângulo β . Esse movimento cancela parte da anisotropia, e é possível observar que $A_{//} < A_{zz}$ e $A_{\perp} > A_{xx}, A_{yy}$. Esse efeito ocorre pois, para $\beta \neq 0$, $A_{//}$ contém também contribuições de A_{xx} e A_{yy} , e $A_{\perp}$ contém contribuições de A_{zz} , lembrando que $A_{zz} > A_{xx}, A_{yy}$.

É possível utilizar a anisotropia do tensor A para calcular, diretamente dos espectros de EPR, um parâmetro de ordem do sistema, relacionado à amplitude de movimento que o nitróxido desenvolve no interior da bicamada. Esse tratamento só é possível na região de *motional narrowing* ($\tau < 3$ ns), onde as larguras de linha estão relacionadas à velocidade de movimento, e suas posições com a orientação da molécula com relação ao campo magnético externo.

O parâmetro de ordem S mede a distribuição angular média do eixo principal da molécula com relação ao eixo perpendicular à superfície da membrana. O valor obtido para o marcador intercalado em cristais, $A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2$, fornece uma medida da anisotropia máxima do sistema, enquanto $A_{//} - A_{\perp}$ pode ser interpretado como o que restou da anisotropia, que não foi promediada pela amplitude de movimento da cadeia dentro da membrana. O parâmetro de ordem S pode ser obtido através da razão dessas duas anisotropias:

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \quad 0 < S < 1 \quad (\text{II.27})$$

O parâmetro de ordem será máximo quando a cadeia hidrocarbônica estiver alinhada à normal da bicamada ($\beta = 0$). O limite em que S se anula ocorre para amplitudes de movimento muito grandes ($A_{//} = A_{\perp}$). A Fig. II.5 mostra simulações de marcadores em movimento rápido para diferentes parâmetros de ordem entre 0 e 1.

Essas simulações mostram que os parâmetros tirados dos espectros, desdobramentos hiperfinos máximo e mínimo, como vemos na Fig. II.5, não são exatamente $A_{//}$ e $A_{\perp}$. O desdobramento hiperfino máximo será muito parecido com o desdobramento hiperfino paralelo ($A_{\max} \approx A_{//}$), no entanto $A_{\perp}$ é dado a partir de uma correção empírica elaborada por Griffith & Jost, 1976 e Gaffney, 1976:

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 \left(1 - \frac{A_{\max} - A_{\min}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \right) \quad (\text{II.28})$$

Fig. II.5 - Espectros de EPR simulados de marcadores de spin incorporados a vesículas lipídicas, para movimento rápido e diferentes parâmetros de ordem. As posições exatas de $A_{//}$, $A_{\perp}$, $g_{//}$ e $g_{\perp}$ estão mostradas nas linhas tracejadas (Fig. 6 em Griffith & Jost, 1976).

Outra correção importante a ser feita é a da polaridade do meio, que será discutida no próximo item:

$$S_{ef} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a_o(\text{cristal})}{a_o(\text{membrana})} \quad (\text{II.29})$$

$$a_o(\text{cristal}) = \frac{(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})}{3} \quad a_o(\text{membrana}) = \frac{(A_{//} + 2A_{\perp})}{3}$$

A polaridade do meio no qual encontra-se o radical nitróxido afeta os tensores g e A , pois altera a distribuição da nuvem eletrônica ao redor do núcleo de nitrogênio. O grupo nitróxido pode assumir duas configurações eletrônicas, como visto abaixo (Griffith et al., 1974):

Solventes polares tendem a estabilizar a segunda estrutura, que por apresentar maior densidade de spin no nitrogênio possui um desdobramento hiperfino maior. Dessa forma, medidas do desdobramento hiperfino médio, a_o , e do valor médio do tensor- g , g_o , são uma medida da polaridade do meio, como está mostrado na tabela abaixo, obtida para o di-*t*-butil-nitróxido (DTBN) a 23 °C (Griffith et al., 1974):

Tabela II.2

solvente	a_o (G)	g_o
Hexano	15.10	2.0061
Etanol	16.06	2.0059
Água	17.16	2.0056

O cálculo de a_o a partir dos espectros de EPR é confiável somente quando o movimento é muito rápido. No caso isotrópico, a distância medida entre os picos é o próprio valor médio a_o , enquanto que em movimentos anisotrópicos, consegue-se medir $A_{//}$ e $A_{\perp}$ com precisão. Em espectros que representam marcadores com pouca mobilidade, a_o só pode ser obtido com a simulação dos espectros.

II.2 - Espectroscopia de Fluorescência

(Cantor & Schimmel, 1980 e Lakowicz, 1986)

A fluorescência tem sido largamente utilizada em estudos bioquímicos e biofísicos, devido ao conveniente tempo de vida dos fluoróforos no estado excitado, da ordem de 10^{-9} s. Nessa escala de tempo, vários processos de interesse biológico ocorrem, tais como mudanças conformacionais e protonação e efeitos de solvente. O tempo de correlação rotacional de moléculas pequenas, como lipídios e resíduos laterais de proteínas, é, em geral, também da ordem de 10^{-9} s. Técnicas também muito utilizadas, como absorção ótica e CD (dicroísmo circular), não são sensíveis a esses processos dinâmicos, pois no rápido tempo em que ocorre a interação da radiação com a matéria ($\sim 10^{-15}$ s), as moléculas podem ser consideradas estáticas. Moléculas que apresentam fluorescência geralmente possuem elétrons delocalizados presentes em duplas ligações, como em anéis aromáticos. Dentre as moléculas biológicas encontramos algumas que são fluorescentes, como alguns amino-ácidos, sendo o triptofano o mais estudado, e cofatores, como por exemplo o NADH. Em muitos casos utilizam-se sondas extrínsecas.

Princípios básicos da fluorescência

A Fig. II.6 mostra um esquema básico para entender o fenômeno da fluorescência. Os níveis eletrônicos S_0 , S_1 e S_2 correspondem aos estados singleto fundamental, e primeiro e segundo excitados, respectivamente. Esses níveis eletrônicos possuem níveis vibracionais internos, representados por 0, 1, 2... Transições entre níveis singleto correspondem a elétrons formando um par, ou seja, o elétron excitado possui spin oposto ao spin do elétron no nível fundamental.

Fig. II.6 - a) Representação das possíveis transições entre os níveis vibracionais do estado fundamental S₀ e dos excitados S₁ e S₂. O processo de relaxação vibracional não gera emissão de radiação, e leva os elétrons do estado excitado S₂ para o S₁. O rearranjo do solvente em torno do fluoróforo diminui a energia do estado excitado, levando os elétrons para o estados S₁'. b) Espectro de excitação (linha cheia), que indica a estrutura vibracional dos estados excitados S₁ e S₂, e de emissão de fluorescência (linha tracejada), que indica a estrutura do estado fundamental S₀. Fig. 8-12 em Cantor & Schimmel, 1980.

A absorção de um fóton com energia $h\nu_a$ leva o elétron para um nível vibracional dos estados eletrônicos excitados (S₁, S₂, ...). Pelo princípio de Franck-Condon, essa transição é vertical, o que significa que ela é tão rápida ($\sim 10^{-15}$ s) que os núcleos permanecem estáticos. Entretanto, como a emissão fluorescente se dá após $\sim 10^{-9}$ s, relaxações vibracionais, que ocorrem em tempos bem menores (10^{-12} s), levam o elétron ao estado de menor energia vibracional de S₁. A fluorescência ocorre, portanto, sempre do menor nível vibracional do primeiro estado excitado. Como a maioria dos fluoróforos encontra-se em solução, o tempo da fluorescência é também suficiente para que haja um rearranjo das moléculas do solvente em torno do fluoróforo excitado, diminuindo um pouco a energia do nível S₁ (S₁' no diagrama), conforme discutido no modelo de Lippert. Dessa forma, a emissão fluorescente terá sempre uma energia menor que a necessária para a excitação, mesmo considerando a transição 0-0 (marcada com 1 e 1' na Fig. II. 6). Esse efeito é chamado de deslocamento de Stokes ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$), que será tanto maior quanto mais polar for o solvente em torno do fluoróforo. Esse deslocamento é muito usado para determinar a localização de certas sondas fluorescentes, que podem passar do meio aquoso para o interior de membranas, ou serem escondidas no interior de proteínas globulares.

O fato da fluorescência sempre ocorrer do menor nível vibracional de S₁, faz com que o espectro de emissão seja independente da energia da absorção, pois mesmo que o elétron seja excitado para o segundo estado excitado (S₂), o tempo da fluorescência é suficiente para relaxar o sistema para o nível 0 de S₁. Se a estrutura dos níveis vibracionais dos estados S₁ e S₀ forem

semelhantes, como acontece na maioria das sondas fluorescentes, o espectro de emissão será um espelho do espectro de excitação do nível eletrônico de menor energia, como mostra a Fig. II.6. Fica claro, portanto, que o espectro de excitação reflete a estrutura vibracional dos estados excitados, enquanto o espectro de emissão é indicativo dos níveis vibracionais do estado fundamental.

A emissão fluorescente não é, entretanto, a única maneira do elétron do estado excitado retornar ao estado fundamental. Existem outros processos, em geral não radiativos, que relaxam o sistema, como os descritos abaixo, e ilustrados na Fig. II.7.

i) Conversão interna. Colisões com o solvente e mudanças vibracionais internas podem despovoar S_1 sem emissão de radiação.

ii) Supressão de fluorescência. A supressão da fluorescência pode se dar por dois processos: a) Dinâmico ou colisional. A colisão com certas moléculas resulta na volta do fluoróforo para o estado fundamental sem emissão fluorescente. Como a taxa de encontro entre as moléculas aumenta com a temperatura, a taxa de supressão também aumentará com a temperatura. b) Estática. A molécula supressora forma um complexo não-fluorescente com o fluoróforo no estado fundamental. A supressão de fluorescência é muito utilizada em certos experimentos para saber se o fluoróforo está acessível ao supressor ou se encontra-se escondido em membranas ou no interior de proteínas, por exemplo.

iii) Cruzamento inter-sistema. Transições singleto - tripleto são proibidas quanticamente em primeira ordem, e por isso acontecem com um tempo de vida muito grande. No estado tripleto o spin do elétron possui a mesma orientação do spin do elétron no estado fundamental de S_0 . Pode ocorrer um cruzamento inter-sistemas e o elétron passar de S_1 para T_1 , e depois decair para S_0 . A emissão de um fóton de T_1 para S_0 é chamada de fosforescência, e sua energia é menor que a da fluorescência, pois, em geral, T_1 tem energia menor que S_1 . Entretanto, devido ao grande tempo de vida desse estado (da ordem de segundos), a fosforescência não é praticamente observada em experimentos usuais, mesmo porque a supressão colisional com moléculas supressoras facilmente suprime a pouca fosforescência do sistema.

Fig. II.7 - Esquema dos níveis eletrônicos singlete fundamental (S_0) e excitado (S_1) e tripleto excitado (T_1). As linhas em cada nível eletrônico representam os níveis vibracionais. As transições estão marcadas por uma seta com linha reta, enquanto as linhas onduladas representam processos de relaxação vibracional. Fig. 8-11 em Cantor & Schimmel, 1980.

A existência desses outros processos de desexcitação do elétron, faz com que o tempo de vida observado experimentalmente pela técnica de fluorescência (τ_{exp}) seja sempre menor que o tempo de vida por emissão fluorescente radiativa somente (τ_R). Chamando k_R a taxa de emissão fluorescente (radiativa) e $k's$ a soma das taxas dos outros processos descritos acima, podemos escrever:

$$\tau_R = \frac{1}{k_R} \quad \text{e} \quad \tau_{\text{exp}} = \frac{1}{k_R + k's} \quad \Rightarrow \quad \tau_{\text{exp}} < \tau_R \quad (\text{II.30})$$

É possível, então, determinar o quanto da energia absorvida foi emitida por fluorescência, que é chamado de rendimento quântico da fluorescência (Φ_F):

$$\Phi_F = \frac{k_R}{k_R + k's} \quad \Rightarrow \quad \Phi_F = \frac{\tau_{\text{exp}}}{\tau_R} \quad (\text{II.31})$$

O caso ideal corresponderia a $\Phi_F = 1$. Para a medida de fluorescência, portanto, procuram-se moléculas com um alto rendimento quântico, para que a intensidade de fluorescência possa ser melhor detectada. Alguns amino-ácidos são fluorescentes, como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. O espectro de fluorescência desses resíduos em proteínas é sensível à polaridade do microambiente no qual se encontra, podendo portanto indicar a penetração em bicamadas lipídicas. A sonda fluorescente DPH, muito usada na obtenção de anisotropia de fluorescência, possui também um alto rendimento quântico ($\Phi_F \sim 0,8$), o que possibilita seu estudo mesmo em baixíssimas concentrações.

A anisotropia de fluorescência quantifica a liberdade de movimento de um fluoróforo em seu microambiente, que pode ser uma proteína ou o interior de uma membrana lipídica, por exemplo. Como a escala de tempo da fluorescência coincide com tempos de correlação típicos de resíduos laterais de proteínas e do movimento de sondas no interior de membranas, essa técnica é muito utilizada para medir microviscosidade. Com o uso da fluorescência com resolução temporal, é possível inferir o tempo de correlação rotacional da sonda.

O princípio da medida de anisotropia de fluorescência consiste em utilizar radiação verticalmente polarizada para excitação das moléculas, e observar, na radiação emitida, as componentes paralela ($I_{//}$) e perpendicular ($I_{\perp}$) à polarização inicial. O quanto essa polarização estiver correlacionada com a polarização de excitação será uma medida do movimento rotacional do fluoróforo na escala de tempo da fluorescência. Abaixo está mostrado o arranjo experimental utilizado numa medida de fluorescência e a expressão através da qual a anisotropia pode ser calculada.

Fig. II.8 - Orientação do momento de dipolo de emissão $\vec{\mu}$ do fluoróforo em relação a um eixo xyz, onde z é a direção de polarização da luz incidente, x é a direção de propagação da luz incidente e y da luz emitida. No detector estão definidas as componentes $I_{//}$ e $I_{\perp}$, com relação à direção da polarização vertical de incidência. Fig. 8-21 em Cantor & Schimmel, 1980.

$$A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (\text{II.32})$$

Para entendermos melhor a medida da anisotropia, analisemos primeiro o caso de uma distribuição aleatória de fluoróforos congelada, na qual não existe depolarização de fluorescência por movimento rotacional do fluoróforo. Vamos analisar a foto-seleção na excitação e a orientação da luz na emissão separadamente, no sistema de coordenadas polares.

b) Excitação. A absorção de luz se dá com maior probabilidade quando o momento de dipolo de absorção do fluoróforo e o campo elétrico forem colineares, o que causa um efeito de foto-seleção. A excitação será proporcional a $\cos^2(\theta_a)$, onde θ_a é o ângulo que o momento de dipolo de absorção do fluoróforo faz com a direção de polarização de excitação. O número de fluoróforos com orientação θ_a é dado por $\sin(\theta_a) d\theta_a$. A excitação independe do ângulo ϕ . A probabilidade de absorção será dada por:

$$P(\theta_a) d\theta_a = \cos^2(\theta_a) \sin(\theta_a) d\theta_a \quad (\text{II.33})$$

b) Emissão. A emissão fluorescente também será polarizada. Vamos assumir que o momento de dipolo de emissão do fluoróforo faz um ângulo θ com a direção vertical de polarização da luz incidente, como mostra a Fig. II.8. As componentes paralela e perpendicular da intensidade de emissão serão dadas por:

$$\begin{aligned} I_{//} &\propto \cos^2(\theta) \\ I_{\perp} &\propto \sin^2(\theta) \cos^2(\phi) \end{aligned} \quad (\text{II.34})$$

Como a população de fluoróforos excitados está simetricamente distribuída com relação ao eixo-z, a dependência em ϕ pode ser eliminada:

$$\overline{\cos^2(\phi)} = \frac{\int_0^{2\pi} \cos^2(\phi) d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} \quad (\text{II.35})$$

Logo,

$$\begin{aligned} I_{//} &\propto \cos^2(\theta) \\ I_{\perp} &\propto \frac{\sin^2(\theta)}{2} \end{aligned} \quad (\text{II.36})$$

Considerando agora que o fluoróforo pode estar orientado entre θ e $\theta + d\theta$ (com probabilidade $P(\theta)$), as componentes paralela e perpendicular da emissão fluorescente serão:

$$I_{//} = \int_0^\pi P(\theta) \cos^2(\theta) d\theta = \overline{\cos^2(\theta)}$$

$$I_{\perp} = \int_0^\pi P(\theta) \frac{\sin^2(\theta)}{2} d\theta = \frac{\overline{\sin^2(\theta)}}{2}$$
(II.37)

Substituindo as expressões da Eq. II.37 na Eq. II.32, encontramos uma expressão para a anisotropia de fluorescência em função do ângulo θ :

$$A = \frac{3\overline{\cos^2(\theta)} - 1}{2}$$
(II.38)

A diferença entre a orientação dos dipolos de absorção (θ_a) e de emissão (θ) depende da conformação da molécula antes e depois da absorção da luz, ou do movimento que a sonda faz na escala de tempo da fluorescência. Entretanto, estamos ainda considerando uma solução congelada de fluoróforos, onde não existe liberdade rotacional. Vamos então analisar os limites do valor da anisotropia, relacionados à orientação entre os dipolos de absorção e emissão, característico de mudanças conformacionais internas de cada fluoróforo:

i) $\theta = \theta_a$. Nesse caso a molécula absorve e emite com a mesma orientação. Substituindo a Eq. II.33 na II.37, pode-se calcular o valor médio de $\cos^2(\theta)$:

$$\overline{\cos^2(\theta)} = \frac{\int_0^\pi \cos^2(\theta) (\cos^2(\theta) \sin(\theta)) d\theta}{\int_0^\pi \cos^2(\theta) \sin(\theta) d\theta} = \frac{3}{5}$$
(II.39)

Portanto, devido à foto-seleção, e à orientação da emissão, o valor máximo da anisotropia, substituindo o valor encontrado da Eq. II.39 na Eq. II.38, é de $A = 2/5$ (0,4). Se valores maiores que 0,4 forem encontrados na medida de anisotropia de fluorescência, com certeza o efeito de espalhamento de luz está mais forte que a fluorescência, já que no processo de espalhamento, que ocorre em $\sim 10^{-15}$ s, a direção de polarização da luz não muda nessa escala de tempo.

ii) $\theta = \theta_a + \pi/2$. Os momentos de dipolo de absorção e emissão são perpendiculares. O valor médio de $\cos^2(\theta)$ será então:

$$\overline{\cos^2(\theta)} = \frac{\int_0^\pi \cos^2(\theta) (\cos^2(\theta + \pi/2) \sin(\theta + \pi/2)) d\theta}{\int_0^\pi \cos^2(\theta) \sin(\theta) d\theta} = \frac{1}{5}$$
(II.40)

O valor mínimo da anisotropia será $A = -1/5$ ($\alpha = 90^\circ$). A anisotropia pode portanto adotar valores negativos.

iii) $\theta = \alpha$. Na maioria dos casos, o ângulo entre os momentos de dipolo de absorção e emissão será um ângulo α qualquer entre 0 e $\pi/2$. Nesse caso a expressão para a anisotropia de fluorescência será dada pelo produto da Eq. II.38 pelo valor máximo permitido pela foto-seleção (2/5):

$$A = \frac{3 \cos^2(\alpha) - 1}{5} \quad (\text{II.41})$$

Nessa expressão $A^{\min} = -1/5$ ($\alpha = 90^\circ$) e $A^{\max} = 2/5$ ($\alpha = 0$).

Essa é a anisotropia obtida em amostras congeladas, onde α é o ângulo entre os momentos de dipolo de absorção e emissão do fluoróforo, característico de cada fluoróforo. Em sistemas de interesse biológicos as moléculas não estão paradas, e o interessante é justamente medir a depolarização causada pela rotação do fluoróforo na escala de tempo da fluorescência. Se a liberdade rotacional for muito grande, por exemplo uma sonda livre em solução, a anisotropia medida será zero, pois a polarização adquirida no momento da absorção foi completamente perdida com o movimento da sonda. Em sistemas em solução, o valor de anisotropia dado pela Eq. II.41 é o máximo de anisotropia sentida pela sonda. Com o movimento esse valor decai para zero. Podemos escrever uma anisotropia com dependência temporal:

$$A(t) = A_0 e^{-t/\tau_c} \quad (\text{II.42})$$

onde τ_c é o tempo de correlação temporal do fluoróforo e A_0 é dada pela Eq. II.41. A utilização de fluorescência com resolução temporal permite a obtenção de τ_c . Entretanto, se a medida de anisotropia é feita com fluorescência estática, obtém-se uma média temporal da Eq. II.42 durante o tempo de vida da fluorescência (τ_{exp}):

$$\bar{A} = \frac{A_0}{1 + \tau_{\text{exp}}/\tau_c} \quad (\text{II.43})$$

Analisando a relação entre τ_{exp} e τ_c temos dois limites:

$\tau_c \gg \tau_{\text{exp}} \Rightarrow \bar{A} \approx A_0$ o fluoróforo tem pouca liberdade de movimento.

$\tau_c \ll \tau_{\text{exp}} \Rightarrow \bar{A} \rightarrow 0$ o fluoróforo tem muita liberdade de movimento.

O DPH, uma das sondas mais utilizadas no estudo de microviscosidade de bicamadas lipídicas, possui os momentos de dipolo de absorção e emissão aproximadamente colineares ($\alpha \sim$

0), de forma que o máximo de sua anisotropia é 0,4. O valor medido da anisotropia é muito sensível às mudanças de microviscosidade ocorridas na transição gel - cristal-líquido.

O espalhamento de luz deve ser sempre evitado em medidas de fluorescência. Dispersões lipídicas, em geral, são turvas, o que atrapalha muito a medida fluorescente, e portanto a medida da anisotropia. Devemos chamar a atenção para dois efeitos distintos do espalhamento de luz, pois, dependendo das condições, ele pode diminuir ou aumentar o valor da anisotropia de fluorescência.

Foi dito que o espalhamento de luz possui $A = 1$. Portanto, em amostras que apresentam espalhamento de luz, a anisotropia medida pode ser maior que a anisotropia de fluorescência. Esse efeito pode ser eliminado através da medida da anisotropia na ausência de fluoróforos. A componente paralela à polarização de excitação, obtida na ausência de fluoróforo, deve ser subtraída da medida em presença deste. Assim, elimina-se a componente paralela resultante do espalhamento de luz (não existe componente perpendicular de espalhamento de luz).

Entretanto, o espalhamento de luz também pode ter o efeito de diminuir o valor da anisotropia, conforme comprovamos experimentalmente para dispersões lipídicas (o valor da anisotropia aumentava quando diluímos a dispersão lipídica, dessa forma diminuindo sua turbidez). Como discutido na página 133 em Lakowicz, 1986, a anisotropia diminui com a densidade ótica (turbidez) da amostra. Embora as razões para tal efeito ainda não estejam muito claras para nós, é provável que o espalhamento de luz diminua a intensidade de luz que chega no centro da cubeta para excitar os fluoróforos, assim como a intensidade de fluorescência emitida. Além disso, um efeito de multi-espalhamento pode estar ocorrendo.

O ideal, portanto, é utilizar amostras transparentes, devido à dificuldade de descontar esses dois efeitos contrários do espalhamento de luz na medida de anisotropia. Em geral, utilizam-se vesículas unilamelares não muito concentradas, ou dispersões lipídicas bem diluídas.

II.3 - Espalhamento e Difração de Raio-X

(Guinier, 1955 e 1994, Glatter & Kratky, 1982 e Cantor & Schimmel, 1980)

Ondas eletromagnéticas com comprimento de onda da ordem de ângstroms são chamadas de raios-X, sendo que o comprimento de onda mais utilizado, proveniente da emissão K_α do cobre, é de $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Esse comprimento de onda é da ordem de distâncias inter-atômicas, o que fez da técnica de difração de raio-X uma ferramenta indispensável no estudo de estruturas cristalinas. O conhecimento do padrão de intensidade de radiação espalhada por um material detectado a diferentes ângulos pode, em princípio, levar ao conhecimento da densidade eletrônica deste. Em estudos biológicos, a difração de raio-X resolveu a estrutura atômica de várias proteínas com uma resolução menor que $3 \text{ \AA}$, desde que cristais das mesmas possam ser formados.

Por outro lado, o estudo do espalhamento de raio-X em baixo ângulo (SAXS) é uma técnica muito apropriada para o estudo de macromoléculas de interesse biológico em solução. Como essas moléculas possuem diâmetros uma ou duas ordens de grandeza maiores que o comprimento de onda de raio-X, é necessária a utilização de ângulos menores de detecção. A teoria desenvolvida por Guinier, por exemplo, permite o cálculo do raio de giração de moléculas ou partículas em solução. Lipídios em presença de água formam, em geral, estruturas lamelares com distâncias de repetição da ordem de $100 \text{ \AA}$, formando uma rede de difração em baixos ângulos, e permitindo que a densidade eletrônica de membranas lipídicas possa ser determinada.

Fundamentos gerais

Os raios-X são ondas eletromagnéticas, e a expressão genérica da componente elétrica de uma onda se propagando na direção $\hat{k}$ é:

$$E(\vec{r}, t) = E_0 e^{2\pi i \left(\frac{\hat{k} \cdot \vec{r}}{\lambda} - \nu t - \delta \right)} \quad (\text{II.44})$$

onde E_0 é a amplitude máxima da onda, λ seu comprimento de onda, ν sua frequência e δ sua fase. Duas ondas que se propagam na mesma direção com o mesmo comprimento de onda e amplitude máxima só diferem em fase.

No choque dos fótons de comprimento de onda λ com um elétron, o espalhamento elástico (Thomson) faz com que o elétron seja uma fonte de emissão de fótons com o mesmo comprimento de onda λ . Para medir a intensidade de raio-X espalhada, coloca-se um detetor a um ângulo 2θ do feixe incidente. Como a amostra contém vários elétrons ligados a átomos, a radiação que chega ao detetor será a soma da radiação espalhada por cada elétron. Essas ondas só vão diferir entre si em

fase, pois cada uma percorreu um caminho distinto devido à posição dos elétrons na amostra. Essas diferenças de fase alteram a amplitude da onda que chega ao detetor, refletindo os diferentes caminhos que percorreram na amostra, e portanto, refletindo a distribuição eletrônica da mesma.

Chamemos de $\hat{s}_0$ a direção do feixe incidente e de $\hat{s}$ a direção do feixe espalhado, como mostra a Fig. II.9. É muito conveniente definir o vetor espalhamento $\vec{S}$:

$$\vec{S} = (\hat{s} - \hat{s}_0) / \lambda \quad (\text{II.45})$$

Pelo fato do vetor espalhamento ter dimensão inversa de comprimento, ele pertence ao que é chamado de espaço recíproco, enquanto a posição dos elétrons pertence ao espaço direto. O comprimento desse vetor é dado por $\vec{S} \cdot \vec{S}$. Levando em conta que o ângulo entre $\hat{s}_0$ e $\hat{s}$ é 2θ , o produto escalar pode ser calculado, e o módulo do vetor espalhamento é:

$$|\vec{S}| = 2 \sin(\theta) / \lambda \quad (\text{II.46})$$

O módulo do vetor espalhamento pode variar entre 0 (quando $\hat{s}_0$ e $\hat{s}$ são paralelos, $\theta = 0$) e $2/\lambda$ (quando $\hat{s}_0$ e $\hat{s}$ são anti-paralelos, $\theta = \pi/2$).

Fig. II.9 - Esquerda. Arranjo experimental para a medida de espalhamento de raio-X, mostrando os versores $\hat{s}_0$ e $\hat{s}$, e a diferença de caminho percorrida pela radiação espalhada por dois pontos distintos. Direita. Definição do vetor $\vec{S}$ em função dos versores $\hat{s}_0$ e $\hat{s}$.

A intensidade que chega ao detetor vai depender do produto escalar $\vec{S} \cdot \vec{r}$, onde $\vec{r}$ indica a distância do elétron à origem. A diferença de fase que chega ao detetor entre as ondas espalhadas por um elétron na origem e na posição $\vec{r}$ é dada por $e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}}$. O fator de estrutura $F(\vec{S})$, uma grandeza que será de suma importância, é definido como a razão entre a radiação espalhada por qualquer amostra real e a espalhada por um único elétron na origem (espalhamento Thomson). Logo, para um elétron localizado na posição $\vec{r}$ será $F(\vec{S}) = e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}}$. Os objetos espalhadores são melhor descritos por uma densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$ em um elemento de volume $d\vec{r}$:

$$F(\vec{S}) = \int \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (\text{II.47})$$

Essa integral pode ser tomada sobre todo espaço, pois $\rho(\vec{r}) = 0$ fora da amostra. Logo, a Eq. II.47 mostra que o fator de estrutura é a transformada de Fourier da densidade eletrônica, ou seja, da distribuição de elétrons. Tomando a transformada inversa, obtém-se $\rho(\vec{r})$ em função de $F(\vec{S})$:

$$\rho(\vec{r}) = \int F(\vec{S}) e^{-2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}} d\vec{S} \quad (\text{II.48})$$

A Eq. II.48 mostra que, obtendo-se o fator de estrutura, é possível calcular a densidade eletrônica, que é o que se quer inferir num experimento de raio-X. Entretanto, F é uma função complexa, dada por $F = |F| e^{i\phi}$. A intensidade medida pelo detetor, $I(\vec{S})$, que tem que ser uma grandeza real, é dada por $I(\vec{S}) = F(\vec{S})F^*(\vec{S}) = |F|^2$. Portanto, a informação da fase ϕ é perdida, e não é possível conhecer a parte imaginária de F para que a integral da Eq. II.48 seja resolvida. Esse é conhecido como o problema da fase, que não pode ser determinada diretamente pela medida da intensidade. Existem vários métodos para resolver esse problema.

Analisando a Eq. II.47 tiramos uma conclusão muito importante a cerca da densidade eletrônica. Suponhamos que $\rho(\vec{r}) = \rho$, ou seja, a densidade eletrônica é uniforme em todo o espaço. Essa constante sai da integral, e o termo que sobra tem a forma da função delta de Dirac:

$$F(\vec{S}) = \rho \int e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}} d\vec{r} = \rho \int \delta(\vec{S}) d\vec{r} = F(0) \quad (\text{II.49})$$

$\vec{S} = 0$ corresponde a $\theta = 0$. Isso significa que não existe espalhamento, ou seja, o material é transparente aos raios-X quando a densidade eletrônica é constante em toda a amostra. Em outras palavras, é necessário que hajam inomogeneidades na densidade eletrônica para que ocorra alguma deflexão de raios-X, ou seja, precisa haver contraste eletrônico na amostra.

Vamos agora considerar o espalhamento causado por um átomo na origem. A densidade eletrônica em volta desse átomo pode ser aproximada por uma esfera, e o problema pode ser tratado com coordenadas polares. A Eq. II.47 pode ser reescrita como:

$$F(\vec{S}) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi \sin(\theta) d\theta \int_0^\infty \rho(r) r^2 e^{2\pi i S r \cos(\theta)} dr \quad (\text{II.50})$$

resolvendo a integral para ϕ e θ :

$$F(\vec{S}) = 4\pi \int_0^\infty \rho(r) r^2 \frac{\sin(2\pi S r)}{2\pi S r} dr \equiv f(S) \quad (\text{II.51})$$

A função $f(S)$ é definida como fator de espalhamento atômico e não depende da direção do vetor de espalhamento, mas somente de seu módulo.

O espalhamento de raio-X por vários átomos localizados em diferentes posições, é dado por:

$$F(\vec{S}) = f_n(S) e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}_n} \quad (\text{II.52})$$

onde $\vec{r}_n$ é a posição do átomo n com relação à origem. O fator de estrutura atômico de um átomo distante da origem é, portanto, dado pelo produto do fator de espalhamento $f_n(S)$ de um átomo na origem, pela diferença de fase, análogo ao espalhamento de um elétron deslocado da origem. Quando temos N átomos, o fator de estrutura total será a soma dos fatores de estrutura de cada átomo:

$$F(\vec{S}) = \sum_{n=1}^N f_n(S) e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}_n} \quad (\text{II.53})$$

onde $f_n(S)$ refere-se ao fator de espalhamento nuclear do n -ésimo átomo. Se os N átomos pertencerem a uma única molécula, a Eq. II.53 representa o fator de forma molecular. Essa equação mostra que o fator de estrutura tem duas componentes, uma que depende da distribuição eletrônica da unidade espalhadora, como se ela estivesse na origem, e uma função de interferência, dada pelo termo exponencial, que soma as contribuições de cada unidade espalhadora, dependendo de sua posição.

Genericamente, no caso de N unidades espalhadoras quaisquer (molécula, macromolécula, partícula, cela unitária de um cristal), a Eq. II.53 representa o fator de estrutura total e $f_n(S)$ o fator de forma da unidade espalhadora.

Vamos agora analisar o fenômeno de difração, quando os átomos, ou unidades espalhadoras, formam uma rede cristalina, com posições correlacionadas, tendo como base a Eq. II.53. Nesse caso, o espalhamento será completamente destrutivo ou construtivo dependendo da posição 2θ do detetor, e um padrão de interferência aparecerá no espaço recíproco, refletindo o arranjo espacial da densidade eletrônica da rede direta.

No caso mais simples de uma rede unidimensional, o átomo n está localizado a $n\vec{a}$ da origem. No caso de átomos idênticos, $f_n(S) = f(S)$, e a soma do termo exponencial na Eq. II.52 é uma progressão geométrica:

$$F(\vec{S}) = f(S) \frac{\text{sen}((2N+1)\pi \vec{S} \cdot \vec{a})}{\text{sen}(\pi \vec{S} \cdot \vec{a})} \quad (\text{II.54})$$

A Eq. II.54 tem a forma de uma função de interferência modulada pelo fator de espalhamento $f(S)$. O termo de interferência tem máximos em $\vec{S} \cdot \vec{a} = h$, onde h é um número inteiro. Essa é a chamada condição de difração de von Laue. Devido à presença do termo multiplicativo $f(S)$, os picos da função de interferência serão maiores para menores valores de $|h|$. O padrão de intensidade observado experimentalmente será uma distribuição de pontos no espaço recíproco.

Generalizando para um cristal tri-dimensional com vetores $\vec{a}$, $\vec{b}$ e $\vec{c}$ no espaço direto, a intensidade será máxima quando as condições de von Laue forem satisfeitas na três dimensões:

$$\begin{cases} \vec{S} \cdot \vec{a} = h \\ \vec{S} \cdot \vec{b} = k \\ \vec{S} \cdot \vec{c} = l \end{cases} \quad \text{onde } h, k, l \text{ são inteiros}$$

O fator de estrutura será dado por:

$$F(h, k, l) = \sum_x \sum_y \sum_z f(S) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} = Nf(S) \quad (\text{II.55})$$

e a densidade eletrônica por:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{NV} \sum_h \sum_k \sum_l F(h, k, l) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (\text{II.56})$$

onde $V = \vec{a} \cdot \vec{b} \times \vec{c}$ é o volume da cela unitária na rede direta.

É importante salientar que as condições de von Laue para que haja difração resultam na Lei de Bragg:

$$2d \sin(\theta) = n\lambda \quad (\text{II.57})$$

onde n é um número inteiro e d é a distância interplanar, módulo de um vetor da rede recíproca paralelo ao vetor $\vec{S}$. Lembrando a definição de $\vec{S}$ (Eq. II.46), e impondo que a diferença de ciclo entre os dois planos seja um número inteiro ($\vec{S} \cdot \vec{r} = n$), é possível chegar à Lei de Bragg (Eq. II.57) da condição de von Laue.

Espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS)

Analisando a lei de Bragg (Eq. II.57), $d = \lambda / 2 \sin(\theta)$, vemos que, para ângulos θ próximos a zero, é possível satisfazer a condição de difração mesmo se a distância de repetição $d \gg \lambda$. Portanto, a detecção do espalhamento para ângulos muito pequenos ($\vec{S} \approx 0$) permite o estudo de distâncias de repetição da ordem de 10 ou 100 distâncias inter-atômicas.

Um bom exemplo é a detecção de estruturas lamelares lipídicas, onde as distâncias de repetição são de, no mínimo, 50 Å. Esse problema pode ser tratado unidimensionalmente e os picos de difração aparecem em $|\vec{S}| = n/d$, onde n é a ordem da difração.

Muitas partículas têm dimensões da ordem de dezenas a centenas de ângstrons. Nesse caso, o tamanho do objeto espalhador será sentido pelo espalhamento de raio-X de baixo ângulo, desde que o espalhador tenha uma densidade eletrônica média diferente da do meio que o circunda. Isso faz da técnica de SAXS uma boa ferramenta no estudo de partículas em solução (proteínas, macromoléculas, colóides, micelas, membranas, etc...). A Eq. II.47, expressão genérica para o fator de estrutura, deve ser tomada no volume V do objeto espalhador:

$$F(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r} \quad (\text{II.58})$$

onde introduzimos a notação $\vec{q} = 2\pi\vec{S}$, usualmente utilizada em análises de SAXS. Os dois vetores têm a mesma direção, só diferindo por um fator 2π . A intensidade observada será dada em função do valor médio do fator de estrutura ao quadrado, pois todas as direções de orientação do objeto com a radiação incidente têm que ser promediadas. O fator de estrutura, portanto, será dependente da forma do objeto. Na aproximação de Guinier, na qual se toma o limite para $q = 0$ e partículas não interagentes, pode-se calcular o raio de giração R_G do objeto. A região de Guinier ocorre para $qR_G < 1$. Para valores maiores de q , temos a chamada região de Porod, na qual o espalhamento de qualquer objeto, isolado ou interagente, obedece a Lei de Porod: $I \propto q^{-4}$.

Para objetos anisométricos, tais como cilindros e discos, a Lei de Porod continua valendo, mas, devido à grande diferença entre as dimensões do objeto nas diferentes direções, a integral da Eq. II.58 é feita de forma independente em cada direção. No caso do cilindro, por exemplo, é possível separar a integral nas componentes axial e transversal. Como as contribuições relevantes para a integral provêm de orientações da partícula nas quais o eixo axial do cilindro está praticamente perpendicular a $\vec{q}$, a intensidade de SAXS será $I(q) \propto I_c/q$, onde I_c é a intensidade relacionada com o corte transversal do cilindro.

O caso de partícula plana com área A muito maior que espessura T é análogo ao do cilindro. Entretanto, agora, só serão relevantes as orientações nas quais o plano da partícula for perpendicular ao vetor de espalhamento $\vec{q}$. A integral se dividirá, então, numa contribuição transversal à partícula I_t e numa relacionada à área do plano. A intensidade será $I(q) \propto I_t/q^2$. Para uma densidade eletrônica que varia na direção transversal ao plano, a intensidade de SAXS será:

$$I(\vec{q}) = \frac{2\pi A}{q^2} F_t^2(q) \quad (\text{II.59})$$

onde $F_t(q)$ é o fator de estrutura tomado na direção perpendicular à espessura do objeto espalhador ($I_t = F_t^2$).

O expoente de q nas expressões para a intensidade de SAXS do cilindro e do plano estão relacionados à simetria do objeto. Como vimos, $I(q) \propto q^{-1}$ indica uma simetria cilíndrica, enquanto que $I(q) \propto q^{-2}$ indica simetria plana. Entretanto, a intensidade total obedecerá a Lei de Porod $I(q) \propto q^{-4}$ para valores de q grandes, só variando como a dependência em q se divide nas direções relevantes à simetria da partícula em questão.

Estamos interessados no espalhamento causado pela membrana de uma vesícula. Como, em geral, vesículas lipídicas apresentam um baixo raio de curvatura em relação aos tamanhos relevantes medidos pelo SAXS, podemos aproximar a vesícula por um plano de área A muito maior que sua espessura T . De fato, $T \sim 50 \text{ \AA}$, enquanto que as vesículas têm um diâmetro em geral

maior que 1000 Å. Como a densidade eletrônica varia na direção perpendicular à sua espessura, a Eq. II.59 pode descrever o espalhamento de SAXS causado por uma membrana. O fator de forma transversal F_t é:

$$F_t(q) = \int_{-T/2}^{T/2} \rho(z) \cos(qz) dz \quad (\text{II.60})$$

onde $\rho(z)$ é a densidade eletrônica perpendicular ao plano da bicamada, que surge devido às diferenças entre a densidade eletrônica da região da cabeça polar, da região hidrocarbônica e do centro das bicamadas onde localizam-se os terminais metila.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - Materiais

Anfífilicos. Os lipídios DMPC (1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] - sal de sódio), e DMPC (1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-Fosfocolina) foram comprados da Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, EUA). O detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) foi comprado da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Marcadores de spin. Os marcadores de spin 16-PCSL (1-Palmitoil-2-(16-doxilestearoil) fosfatidilcolina), 16-SASL (16-doxil ácido esteárico) e 16-MESL (16-doxil metil ester do ácido esteárico) foram comprados da Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, EUA). O marcador 14-PCSL (1-Palmitoil-2-(14-doxilestearoil) fosfatidilcolina) foi uma doação do Prof. Dr. A. Watts (Oxford, Inglaterra) e a sonda dCAT1 (iodeto de 4-trimetilamônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-d₁₇-1-oxil) foi comprada de CDC Isotopes (Quebec, Canada).

Sondas fluorescentes. As sondas fluorescentes DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) e Pireno foram compradas da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA) e Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), respectivamente. A sonda fluorescência ligada a um DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-etanolamina) foi uma doação do Dr. Hans-Günther Döbereiner.

Tampão, sais e bases. O tampão Hepes (ácido de N- (2-Hidroxietil)-Piperazina-N'-2-etano sulfônico) foi comprado da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os sais NaCl (cloreto de sódio), KCl (cloreto de potássio), LiOH (cloreto de lítio) e NH₄Cl (cloreto de amônio) e as bases NaOH (hidróxido de sódio), KOH (hidróxido de potássio), LiOH (hidróxido de lítio) e NH₄OH (hidróxido de amônio) foram compradas da Casa Americana (São Paulo, SP). Água Milli-Q Plus (Millipore) pH ~6 foi usada em todos os experimentos.

A Fig. III.1 mostra esquematicamente os anfífilicos e sondas paramagnéticas e fluorescentes utilizadas neste trabalho.

Fig. III.1 - Representação esquemática dos fosfolipídios DMPG e DMPC, do detergente SDS, da sonda fluorescente DPH e dos marcadores de spin 16-SASL, 16-MESL, 16-PCSL e dCAT1.

III.2 - Métodos

Dispersões lipídicas. vórtex (agitação mecânica). O pó lipídico era pesado e dissolvido em clorofórmio, que depois era evaporado com um fluxo contínuo de nitrogênio gasoso, formando um filme na parede do tubo de ensaio. As amostras ficavam a baixa pressão por, no mínimo, 2 horas para que qualquer traço de clorofórmio fosse removido. As amostras eram depois suspensas na solução aquosa desejada por meio de agitação mecânica em um vórtex ($\sim 1'$ à temperatura ambiente seguida de $2'$ numa temperatura na qual o lipídio esteja na fase fluida). Os marcadores de spin derivados de anfifílicos, e o marcador fluorescente DPH, eram dissolvidos em clorofórmio na primeira etapa do processo, enquanto o dCAT1, marcador de spin aquo-solúvel, era adicionado à solução aquosa na qual era feita a suspensão do filme lipídico. Essas dispersões foram utilizadas em todos os experimentos (espalhamento de luz, DSC, anisotropia de fluorescência, EPR e SAXS), com exceção dos de microscopia ótica, onde era necessário o uso de vesículas gigantes, preparadas por dois métodos distintos, descritos a seguir.

Vesículas unilamelares gigantes (GUV's). Eletroformação. Um filme lipídico (10 mg/ml em clorofórmio) bem fino era feito sobre dois eletrodos. Para as imagens fluorescentes, uma solução 10 mg/ml DMPG em clorofórmio + 1 mol% Fluoresceína-DOPE era usada. O eletrodo era deixado em baixa pressão por no mínimo 30 minutos. Um campo elétrico bem baixo era aplicado ao eletrodos com uma frequência de 10 Hz. Após 10 minutos, a solução aquosa desejada era adicionada e a temperatura mantida acima de T_m^{off} . Em poucos minutos, vesículas gigantes eram observadas através do microscópio ótico em torno dos eletrodos. Nem todas as vesículas formadas eram unilamelares.

Vesículas unilamelares gigantes (GUV's). "Swelling". Um filme lipídico (solução 10 mg/ml em clorofórmio) bem fino era feito sobre uma placa de teflon que era acomodada no interior de um frasco de vidro com a face contendo o filme lipídico virada para cima. O frasco de vidro com a placa de teflon era deixado em baixa pressão por 12 h. A seguir, os frascos ficavam dentro de um recipiente com um pouco de água em uma estufa a 37 °C por 2 h para que ocorresse uma pré-hidratação do filme lipídico. Depois a solução aquosa desejada era gentilmente despejada dentro do frasco contendo a placa de teflon de forma a cobri-la completamente. O frasco era fechado e deixado na estufa a 37 °C por dois dias. Para as a medida de anisotropia de fluorescência com as GUV's, uma solução 10 mg /ml DMPG em clorofórmio + 0,5 mol% DPH era usada para formar o filme lipídico na placa de teflon.

Ajuste de pH. O pH do tampão Hepes, que possui um $pK = 7,55$, foi ajustado adicionando-se pequenas quantidades de NaOH (hidróxido de sódio) até que o pH de 7,4 fosse atingido. A leitura do pH foi feita com um medidor de pH Metler Toledo. Verificamos ser necessário o acréscimo de

aproximadamente 4 mM NaOH para atingir o pH de 7,4 em uma solução 10 mM Hepes. Esse valor é semelhante ao valor calculado segundo a equação de Handerson-Hasselbach. Dessa forma, o tampão Hepes 10 mM pH 7,4 contém 4 mM de íons Na^+ em solução, ou seja, sua força iônica é de 4 mM. Ao adicionarmos NaCl à solução, a força iônica desta aumenta. Considerando que a dissociação do NaCl é completa, o acréscimo na força iônica é igual à quantidade de NaCl adicionada. Portanto, ao adicionarmos, por exemplo, 2 mM NaCl à solução do tampão Hepes 10 mM, a força iônica total da solução será de 6 mM. O mesmo procedimento foi utilizado com KOH, LiOH e NH_4OH . Nas soluções em pH neutro a força iônica devido à presença de prótons e hidróxidos é praticamente desprezível (10^{-7} M). Para variar o pH da solução utilizamos água pura e adicionamos HCl para abaixar o pH ou NaOH para aumentá-lo. Quando desejado, NaCl era adicionado para ajustar a força iônica da solução.

Dosagem de fosfato. O método de dosagem de fosfato permite a verificação da concentração de fosfolipídios. Uma certa quantidade da dispersão lipídica deve ser colocada em tubos de ensaio, de forma que contenha entre 10 e 100 nmoles de fosfato (região de linearidade do método), lembrando que $1 \text{ mM} = 1 \text{ nmol}/\mu\text{l}$. Para a calibração, deve-se ter tubos com quantidades conhecidas de fosfato entre 10 e 100 nmoles. Para tal, pode-se usar tampão fosfato preparado com muita precisão. Os tubos de ensaio contendo as amostras lipídicas a serem analisadas e as referências de tampão fosfato eram colocados em uma estufa a alta temperatura para que a água fosse evaporada. Em seguida 0,4 ml de HClO_4 (ácido perclórico) concentrado (~70 %) era adicionado a cada tubo e a um tubo vazio (sem fosfato) que serviria de branco nas leituras óticas. Os tubos ficavam em um suporte metálico aquecido a 180° por 1 h, tempo suficiente para a mineralização completa dos fosfatos pelo ácido. Para impedir a evaporação do ácido, os tubos eram tampados com bolinhas de vidro. 1 ml de água Milli-Q era adicionada a cada tubo, seguido de 0,4 ml de molibdato de amônio 1,25 % (p/v) e 0,4 ml de ácido ascórbico 3 % (p/v). Cada tubo era agitado em um vórtex. Os tubos eram então deixados em água fervente por 10 minutos, depois do que apresentavam uma coloração que variava entre o amarelo e o azul dependendo da quantidade de fosfato mineralizada. Para a quantificação da quantidade de fosfato, espectros de absorção ótica eram obtidos de todas as amostras usando o tubo sem fosfato como branco. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro modelo HP 8452A. Os valores de absorbância em $\lambda = 796 \text{ nm}$ eram obtidos das referências de fosfato. Uma curva padrão era levantada com esses dados. Com isso, comparando com a absorbância das amostras lipídicas era possível saber a quantidade de nmoles em cada tubo de amostra, e portanto saber a concentração, desde que se soubesse o volume inicial. Em geral, três tubos diferentes de cada amostra lipídica eram preparados, e a concentração era determinada como a média dos três valores. Para as curvas

padrão de tampão fosfato 2 séries de tubos contendo 10, 30, 50, 70 e 90 nmoles eram preparadas. Espera-se uma absorbância da ordem de 0,5 para 50 nmoles de fosfato.

Medidas de Espalhamento de luz a 90° (turbidez). Foi utilizado um espectrofluorímetro Jobin Yvon-SPEX, modelo FL3-11. Em todas as medidas, a temperatura foi controlada com um banho térmico Forma Scientific 2006 e um termopar Fluke 51 K/J imerso na amostra medida. O caminho ótico utilizado foi de 2 mm. Foi utilizado $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 280 \text{ nm}$. Em amostras muito turvas maiores comprimentos de onda podiam ser utilizados para reduzir o efeito de espalhamento de luz.

Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). As medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura foram feitas em um aparelho Microcal VP. A velocidade de varredura foi de 20 °C/h para amostras acima de 1 mM DMPG e de 60 °C/h nas mais diluídas. Em uma amostra de 10 mM DMPG foi verificado que as curvas de DSC eram praticamente iguais se feitas com velocidades de varredura entre 1 e 60 °C/h (para varreduras de temperatura decrescente isso não ocorre, mas nesse trabalho só mostramos varreduras de temperatura crescente). No regime diluído não foi possível esse controle, devido à baixa resolução. As análises e subtrações de linha de base foram feitas no programa Microcal Origin 5.0 com um software adicional especial para análises calorimétricas. As medidas foram feitas na Unicamp, Campinas, SP (Prof. Dr. Watson Loh) e no MPIKG, Golm, Alemanha (Dr. Hans-Günther Döbereiner e Dr. G. Brezezinsky).

A medida de DSC fornece o calor específico C_p de uma amostra comparada a uma referência. Transições de fase são detectadas através de um pico de calor específico. A entalpia da transição (ΔH_m) é calculada pela integral do pico:

$$\Delta H_m = \int_{T_i}^{T_f} C_p(T) dT \quad (\text{III.1})$$

onde T_i e T_f são as temperaturas iniciais e finais da transição de fase. A transição de fase gel - cristal-líquido de bicamadas lipídicas é considerada uma transição de primeira ordem. A entalpia dessa transição depende basicamente da interação entre as cadeias hidrocarbônicas e entre cabeças polares vizinhas. De acordo com Marsh (1990), a componente da entalpia devido à interação hidrofóbica cresce linearmente com o número de carbonos da cadeia. A entalpia de lipídios com cadeias saturadas pode então ser escrita como:

$$\Delta H_m = 2n \Delta H_{\text{CH}_2} + \Delta H_{\text{HG}} \quad (\text{III.2})$$

onde n é o número de carbonos na cadeia, ΔH_{CH_2} é a entalpia por mol de cada grupo CH_2 adicionado e ΔH_{HG} é a contribuição das cabeças polares. Os valores dessas grandezas encontradas para lipídios são $\Delta H_{\text{CH}_2} \sim 0,5 \text{ kcal/mol}$ e $\Delta H_{\text{HG}} \sim -8 \pm 2 \text{ kcal/mol}$.

Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Banda-X. Os espectros de EPR foram obtidos em um espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica EMX da Bruker. A temperatura da amostra foi controlada, e variada, por um aparelho BVT-2000 da Bruker (Eurotherm), e a

temperatura na amostra verificada com um termopar Fluke 51 K/J. Para todos os espectros foi utilizada uma potência da microonda de 5 mW, valor para o qual não ocorre saturação do sinal nem um aumento considerável da temperatura da amostra devido à absorção da microonda pelas moléculas de água. A frequência da microonda utilizada era da ordem de 9,4 GHz. A amplitude de modulação do sinal foi de 0,7 G para os espectros de dCAT1, e de 1 G para os espectros de marcadores de spin de membrana. As amostras eram acomodadas em capilares de quartzo.

Banda-Q e Banda-L. Os espectros de EPR em Banda-Q e Banda-L foram obtidos em um Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica E 109 da Varian (São Carlos, SP, Prof. Dr. Otaciro R. Nascimento). A temperatura da amostra foi mantida e controlada por unidade de fluxo de nitrogênio da Varian. A potência da microonda utilizada foi de 10 mW, e a amplitude de modulação usada variou entre 1,25 e 1,6 G. A frequência da microonda utilizada foi de 35 GHz para a Banda-Q e de 1,28 GHz para a Banda-L.

Fig. III.2 - Espectros de EPR do marcador CAT1 e de seu análogo deuteriado dCAT em solução aquosa à 50 °C. Varredura total: 50 G. A largura de linha diminui bastante com a substituição dos hidrogênios do anel por deutérios, devido à menor interação hiperfina do elétron desemparelhado com o deutério.

Medidas de fluorescência e anisotropia de fluorescência estáticas. As medidas de anisotropia de fluorescência estática foram feitas em um espectrofluorímetro Jobin Yvon-SPEX, modelo FL3-11. Em todas as medidas, a temperatura foi controlada com um banho térmico Forma Scientific 2006 e um termopar Fluke 51 K/J imerso na amostra medida. O caminho ótico utilizado foi de 2 mm ou de 1 cm. Os comprimentos de onda de excitação e emissão, usados para o DPH, foram 359 nm e 428 nm, respectivamente. A anisotropia é definida de acordo com a Eq. II.32: $A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}$.

Entretanto, devido à sensibilidade do aparelho à luz polarizada em diferentes direções, a anisotropia medida é de fato dada por:

$$A = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (\text{III.3})$$

onde os índices de V e H referem-se à direção vertical e horizontal de polarização. O primeiro índice representa a orientação de excitação e o segundo de emissão. O fator $G = I_{HV}/I_{HH}$ corrige para a diferente sensibilidade do detetor à luz polarizada vertical e horizontalmente. As medidas foram feitas no nosso laboratório ou no Instituto Max Planck de Colóides e interfaces em Golm, Alemanha.

Medidas de anisotropia de fluorescência com resolução temporal. A anisotropia de fluorescência com resolução temporal foi medida com um espectrômetro Edinburgh FL900 com um laser de titânio-safira Tsunami 3950 Spectra Physics.

Espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS). As medidas foram feitas na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP) (Kellermann et al., 1997), com um detetor unidimensional sensível a posição. As amostras eram acomodadas em suportes planos com janelas de mylar. O comprimento de onda utilizada foi de $\lambda = 1,6 \text{ \AA}$, e a distância amostra-detetor usada foi de 62,65 cm. Os dados foram normalizados pelo tempo de aquisição (de 20' a 40'), contagem total do monitor (para compensar oscilações na linha do feixe) e corrigidas pela resposta do detetor e atenuação da amostra. O espalhamento devido ao tampão foi subtraído de todas as curvas de SAXS.

Microscopia Ótica por contraste de fase. Para visualização das vesículas foi usado um microscópio invertido Axyovert Zeiss com uma objetiva de 40x do laboratório do Prof. Hans-Günther Döbereiner no Max Planck (Golm, Alemanha). A solução contendo as vesículas era colocada em uma câmara de teflon coberta com vidro e selada com graxa de silicone. A câmara era acomodada em um suporte metálico termalizado por um banho térmico. Quando utilizávamos o método de eletroformação, os eletrodos eram inseridos no interior da câmara, e as vesículas formavam-se direto no campo de visão do microscópio. A imagem das vesículas era gravada por uma câmara de vídeo Hamamatsu e digitalizada em um estação de trabalho Silicon Graphics.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como será discutido no decorrer do trabalho, o comportamento térmico do DMPG, em uma certa faixa de concentração lipídica e baixa força iônica, é caracterizado pela existência de um intervalo de temperatura durante o qual ocorre a transição de fase gel - cristal-líquido. Essa região de transição será chamada também de fase intermediária, principalmente pelo fato de ter características particulares, tais como baixo espalhamento de luz e de raio-X de baixo ângulo, como será aqui mostrado, e alta viscosidade (Heimburg & Biltonen, 1994) e condutividade elétrica (Riske et al., 1997). A fase intermediária é delimitada por duas temperaturas, que chamamos de $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$, marcando o início e o final do processo de fusão das cadeias hidrocarbônicas, respectivamente. Os processos que ocorrem em $T_{m^{on}}$, em $T_{m^{off}}$ e na região de transição são reversíveis, verificado com todas as técnicas apresentadas nesse trabalho. O intervalo entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ diminui gradualmente com o aumento da força iônica e da concentração lipídica.

Entretanto, descobrimos que, abaixo de uma certa faixa de concentração lipídica, em torno de 0,4 mM DMPG, a extensa região de transição entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ desaparece, sendo substituída por uma transição de fase centrada em uma única temperatura T_m . Ficou claro, então, que o comportamento do DMPG em baixa força iônica pode ser dividido em dois regimes: baixa concentração lipídica ($c < 0,4 \pm 0,2$ mM DMPG) e alta concentração lipídica ($0,7 \text{ mM} < c < 800 \text{ mM}$). Por volta de 1 M DMPG resultados preliminares indicam que a fase intermediária também desaparece. Entretanto, essa região não será discutida no presente trabalho. Os resultados serão divididos em duas grandes seções: dispersões concentradas, que foram bastante estudadas (Riske et al., 1997, 1999 e 2001) e dispersões diluídas, em fase final de discussão. Alguns dos resultados aqui apresentados ainda não estão completamente elucidados e são caminhos que podem ser continuados no futuro.

IV.1 - DISPERSÕES CONCENTRADAS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos com dispersões de DMPG no que chamamos de regime concentrado, quando, em baixa força iônica, o DMPG apresenta a fase intermediária entre temperaturas denominadas $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$. Durante toda essa seção, será mostrada a dependência do comportamento do DMPG com a força iônica. Para tal, fizemos dispersões de DMPG utilizando soluções tamponadas com adição de diferentes quantidades de NaCl. Entretanto, apresentaremos também resultados obtidos com DMPG em água pura, que

mostraram-se muito complexos. Esses resultados em água, embora muito interessantes, ainda estão longe de serem compreendidos. Este é certamente um caminho que pode ser seguido no futuro, e portanto, optamos por deixar os resultados obtidos relatados no presente trabalho.

Primeiramente, serão apresentados os resultados obtidos com espalhamento de luz a 90° e calorimetria diferencial de varredura (DSC), que detectam e delimitam claramente a fase intermediária. Em seguida, resultados obtidos com a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), aplicada a marcadores de spin localizados no interior e na superfície da bicamada lipídica, revelam propriedades de microviscosidade e micropolaridade em diferentes posições da membrana de DMPG, além de uma estimativa do potencial eletrostático de superfície Ψ_0 . Para complementar as informações obtidas com os marcadores de spin, serão mostrados resultados de anisotropia de fluorescência de uma sonda localizada no interior da membrana. Depois serão mostrados os resultados obtidos com espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS). Por último, serão mostradas imagens de vesículas gigantes de DMPG obtidas por microscopia ótica.

IV. 1.1 - Espalhamento de luz

Dispersões de vesículas neutras ou *zwitteriônicas* são geralmente turvas, pois como nesses sistemas é comum a formação de vesículas multilamelares em meio aquoso, o tamanho dessas estruturas pode ser maior ou da ordem do comprimento de onda da luz visível. Além disso, a membrana lipídica possui um índice de refração maior que o da água (Disalvo, 1991). O espalhamento de luz depende do incremento do índice de refração com a concentração lipídica (dn/dc). Após a transição de fase gel - cristal-líquido de bicamadas lipídicas, é esperado que ocorra uma pequena diminuição em dn/dc , devido à mudança no empacotamento da bicamada, causando, portanto, uma pequena diminuição na turbidez da amostra. A Fig. IV. 1 mostra o espalhamento de luz de dispersões lipídicas de DMPG em alta força iônica (100 mM NaCl) e do fosfolípido *zwitteriônico* DMPC em função da temperatura. A diminuição na turbidez medida na amostra de DMPG em alta força iônica pôde ser explicada em função da diminuição de dn/dc em T_m , medida experimentalmente (Riske et al., 1997).

Fig. IV.1 - Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de 10 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 100 mM NaCl e de 10 mM DMPC em 10 mM Hepes pH 7,4 em função da temperatura. $\lambda = 280$ nm.

Dispersões de DMPG em baixa força iônica, no entanto, apresentam um perfil de espalhamento de luz com a temperatura muito diferente do apresentado na Fig. IV.1, com a existência de uma fase opticamente transparente entre duas fases turvas. A Fig. IV.2 mostra o perfil de espalhamento de luz obtido para 10 mM DMPG em tampão Hepes + 2 mM NaCl (força iônica = 6 mM, conforme discutido na seção III.2).

Fig. IV.2 - Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de 10 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl em função da temperatura. $\lambda = 280$ nm. As transições T_m^{on} e T_m^{off} , definidas como o valor médio das variações de espalhamento de luz com a temperatura, estão indicadas por setas na figura.

Existem, portanto, duas mudanças bruscas na quantidade de luz espalhada com a temperatura. Em $T_m^{\text{on}} = 17,4$ °C ocorre um grande decréscimo na intensidade de luz espalhada, e em $T_m^{\text{off}} = 38$ °C a turbidez da amostra é parcialmente recuperada. Essas temperaturas foram definidas como o ponto médio das variações de turbidez medidas com a variação da temperatura. Como será mostrado no decorrer do trabalho, T_m^{on} marca o início do processo de fusão das cadeias hidrocarbônicas, que só será completado acima de T_m^{off} . Entretanto, a medida de espalhamento de luz apresenta grandes variações tanto em T_m^{on} quanto em T_m^{off} , caracterizando a fase intermediária como uma região de transparência da amostra. O incremento no índice de refração (dn/dc), medido em dispersões de DMPG nessa baixa força iônica, apresenta um decréscimo gradual entre T_m^{on} e T_m^{off} , não podendo, portanto, explicar o grande decréscimo de espalhamento em T_m^{on} e depois seu aumento em T_m^{off} (Riske et al., 1997). Entretanto, podem haver outras causas para a diminuição no espalhamento de luz, tais como mudanças de tamanho e massa molecular dos centros espalhadores ou variações da interação entre eles. Medidas de espalhamento de luz a vários ângulos foram feitas durante o trabalho de mestrado, indicando um possível aumento de repulsão eletrostática entre os centros espalhadores na fase intermediária (Riske et al., 1997).

Foi encontrada uma dependência do valor de T_m^{off} com a preparação da amostra e com o estoque de DMPG utilizado, seu valor podendo variar de até 5 °C. Por outro lado, T_m^{on} é muito mais reprodutível. É importante ressaltar que todos os resultados aqui apresentados com espalhamento de luz a 90° são completamente análogos a medidas de turbidez com um espectrofotômetro, feitas nas mesmas amostras.

A janela de baixo espalhamento apresentada na Fig. IV.2, existe somente para uma faixa de baixa força iônica, como ilustra a Fig. IV.3.

Fig. IV.3 - Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de 10 mM DMPG em água e em 10 mM Hepes pH 7,4 em presença de diferentes concentrações de NaCl, em função da temperatura. $\lambda = 280$ nm.

Em água pura, dispersões de DMPG permanecem transparentes em todo o intervalo de temperatura estudado. Na região de T_m^{on} existe um decréscimo na turbidez, embora não de forma brusca. Para concentrações crescentes de NaCl adicionado ocorre um estreitamento da região transparente, com um pequeno aumento do valor de T_m^{on} e uma grande diminuição do valor de T_m^{off} , até que em alta força iônica (100 mM NaCl) a amostra não passa pela região transparente e apresenta apenas uma pequena diminuição em T_m , como já havia sido mostrado na Fig. IV.1. A região transparente também diminui com o aumento da concentração lipídica (Riske, 1997).

É importante deixar claro que a existência da fase intermediária e seu desaparecimento com a adição de sal, não é uma característica particular de DMPG em presença de NaCl (cloreto de sódio). Vimos que a adição de KCl (cloreto de potássio), LiCl (cloreto de lítio), NH₄Cl (cloreto de amônio), e uréia também tornam a região de transição mais estreita, embora a mesma quantidade desses diferentes sais resulte em intervalos diferentes entre T_m^{on} e T_m^{off} . Para um estudo mais completo do efeito de diferentes sais no comportamento térmico do DMPG, seria necessário correlacionar os efeitos de cada sal a suas diferentes propriedades de solvatação, efeito estruturador ou desestruturador de água, e diferenças na constante de associação desses íons com os grupos fosfato do DMPG. Além disso, como o sódio é o contra-íon do DMPG que utilizamos, seria necessário obter o DMPG tendo como contra-íon esses outros cátions para um estudo

completo da dependência do comportamento deste lipídio com os diferentes sais. De uma forma geral, vimos que a eficiência desses íons em suprimir a fase intermediária se dá na seguinte ordem: uréia < Na⁺ < K⁺ < Li⁺ < NH₄⁺. O efeito de diferentes íons no comportamento térmico do DMPG foi visto por espalhamento de luz no trabalho de mestrado (Riske, 1997), e com os marcadores de spin 16-PCSL e dCAT1 no presente trabalho (resultados não mostrados).

A existência dessa região de baixo espalhamento parece estar ligada à presença de cargas na superfície das bicamadas de DMPG, já que com o aumento da concentração de sal, e portanto da blindagem das cargas, esse comportamento estranho desaparece, e o DMPG apresenta um comportamento térmico usual, semelhante ao observado com DMPC, ambos mostrando um pequeno decréscimo na turbidez em T_m.

IV.1.2 - Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) mede o calor absorvido ou liberado por uma amostra quando a temperatura é variada a pressão e volume constantes. Dessa forma, essa técnica detecta a presença de transições de fase pela existência de picos de calor específico (C_p). As transições de fase de dispersões lipídicas têm sido amplamente estudadas por DSC (Blume, 1991). Além de detectar a temperatura na qual a transição ocorre, é possível obter a entalpia da transição (integral da área sob o pico) e avaliar sua cooperatividade (relacionada à largura do pico).

A transição de fase gel - cristal-líquido é detectada por calorimetria como um pico muito intenso e estreito centrado em T_m . A entalpia da transição principal (ΔH_m) depende basicamente do comprimento da cadeia e da interação entre as cabeças polares (Eq. III.1 e III.2). A Fig. IV.4 mostra resultados de DSC obtidos com DMPG em alta força iônica e DMPC.

Fig. IV.4 - Varreduras de DSC de 10 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 500 mM NaCl e de 1,5 mM DMPC em 10 mM Hepes pH 7,4. Velocidade de varredura: 20 °C/h.

Em presença de alta força iônica (500 mM NaCl) o fosfolípido aniônico DMPG apresenta um comportamento térmico muito similar ao do DMPC, ambos apresentando um pico muito intenso e estreito centrado em $T_m = 23$ °C. O pico menos intenso e em temperatura mais baixa é associado à pré-transição, onde a superfície da membrana é suposta a apresentar uma ondulação, com as cadeias hidrocarbônicas permanecendo na fase gel. Essa transição, em geral, está presente somente em lipídios com uma grande área por cabeça polar.

Tem-se assumido na literatura que o comportamento do DMPG e DMPC são similares (Marsh, 1990), assim como também foi visto por espalhamento de luz na Fig. IV.1. Entretanto, é necessário deixar claro, que essa semelhança só é observada em pH neutro e nessa faixa de alta força iônica, como será mostrado ao longo do trabalho, embora muitos estudos não deixem isso explícito e não deixem claro que condições de força iônica estão sendo utilizadas.

As temperaturas de transição principal T_m e de pré-transição T_p e suas respectivas entalpias (ΔH_m e ΔH_p), calculadas da Fig. IV.4, estão mostradas na Tabela IV.1.

Tabela IV.1

	T_p	ΔH_p	T_m	ΔH_m
DMPC	13,5 °C	0,8 kcal/mol	23,6 °C	5,0 kcal/mol
DMPG + 500 mM NaCl	14,4 °C	0,8 kcal/mol	23,4 °C	5,6 kcal/mol

O erro no cálculo das entalpias foi estimado em 0,5 kcal/mol (ΔH_p) e 1 kcal/mol (ΔH_m).

Os valores de T_m e T_p encontrados, assim como as entalpias das duas transições, estão de acordo com dados da literatura (Marsh, 1990). É interessante notar a grande semelhança entre os valores de T_m , T_p , ΔH_p e ΔH_m encontrados para o DMPG em alta força iônica e o para DMPC.

Em baixa força iônica, no entanto, o DMPG apresenta um perfil calorimétrico particular e bastante complexo. Na Fig. IV.5 estão comparados os resultados de espalhamento de luz e DSC feitos em uma mesma amostra de 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl.

Fig. IV.5 - Varredura de DSC (direita, em vermelho) e espalhamento de luz a 90° (esquerda, em preto) de uma mesma amostra de 10 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. Velocidade de varredura: 20 °C/h. $\lambda = 280$ nm.

O perfil de DSC obtido com DMPG em baixa força iônica representa um comportamento térmico muito mais complexo do que o obtido em alta força iônica ou com lipídios neutros (Fig. IV.4), pois vários picos estão presentes. Em torno de 12 °C um pico duplo pode ser atribuído à pré-transição com uma entalpia $\Delta H_p = 0,8 \pm 0,4$ kcal/mol, semelhante à obtida em alta força iônica e com DMPC. O grande decréscimo na turbidez da amostra em torno de $T_{m^{on}} = 17,7$ °C relaciona-se a um pico estreito no calor específico ($\Delta H^{on} \sim 1$ kcal/mol). Na região de baixo espalhamento existem alguns picos largos superpostos. O aumento da turbidez da amostra em torno de $T_{m^{off}} = 34$ °C coincide com um pico largo de DSC ($\Delta H^{off} \sim 0,8$ kcal/mol). Fazendo a integral da área sobre a região correspondente à fase intermediária (entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$), uma entalpia de $\Delta H_m = 5 \pm 1$ kcal/mol é obtida, similar à calculada para o DMPG em alta força iônica quando a transição ocorre em uma estreita faixa de temperatura em torno de T_m . Esse resultado indica que a transição de fase ocorre nesse grande intervalo de temperatura, durante o qual a amostra é transparente, e por partes, sendo que o primeiro evento em $T_{m^{on}}$ é bastante cooperativo. É importante ressaltar que os picos largos entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ estavam presentes em todas as amostras medidas, assim como em varreduras de diferentes velocidades (entre 1 e 60 °C/h) e também em varreduras decrescentes de temperatura. Na Fig. IV.5, o espalhamento de luz apresentou uma mudança mais brusca em $T_{m^{off}}$ do que em $T_{m^{on}}$, um pouco diferente portanto do observado na Fig. IV.2. O aumento de espalhamento de luz um pouco antes de $T_{m^{on}}$ aconteceu em quase todas as amostras. Isso talvez indique um processo que dispara a cadeia de eventos entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$, embora ainda não tenhamos uma explicação para tal fenômeno.

Obtivemos varreduras de DSC para diferentes forças iônicas, como mostrado na Fig. IV.6.

Fig. IV.6 - Varreduras de DSC de 10 mM DMPG em diferentes forças iônicas. As curvas de DMPG em água pura e em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl foram multiplicadas por 8 e 4 respectivamente. As curvas estão deslocadas da origem ($C_p = 0$) para melhor visualização. Velocidade de varredura: 20 °C/h.

Quanto menor a força iônica, mais complexo parece ser o perfil calorimétrico do DMPG. Em água pura, $T_{m^{on}}$ parece ser mais larga e ocorrer a uma menor temperatura. Não está claro se existe pré-transição nessa condição. O pico largo característico de $T_{m^{off}}$ não é observado, concordando com o perfil de espalhamento, onde não existe aumento da turbidez nas temperaturas monitoradas (Fig. IV.3). Desde já, fica evidente que o comportamento do DMPG em água pura é bastante complexo.

O aumento da força iônica claramente diminui o intervalo de temperatura entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$, até que em 500 mM NaCl, nenhum comportamento anômalo é observado, como já havia sido mostrado na Fig. IV.4. Em presença de 100 mM NaCl, condição para a qual não existe região transparente por espalhamento de luz (Fig. IV.1), a curva de DSC mostra um pequeno resquício do comportamento anômalo, pois o pico é um pouco mais largo do lado direito. A entalpia da transição é praticamente independente da força iônica, desde que toda a região de transição seja integrada ($\Delta H_m \sim 5$ kcal/mol).

Foram feitas, também, experiências em diferentes concentrações lipídicas (Fig. IV.7), e foi visto que o aumento da concentração de DMPG tem um efeito similar ao do aumento da concentração de sal, já que o intervalo entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ também diminui. Esse efeito pode ser consequência do aumento da concentração de sódio, contra-íon do DMPG, com o aumento da concentração lipídica. Esse é mais um fenômeno apresentado neste trabalho que necessita de um

maior estudo, tanto experimental quanto teórico. As entalpias de transição medidas nas diferentes concentrações são todas da ordem de 5 kcal/mol.

Fig. IV.7 - Varreduras de DSC de diferentes concentrações de DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. As curvas estão deslocadas da origem ($C_p = 0$) para melhor visualização. Velocidade de varredura: 20 °C/h.

A existência da região de transição, portanto, está restrita a uma certa faixa de baixa força iônica e de concentração lipídica, embora não tenhamos observado a ausência da fase intermediária até 800 mM DMPG, quando o intervalo de temperatura entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ é de apenas 2 °C (resultados não mostrados). Dados do comportamento do DMPG em função da concentração, semelhantes aos aqui apresentados, já haviam sido mostrados por Salonen et al., 1989 e Heimburg & Biltonen, 1994.

Os dados de DSC mostram que o início do processo de fusão das cadeias é marcado por um pico de calor específico bem cooperativo, que coincide com a brusca queda de espalhamento de luz, enquanto que o aumento da turbidez em $T_{m^{off}}$ é acompanhado por um pico de calor específico menos cooperativo. Além desses picos que delimitam o início e o final da transição de fase, vemos a clara existência de processos que ocorrem ao longo de toda a fase intermediária, reforçando a idéia de uma transição de fase que se estende por todo esse intervalo de temperatura. É interessante notar que esses processos não são contínuos, mas caracterizados por picos definidos.

IV.1.3 - Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) aplicada a sondas paramagnéticas, tem sido vastamente empregada no estudo de membranas lipídicas (Freed, 1976; Berliner & Reuben, 1989; Biaggi et al., 1997; Alonso et al., 2000; Fernandez & Lamy-Freund, 2001). O grupo nitróxido, uma das sondas mais usadas, pode ser ligado a diferentes posições da cadeia hidrocarbônica, ou na região da cabeça polar, monitorando portanto diferentes regiões da bicamada. Além disso, sondas externas podem revelar propriedades da superfície lipídica, como o potencial eletrostático de superfície Ψ_o .

A característica mais marcante da transição gel - cristal-líquido é a mudança que ocorre no empacotamento da bicamada. Na fase gel, quando as cadeias estão na configuração *all-trans*, a bicamada apresenta um alto empacotamento, enquanto que na fase fluida, as cadeias podem apresentar dobras *gauche* (Fig. I.2b), e, portanto, a área por lipídio aumenta bastante, aumentando consideravelmente a fluidez da membrana. Técnicas espectroscópicas, tais como EPR e Fluorescência (seção IV.1.4) aplicadas a sondas inseridas no interior da membrana, têm sido utilizadas para monitorar propriedades de bicamadas lipídicas, tais como microviscosidade e micropolaridade.

Quanto mais interno localiza-se o marcador de spin, maior sua liberdade de movimento, devido ao perfil de microviscosidade de bicamadas lipídicas. Além disso, o espectro de EPR de marcadores localizados na região central da bicamada é muito sensível à mudança de empacotamento que ocorre na transição de fase principal. No trabalho de mestrado, utilizamos marcadores de spin localizados nas posições 5 e 12 da cadeia hidrocarbônica (Riske et al., 1997). No presente trabalho, usamos marcadores mais internos, nas posições 14 e 16, por serem mais sensíveis às pequenas mudanças na mobilidade que ocorrem ao longo da fase intermediária.

Para estudar a superfície lipídica, utilizamos o marcador catiônico aquo-solúvel deuteriado dCAT1. Devido à sua carga positiva e à ausência de regiões muito hidrofóbicas, esse marcador particiona-se entre a superfície lipídica e o meio aquoso. Foi possível, com a aplicação de um modelo de dois sítios, fazer uma estimativa do potencial de superfície Ψ_o de bicamadas de DMPC em diferentes forças iônicas (Riske et al., 1999). O fato desse marcador ser deuteriado diminuiu consideravelmente o alargamento gaussiano das linhas (Fig. III.2), possibilitando um cálculo muito preciso dos tempos de correlação da sonda e da polaridade na superfície lipídica.

Os resultados apresentados serão divididos entre os obtidos com marcadores de membrana (14 e 16-PCSL) e de superfície (dCAT1).

i) Interior da bicamada lipídica

Utilizamos basicamente dois marcadores de spin derivados de um fosfolípido com duas cadeias saturadas (C_{16} e C_{18}) e uma colina na cabeça polar. São eles o 14-PCSL e o 16-PCSL (Fig. III.1), nos quais o grupo nitróxido está ligado ao 14º e 16º carbonos da cadeia acila mais longa (C_{18}), respectivamente. Esses marcadores derivados de PC, por possuírem uma cabeça polar grande, apresentam um bom ancoramento em membranas lipídicas (Turchiello et al., 2000). O marcador 16-PCSL, em particular, mostrou-se muito interessante, por apresentar um sinal particular de EPR na fase intermediária.

a) 14-PCSL

O marcador de spin 14-PCSL mostrou de forma evidente que a fase intermediária é caracterizada por uma mobilidade intermediária entre os valores das fases gel e fluida. Alguns espectros de 14-PCSL em DMPC, que apresenta $T_m = 23,6^\circ\text{C}$ (Fig. IV.4), e em DMPG em baixa força iônica estão mostrados na Fig. IV.8.

Fig. IV.8 - Espectros de EPR de 0,3 mol% 14-PCSL incorporado em 10 mM DMPC (esquerda) e 50 mM DMPG (direita) em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. Varredura total dos espectros: 100 G. As setas indicam a T_m do DMPC e T_m^{on} e T_m^{off} do DMPG.

É possível notar uma grande diferença entre os espectros de DMPC a 23 °C e 24 °C, refletindo a diferença entre o empacotamento da membrana nas fases gel e fluida. Em bicamadas de DMPG, vemos a existência de uma região de mobilidade intermediária entre $T_{m^{on}} = 18,5$ °C e $T_{m^{off}} = 30,5$ °C, principalmente se observarmos a maior assimetria do pico da região de campo alto nesse intervalo de temperatura. A fase fluida, onde os três picos são mais simétricos, aparece somente acima de 30 °C. Na região de transição não foi detectada a coexistência de marcadores em domínios fluidos e rígidos. Entretanto, devido à não tão compacta fase gel de cadeias com apenas 14 carbonos, os marcadores podem estar sentindo domínios de diferentes mobilidades na escala de tempo do EPR (da ordem de 9 ns), o que levaria à média dos dois sinais. Espectros de marcadores nas posições 5, 7, 9 e 12 da bicamada também não apresentaram espectros obviamente compostos na fase intermediária (Riske et al., 1997 e Biaggi et al., 1997).

Dos espectros de EPR foram medidos parâmetros relacionados à ordem e/ou imobilidade do grupo nitróxido no interior das bicamadas. Um dos parâmetros que mostrou-se bem sensível à mudança de empacotamento durante a transição gel - cristal-líquido, foi a razão entre as alturas do pico central e de campo baixo (h_0/h_{+1} , mostrado no canto superior da Fig. IV.9b). Na Fig. IV.9a está mostrado o parâmetro h_0/h_{+1} em função da temperatura, e na Fig. IV.9b os mesmos dados estão apresentados em função de $T - T_{m^{on}}$ para o DMPG e $T - T_m$ para o DMPC.

Fig.IV.9 - Razão entre os picos central e de campo baixo (h_0/h_{+1}) medidos nos espectros de EPR de 0,3 mol% 14-PCSL incorporados em 10 mM DMPC e em 50 mM DMPG em 10 mM Hepes + 2 mM NaCl, a) em função da temperatura, e b) em função de $T - T_{m^{on}}$ para o DMPG ($T_{m^{on}} = 18,5$ °C, Fig. IV.7) e $T - T_m$ para o DMPC ($T_m = 23,6$ °C, Fig. IV.4). No canto superior direito está mostrado como as amplitudes h_0 e h_{+1} são medidas nos espectros de EPR.

A maneira de apresentar os dados na Fig. IV.9b, em função de $T - T_{m^{on}}$, torna bem evidente a região de mobilidade intermediária apresentada pelo DMPG na região de transição, em comparação ao DMPC, que apresenta somente uma transição brusca em T_m . O valor de $T_{m^{on}}$ foi definido de acordo com a curva de DSC (Fig IV.7). Entretanto, o início do decréscimo na microviscosidade da membrana parece ocorrer 1 ou 2 °C acima do pico estreito que caracteriza $T_{m^{on}}$ por calorimetria. É possível que esse pico de DSC, que chamamos de $T_{m^{on}}$, represente algum processo que dispare a transição gel - fluido. Resultados semelhantes foram obtidos em 10 mM DMPG, entretanto com valores um pouco distintos para $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$, de acordo com o observado por DSC.

Como a região de mobilidade intermediária fica muito mais clara quando os parâmetros medidos dos espectros estão em função de $T - T_{m^{on}}$, colocamos nossos antigos dados com os marcadores 5- e 12-PCSL incorporados em DMPG em diferentes forças iônicas, obtidos no mestrado, também dessa forma (Riske et al., 1997). O gráfico, mostrado na Fig. IV.10, mostra que essa maneira de apresentar os resultados ressalta muito mais a existência da região de transição, mesmo que com esses marcadores menos internos que o 14-PCSL, o efeito não seja tão marcante.

Fig.IV.10 - a) Desdobramento hiperfino máximo (A_{max}), medido de espectros de 1 mol% 5-PCSL, e b) largura de linha do primeiro pico (ΔH_{+1}), medido de espectros de 1 mol% 12-PCSL, incorporados em 10 mM DMPG em diferentes forças iônicas. O eixo-x representa $T - T_{m^{on}}$, com $T_{m^{on}}$ diferente para cada força iônica (obtidos dos perfis de DSC).

b)16-PCSL

DMPG em função da força iônica

O estudo das dispersões de DMPG com o marcador 16-PCSL mostrou um aspecto muito interessante da fase intermediária. Esse marcador foi o único que apresentou um espectro de EPR obviamente distinto na região de transição, entre T_m^{on} e T_m^{off} . Enquanto os espectros de outros marcadores revelaram apenas uma mobilidade intermediária nessa faixa de temperatura, o espectro do 16-PCSL mostrou a clara existência de dois picos na região de campo alto. A presença desse sinal característico é restrita à fase intermediária, e com o aumento da força iônica diminui a faixa de temperatura na qual os dois picos estão presentes. Em alta força iônica (100 mM NaCl) e no fosfolípido DMPC, esse sinal não é observado a nenhuma temperatura.

A explicação para a existência desses dois picos ainda não está muito clara, e esforços têm sido feitos pelo estudante de doutorado Roberto M. Fernandez para tentar simular esses espectros utilizando um programa computacional desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. J. Freed (Cornell, NY, EUA). Duas são as hipóteses para a existência dos dois picos. Uma seria a coexistência de dois sinais distintos, que só seriam claramente distinguíveis no terceiro pico, representando dois microambientes com diferentes viscosidade e polaridade. Entretanto, a possibilidade de um sinal único não pode ser descartada. Neste caso, simulações dos espectros indicam um movimento do marcador que não seria em torno do eixo-z, como o apresentado, em geral, por marcadores desse tipo. Estamos tentando elucidar a natureza desse espectro através de simulações e de correlação dos espectros em diferentes frequências de microonda (Banda-L e Banda-Q), juntamente com o aluno de doutorado Roberto M. Fernandez e com o Prof. Dr. Otaciro R. Nascimento (IFSC-USP).

A Fig. IV.11 mostra os espectros obtidos com 0,2 mol% 16-PCSL incorporado em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl.

10 mM DMPC em hepes + 2 mM NaCl
16-PCSL

Fig. IV.11 - Espectros de EPR de 0,2 mol% 16-PCSL incorporado em 10 mM DMPC em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. Varredura total dos espectros: 80 G. As setas marcam o início e o final da transição de fase. As linhas tracejadas indicam a posição do terceiro pico a 15 °C (fase gel) e a 50 °C (fase fluida).

Os espectros abaixo de 20 °C mostram a existência de uma fase gel. Entre 20 °C e 32 °C os espectros apontam a clara presença de dois picos na região de campo alto. Com o aumento da temperatura, o pico mais interno desses dois picos desloca-se para valores maiores do campo magnético, enquanto o outro pico (mais externo) não muda sua posição. Os espectros obtidos na fase intermediária não são uma soma dos espectros nas fases gel (15 °C) e fluida (35 °C). Acima de $T_m^{\text{off}} = 33,5$ °C os espectros indicam membranas na fase fluida.

A presença dos dois picos entre T_m^{on} e T_m^{off} foi verificada também com os marcadores 16-SASL e 16-MESL (cujas estruturas químicas estão esquematizadas na Fig. III.1), que só possuem uma cadeia hidrocarbônica, embora de forma muito menos definida neste último. A Fig. IV.12 mostra espectros a 25 °C, portanto na fase intermediária, obtidos com 16-PCSL, 16-SASL e 16-MESL. Nessa mesma figura estão mostrados os valores do desdobramento hiperfino a_o medidos entre 40 e 50 °C, quando os espectros apresentam um movimento rápido e é possível medir esse parâmetro como a distância entre os picos. Os valores de a_o estão diretamente ligados à polaridade do meio, como discutido na teoria de EPR (Tabela II.2). Entretanto, vale lembrar que a

micropolaridade medida a altas temperaturas pode não refletir a micropolaridade em outras temperaturas.

Fig. IV.12 - Espectros de 0,2 mol% 16-MESL, 16-PCSL e 16-SASL em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl a 25 °C. Varredura total: 80 G. A figura no canto superior esquerdo mostra os valores do desdobramento hiperfino a_o medido dos espectros desses três marcadores a 40, 45 e 50 °C.

Na Tabela IV.2 estão mostrados os valores de a_o medidos de espectros de 5-, 12- e 16-PCSL em bicamadas de DMPG, e de 5-, 12- e 16-SASL em solução aquosa, onde fica evidente que quanto mais interna é a posição do grupo nitróxido, menor o valor de a_o , e portanto da polaridade do microambiente. É importante lembrar que esses valores de a_o indicam uma posição média dos marcadores na membrana, já que estes apresentam flutuações verticais. Entretanto, fica claro que grupos nitróxido ligados a diferentes posições da cadeia acila monitoram de fato diferentes microregiões da bicamada lipídica.

Tabela IV.2

marcador	a_o (G)
5-, 12- e 16-SASL em água*	$15,78 \pm 0,01$
5-PCSL em DMPG	$15,03 \pm 0,01$
12-PCSL em DMPG	$14,52 \pm 0,01$
16-PCSL em DMPG	$14,41 \pm 0,01$

* os valores em solução aquosa têm que ser medidos com os marcadores derivados de ácido esteárico, pois os derivados de PC não apresentam partição relevante em meio aquoso. Valores obtidos de Fernandez & Lamy-Freund, 2001.

Os valores de a_0 apresentados pelos marcadores 16-PCSL, 16-SASL e 16-MESL, mostrados na Fig. IV.12, embora distintos entre si, indicam regiões centrais da bicamada. Os grupos nitróxido dos marcadores 16-PCSL e 16-SASL encontram-se em regiões muito próximas, já que sentem micropolaridades semelhantes. Já o centro paramagnético do marcador 16-MESL, encontra-se em uma posição menos interna da bicamada, em um microambiente com uma polaridade um pouco maior (comparável ao 12-PCSL na Tabela IV.2). Foi mostrado que, em membranas de DMPG, os marcadores derivados do metilester do ácido esteárico (MESL) localizam-se em posições mais internas que os derivados de PC (PCSL) e de ácido esteárico (SASL) (Turchiello et al., 2000). O fato do grupo nitróxido do 16-MESL estar localizado em uma posição menos interna da bicamada, pode indicar que ele atravessa o centro da bicamada, localizando-se em uma região mais polar, mas localizada na outra monocamada. Olhando a Fig. IV.12 fica claro, então, que a aparição desses dois picos está restrita a centros paramagnéticos localizados em uma pequena região no centro da bicamada.

Obtivemos espectros de 16-PCSL em dispersões de DMPG em outras forças iônicas também. Na Fig. IV.13 estão mostrados espectros de 16-PCSL em DMPG nos dois extremos de força iônica estudados: água pura (Fig. IV.13a) e 100 mM NaCl (Fig. IV.13b). Mais uma vez, vemos que o DMPG em água pura apresenta um comportamento muito complexo. Os dois picos estão presentes mesmo a 10 °C e só parecem desaparecer por volta de 50 °C. Em alta força iônica (Fig. IV.13b) não foi observada a presença de dois picos a nenhuma temperatura e a transição ocorre claramente entre 22 e 25 °C.

Fig. IV.13 - Espectros de EPR de 0,2 mol% 16-PCSL incorporado em 10 mM DMPG em a) água pura e b) 10 mM Hepes pH 7,4 + 100 mM NaCl. Varredura total dos espectros: 80 G.

A Fig. IV.14 mostra os espectros de 16-PCSL incorporados em DMPG em diferentes condições de força iônica, e em DMPC, em três temperaturas distintas: 15, 25 e 50 °C.

A 15 °C todos os espectros, com exceção do DMPG em água pura, apresentam um espectro característico de fase gel, embora sem uma ordem muito grande. É interessante notar que espectros de EPR obtidos com marcadores menos internos, não apontaram uma diferença tão marcante entre os espectros de DMPG em água pura e em condições de maior força iônica na fase gel. A 25 °C os espectros de DMPG com força iônica inferior a 100 mM NaCl, apresentam a presença de dois picos na região de campo alto, indicando estarem na fase intermediária. A proporção desses dois picos é sensível à variação da concentração de NaCl. Na condição de alta força iônica (100 mM NaCl) o espectro é muito parecido ao do DMPC, apontando uma fase fluida em ambos os casos. Como já dito, DMPG em alta força iônica e DMPC têm um comportamento muito semelhante visto por diferentes técnicas. A 50 °C todos os espectros indicam bicamadas na fase fluida, embora a microviscosidade seja reduzida nas bicamadas de DMPG em água pura, refletido pelo menor valor do parâmetro h_0/h_{+1} (resultados não mostrados).

Fig. IV.14 - Espectros de EPR de 0,2 mol% 16-PCSL incorporado em 10 mM DMPG em diferentes forças iônicas. *Esquerda:* 15 °C. *Centro:* 25 °C. *Direita:* 50 °C. Varredura total dos espectros: 80 G.

Dos espectros, foi medido o parâmetro h_0/h_{+1} em função da temperatura, como mostra a Fig. IV.15. Esse parâmetro reflete a presença da fase intermediária como um decréscimo gradual entre os valores das fases gel e fluida. Esse comportamento é claramente influenciado pela força iônica do meio, desaparecendo para 100 mM NaCl, quando ocorre uma mudança abrupta por

volta de 23 °C, semelhante ao DMPC. O parâmetro h_0/h_{+1} obtido nos espectros de DMPC em água pura não estão mostrados na Fig. IV.15, pois iriam atrapalhar a visualização dos outros resultados, já que a transição em água pura é extremamente larga, não apresentando um decréscimo acentuado em nenhuma temperatura. Além do mais, nessa condição, o 16-PCSL não chega a sentir uma fase gel.

A linha pontilhada na Fig. IV.15 indica $h_0 = h_{+1}$, ou seja, quando esses dois picos têm a mesma amplitude. O marcador de spin 16-PCSL, em geral, apresenta um eixo preferencial de rotação em torno do eixo-z, daí o fato do pico central ser maior que os outros. Entretanto, quase todas as amostras na Fig. IV.15 apresentam $h_{+1} > h_0$ a partir de uma certa temperatura na fase fluida, dependendo da força iônica. Isso indica que o eixo de rotação do marcador pode não ser mais o eixo-z e sim o eixo-x, por exemplo, quando o pico de campo baixo possui uma intensidade maior (Griffith & Jost, 1976). Isso pode ser uma consequência do maior tamanho da cadeia à qual está ligado o grupo nitróxido no 16-PCSL (C_{18}), em comparação às cadeias do DMPC (C_{14}). Na fase fluida, com a grande liberdade de movimento, essa cadeia pode, por exemplo, dobrar-se de maneira a não alinhar o eixo-z do nitróxido com a direção normal à bicamada.

Fig. IV.15 - Razão entre as amplitudes dos picos central e de campo baixo (h_0/h_{+1}) medidos nos espectros de EPR de 0,2 mol% 16-PCSL incorporados em 10 mM DMPC em 10 mM Hepes + NaCl. O eixo-x representa $T - T_m^{on}$ no caso do DMPC (T_m^{on} depende da força iônica, Fig. IV.6) e $T - T_m$ no caso do DMPC ($T_m = 23,6$ °C, Fig IV.4). A linha pontilhada horizontal indica $h_0/h_{+1} = 1$ e a vertical indica $T - T_m^{on} = 0$.

Foi possível medir o desdobramento hiperfino a_o , relacionado à polaridade do meio, nos espectros de 16-PCSL em altas temperaturas, por esses serem típicos de marcadores que apresentam uma grande mobilidade. O valor mais ou menos constante de a_o entre 40 e 50 °C garante que a distância entre os picos está de fato medindo o desdobramento hiperfino médio a_o , e não variações no grau de liberdade do marcador. Como o espectro de DMPC em água pura possui uma mobilidade menor que a apresentada pelas outras condições (Fig. IV.15), mesmo a 50 °C, talvez ainda esteja fora da região de mobilidade em que é possível medir a_o como a distância entre os picos. Talvez, se tivéssemos os espectros a temperaturas maiores, poderíamos avaliar a confiabilidade dessa medida.

Fig. IV.16 - Desdobramento hiperfino a_o medido dos espectros de 16-PCSL em 10 mM DMPC em diferentes forças iônicas em função da temperatura.

De modo geral, parece ocorrer uma pequena diminuição de a_o com o aumento da força iônica, embora todas as amostras tamponadas com adição de NaCl apresentem valores de a_o muito parecidos, conforme já havia sido observado em Fernandez & Lamy-Freund, 2001. Para termos certeza dessa variação sutil com a força iônica, seria necessário repetir essas medidas. O valor de a_o medido dos espectros de 16-PCSL em DMPC parece indicar que o marcador encontra-se numa região um pouco mais interna da bicamada. Essas pequenas variações de a_o podem refletir tanto uma posição diferente do marcador, quanto uma quantidade diferente de moléculas de água no interior da bicamada.

(colaboração com os alunos de doutorado Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turchiello do grupo de Biofísica, IFUSP)

O trabalho do nosso grupo de Biofísica tem sido principalmente voltado ao estudo da interação de membranas lipídicas com peptídeos de interesse biológico. De modo geral, os peptídeos têm o efeito de empacotar a membrana na fase fluida. Foi observado por outros estudantes do grupo (Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turchiello) que a presença dos peptídeos catiônicos α -MSH e Bradicinina, altera o comportamento térmico de dispersões de DMPG, deixando a amostra transparente em todo o intervalo de temperatura estudado e acabando com o pico calorimétrico largo associado à T_m^{off} (resultados não mostrados).

Mais especificamente, estudos com o marcador 16-PCSL revelaram que, em presença de 10 mol% de peptídeo, nenhum espectro de EPR apresentou os dois picos na região de campo alto, característicos da fase intermediária. Curiosamente, o pico de campo alto do espectro em presença desses peptídeos coincide com um dos dois picos do espectro de DMPG característicos da fase intermediária (na ausência do peptídeo). Tentamos, então, subtrair o sinal em presença do peptídeo do sinal em DMPG puro, como mostra a Fig. IV.17.

Fig. IV.17 - Exemplo de uma subtração efetuada a 25 °C. O espectro em preto foi adquirido em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl (100 %), enquanto que o em vermelho foi obtido na mesma condição com a adição de 1 mM α -MSH (65 %). O espectro em verde é o resultado da subtração (35 %), que pode estar mostrando a outra componente do espectro composto do DMPG na fase intermediária. Varredura total 80 G.

A surpreendentemente ótima qualidade da subtração, que teve como resultante um espectro que pode ser atribuído a uma única população, reforça bastante a hipótese da existência de dois sinais nos espectros de DMPG na fase intermediária (esse sinal subtraído foi inclusive ajustado com sucesso pelo programa LOWFIT desenvolvido por Barney Bales em Bales, 1989). Nesse caso, a presença do peptídeo inibiria a presença de uma das populações. É importante enfatizar que uma subtração com êxito não foi conseguida quando tentamos subtrair do espectro de dois picos, vários espectros de 16-PCSL que representavam também uma componente única, como o obtido com DMPG em alta força iônica e em DMPC a 25 °C, ou em DMPG em baixa força iônica, mas acima de T_m^{off} .

O sinal obtido em presença do peptídeo a 25 °C é bastante assimétrico, de forma mais evidente no terceiro pico, semelhante ao observado em espectros de 14-PCSL na fase intermediária (Fig. IV.8). Por outro lado, o sinal resultante da subtração tem um caráter bem móvel e um valor alto de desdobramento hiperfino ($a_o = 15,03$ G). Conforme a Tabela IV.2, esse valor de a_o corresponderia ao centro paramagnético localizado na posição do quinto carbono da cadeia acila (Tabela IV.2). Entretanto, espectros de marcadores com o radical nitróxido na posição do quinto carbono, em bicamadas de DMPG, sentem uma microviscosidade reduzida, devido ao perfil de mobilidade de bicamadas lipídicas (Biaggi et al., 1997; Riske et al., 1997; Fernandez & Lamy-Freund, 2001). É mais provável, portanto, que esse sinal de grande polaridade e mobilidade esteja associado a marcadores localizados em uma região com um empacotamento bem mais frouxo, muito distinto do esperado em bicamadas lipídicas, que permitiria um alto grau de liberdade de movimento e a entrada de moléculas de água, que aumentariam a polaridade interna. Foi observado em Benatti et al., 2001, que o valor de a_o do marcador 16-SASL é consideravelmente maior quando inserido em micelas ($a_o = 15,0$ G) do que em bicamadas ($a_o = 14,2$ G), indicando que, à medida que o raio de curvatura do agregado anfifílico cresce, ocorre uma maior penetração de água no interior da região hidrofóbica, ou o nitróxido apresenta uma maior amplitude de movimento, tendo acesso a regiões de polaridades maiores.

Espectros em Banda-Q e Banda-L

(colaboração com o Prof. Dr. Otaciro R. Nascimento do Instituto de Física de São Carlos, USP; e Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turchiello, estudantes de doutorado do grupo de Biofísica, IFUSP)

Os espectros mostrados nos itens anteriores foram todos obtidos em Banda-X, o que define a frequência da microonda utilizada para excitar as transições do spin eletrônico. Para que a

condição de ressonância seja satisfeita, outras frequências de microonda podem ser utilizadas, desde que o campo magnético seja variado de acordo (Eq. II.13). A frequência da microonda utilizada define a escala de tempo do EPR e o modo como as anisotropias dos tensores g e A são promediadas, alterando, portanto, o espectro de EPR de uma mesma sonda em uma mesma condição. A frequência mais utilizada em Ressonância Paramagnética Eletrônica é em torno de 9,4 GHz, chamada Banda-X. Outras bandas, entretanto, tem sido também utilizadas. A Tabela IV.3 fornece as três bandas que foram utilizadas no estudo do marcador 16-PCSL, com suas respectivas frequências e regiões de campo magnético para que a transição do grupo nitróxido possa ser detectada.

Tabela IV.3

	Banda-L	Banda-X	Banda-Q
ν (GHz)	1,3	9,4	35
B_0 (G)	~ 460	~ 3.360	~ 12.460

Para tentar elucidar a natureza dos espectros de 16-PCSL na fase intermediária, obtivemos espectros de EPR nas bandas L e Q também. Como discutido no item anterior, o espectro de 16-PCSL na fase intermediária pode ser composto por dois sinais, com mobilidade e polaridade distintas. Em outras bandas, a soma das duas componentes é diferente, pois enquanto o desdobramento hiperfino independe da frequência e campo magnético aplicados, diferenças no valor principal do tensor g serão acentuadas em presença de maiores campos magnéticos.

As experiências foram feitas em 50 mM DMPG, para obter uma melhor qualidade dos espectros. As condições estudadas foram DMPG em Hepes + 2 (baixa força iônica) e + 100 mM NaCl (alta força iônica), e Hepes + 2 mM NaCl + 5 mM α -MSH. Resultados semelhantes foram obtidos com a adição de Bradicinina, entretanto não serão aqui mostrados. Em Banda-Q foram obtidos também espectros de DMPG em água pura.

Inicialmente, obtivemos espectros de 16-PCSL em 50 mM DMPG a 25 e 50 °C com a Banda-X, só para nos certificarmos de que o efeito do peptídeo e de 100 mM NaCl adicionados eram os mesmos observados com 10 mM DMPG (Fig. IV.13b e IV.17). A 50 °C, na fase fluida, está claro que o peptídeo empacota mais a membrana, já que a largura dos picos, de maneira mais evidente no terceiro, é maior.

Fig. IV.18 - Espectros de Banda-X de 0,2 mol% 16-PCSL incorporados em 50 mM DMPG em diferentes forças iônicas e com adição de 5 mM α -MSH a 25 °C (esquerda) e 50 °C (direita). Varredura total 80 G. As linhas pontilhadas indicam a posição dos dois picos que aparecem na região de campo alto nos espectros na fase intermediária.

Os espectros correspondentes obtidos em Banda-Q, também a 25 e 50 °C, estão mostrados na Fig. IV.19. A 25 °C vemos a presença de dois picos nos picos central e de campo alto na fase intermediária, sendo mais evidente no espectro de DMPG em água pura. Em presença do peptídeo e de alta força iônica, os espectros são típicos de uma sinal único, embora diferentes entre si. Novamente, o pico central único do espectro obtido em presença do peptídeo coincide com um dos picos do espectro na ausência de peptídeo.

A 50 °C um sinal único é observado para todas as condições, sendo que as amostras de DMPG em hepes + 2 e + 100 mM NaCl são muito semelhantes, mostrando que as duas encontram-se na fase fluida. Em água pura a liberdade de movimento é bem menor, o que mostra o comportamento estranho dessas dispersões. A presença do peptídeo na superfície da membrana também causa uma diminuição considerável na fluidez da membrana a 50 °C. É interessante reparar que a menor mobilidade fica bem mais evidente na Banda-Q do que na Banda-X (Fig. IV.18), consequência direta das diferentes escalas de tempo nas duas bandas, definida pelas distintas frequências de microonda (Tabela IV.3).

Fig. IV.19 - Espectros de Banda-Q de 0,2 mol% 16-PCSL incorporados em 50 mM DMPG em diferentes forças iônicas a 25 °C (esquerda) e 50 °C (direita). Varredura total 100 G.

A Fig. IV.20 mostra os espectros de 16-PCSL obtidos em Banda-L na ausência e presença de α -MSH e de 100 mM NaCl, a 25 e a 40 °C. Não foi obtido o espectro de DMPG em água pura nesta condição.

Fig. IV.20 - Espectros de Banda-L de 0,2 mol% 16-PCSL incorporados em 50 mM DMPG em diferentes forças iônicas e com adição de 5 mM α -MSH a 25 °C (esquerda) e 40 °C (direita). Varredura total 50 G.

A 25 °C vemos novamente a existência de dois picos nas regiões de campo alto e baixo, na condição de DMPG puro em hepes + 2 mM NaCl, enquanto que em alta força iônica (100 mM NaCl) um sinal único é observado. Em presença de α -MSH, os picos únicos observados nas regiões de campo alto e baixo coincidem com um dos picos do espectro em DMPG puro, de acordo com os espectros obtidos nas outras bandas. A 40 °C todos os espectros representam sinais únicos de fase fluida. A menor mobilidade em presença do peptídeo não é tão evidente aqui, provavelmente devido à menor escala de tempo da banda-L, comparada à X e à Q.

Existe uma alta correlação entre os espectros de EPR nas três bandas, obtidas na mesma condição. A aparição dos dois picos nas três bandas se dá somente nas condições que estão na fase intermediária, enquanto em alta força iônica e acima de T_m^{off} obtém-se sempre um sinal único. Nas três bandas, o espectro em presença do peptídeo α -MSH a 25 °C apresenta um pico único que coincide com um dos picos observados em sua ausência. Foi feita, então, a subtração dos sinais em presença do peptídeo nas bandas L e Q dos espectros na ausência do peptídeo, como ilustrado na Fig. IV.21.

Fig. IV.21 - Exemplo de uma subtração efetuada a 25 °C nas bandas L (esquerda) e Q (direita). Os espectros no topo foram adquiridos em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl, enquanto que os do meio foram obtidos na mesma condição com a adição de 10 mol% α -MSH. Os espectros em baixo são o resultado da subtração. Varredura total 50 G (esquerda) e 100 G (direita).

Surpreendentemente, é possível efetuar a subtração com uma ótima qualidade também nas bandas L e Q, tendo como resultado um espectro bem móvel e com uma alta polaridade ($a_0 = 15,1$ G na Banda-L, medido diretamente do espectro, e $a_0 = 15,0$ G na Banda-Q, obtido por simulação, já que não é possível medir diretamente do espectro). Dessa forma, a hipótese da existência de dois

sinais fica muito reforçada, já que os espectros resultantes das subtrações possuem as mesmas características nas três bandas, isto é, alta polaridade ($a_0 \sim 15$ G) e mobilidade. Além disso, a proporção das duas populações obtidas das subtrações é praticamente igual nas três bandas (65 % do sinal mais imobilizado e 35 % do sinal mais móvel). Seria altamente improvável que essa alta correlação entre as componentes subtraídas fosse um acaso.

Foram feitas simulações dos espectros assumindo as duas hipóteses distintas levantadas no início desta seção, sendo uma (i) que o espectro característico da fase intermediária é composto por um sinal único, e a outra (ii) assumindo que este espectro é composto por dois sinais distintos, sendo um semelhante ao obtido em presença do peptídeo, e o outro o resultado da subtração (Figs. IV.17 e IV.21). Os resultados das simulação estão descritos a seguir:

i) Um sítio. Foi possível simular o espectro do DMPG em baixa força iônica a 25 °C como um espectro único, utilizando um eixo diretor para o movimento da sonda não paralelo à direção perpendicular à superfície da bicamada. A simulação reproduziu razoavelmente bem, com o mesmo conjunto de parâmetros, os espectros experimentais obtidos nas bandas X e L (Fig. IV.18 e IV.20), embora sem definir a presença dos dois picos tão bem quanto o espectro experimental. Foi impossível, entretanto, simular o desdobramento do pico central da Banda-Q (Fig. IV.19), mesmo utilizando outro conjunto de parâmetros.

ii) Dois sítios. Foi possível simular, com uma boa qualidade, os espectros obtidos das subtrações nas três bandas (Fig. IV.17a e IV.21), que representam a componente móvel em um ambiente mais polar, com o mesmo conjunto de parâmetros. Entretanto, em nenhuma das três bandas foi possível simular com precisão o pico assimétrico dos espectros de DMPG em presença de peptídeos. Provavelmente essa seja uma limitação do programa de simulação, já que mesmo o sinal não tão assimétrico obtido em DMPG em alta força iônica a 25 °C (Fig. IV.13b), que em princípio é um espectro "normal", pôde ser simulado com precisão no que diz respeito à assimetria do terceiro pico (resultados não mostrados).

Pelos resultados obtidos com as simulações não pudemos determinar qual das duas hipóteses é a verdadeira, pois os dois caminhos (i e ii) mostraram resultados positivos e negativos. Entretanto, a alta consistência dos sinais obtidos das subtrações, nas três bandas, fortemente sugere a hipótese de dois sinais nos espectros de 16-PCSL em dispersões de DMPG na fase intermediária.

Com os dados obtidos até o presente momento, então, a hipótese da existência de dois sinais parece ser a mais adequada, embora o problema não esteja ainda elucidado. Podemos especular que a presença dos dois sinais seja causada por um empacotamento não usual da membrana de DMPG na fase intermediária. Esse empacotamento peculiar da região de transição pode ser causado, por exemplo, pela existência de regiões de altíssima curvatura, impostas à membrana devido à coexistência de domínios de diferentes empacotamentos e mesmo de

diferentes densidades superficiais de carga. As regiões curvas teriam características de empacotamento semelhantes às encontradas em agregados micelares, ou seja, uma alta fluidez que permitiria o acesso do marcador a meios de polaridade mais altas, devido à grande amplitude do movimento, e, talvez, uma maior entrada de moléculas de água mesmo numa região mais interna. O peptídeo poderia preferir localizar-se nessas regiões, que por apresentarem uma maior área por cabeça polar, permitiriam uma maior penetração de regiões hidrofóbicas. A presença do peptídeo na região curva poderia alterar o sinal dessa população de marcadores 16-PCSL. O outro sinal não seria então muito alterado pela presença do peptídeo, já que o peptídeo preferiria as regiões de maior curvatura. Pelo fato do peptídeo preferir a fase intermediária, T_m^{off} seria inibida e a amostra ficaria transparente sempre, como foi observado experimentalmente.

Medidas em pH 1

A carga negativa do grupo fosfato do DMPG pode ser neutralizada em alta concentração de próton, ou seja, em pH baixo. A neutralização da superfície lipídica acaba com a repulsão eletrostática entre as cabeças polares do DMPG, estabilizando a fase gel e aumentando, portanto, a temperatura transição de fase. Em baixo pH o DMPG não apresenta fase intermediária. Não foi feito um estudo completo com a dependência do pH. Com o marcador de spin 16-PCSL foram obtidos espectros em pH 9, pH 7 (mostrado nos itens anteriores) e pH 1. Em pH alto, os resultados são praticamente idênticos aos obtidos com pH neutro, já que pH neutro já corresponde ao estado completamente dissociado do grupo fosfato, e portanto o aumento do pH não altera a ionização da superfície lipídica. Em pH 1, por outro lado, foi obtida uma alta temperatura de transição em torno de $T_m = 40^\circ\text{C}$, como mostra a Fig. IV.22a.

Claramente, o espectro na fase gel do DMPG neutro possui uma ordem muito maior que a observada nos espectros obtidos em DMPG carregado (Fig. IV.11 e IV.14), o que reflete o alto empacotamento da bicamada de DMPG no estado neutro, onde não existe repulsão eletrostática entre cabeças vizinhas e a cabeça polar é relativamente pequena. É interessante notar, também, que esse empacotamento do DMPG neutro é maior que o observado na fase gel do DMPC (Fig. IV.14), o que deve ser uma consequência do tamanho maior do grupo colina em relação ao glicerol.

Em torno de $T_m = 40^\circ\text{C}$ os espectros são obviamente uma soma dos espectros nas fases gel e fluida, mostrando que existe uma coexistência de fases e que os marcadores sentem um dos dois domínios na escala de tempo do EPR. Esses espectros compostos são diferentes dos obtidos em DMPG carregado na fase intermediária.

Fig. IV.22 - a) Espectros de 0,2 mol% 16-PCSL incorporados em 10 mM DMPG em água pH 1 (ajustado com 0,1 M HCl). Varredura total 80 G. As linhas tracejadas mostram a posição do pico de campo alto nas fases gel e fluida. b) Parâmetro h_0/h_{+1} medidos dos espectros em a). A linha tracejada indica $h_0/h_{+1} = 1$.

A Fig. IV.22b mostra o parâmetro h_0/h_{+1} em função da temperatura, que indica a existência de uma faixa de mobilidade intermediária em torno de $T_m = 40$ °C. Embora o valor de h_0/h_{+1} na fase gel do DMPG neutro seja menor que o obtido em DMPG carregado, o DMPG neutro possui uma maior ordem, evidenciado pela forma do espectro. O desdobramento hiperfino máximo (A_{max}) é certamente maior em pH 1 do que em pH neutro. Na fase fluida, a partir de uma certa temperatura, $h_{+1} > h_0$ também no DMPG neutro.

Seria interessante prosseguir esse estudo do DMPG em função do pH e estudar em que valor de pH a fase intermediária aparece, e como o espectro de 16-PCSL, que apresenta dois sinais indicando a coexistência de fases no DMPG neutro, muda para o sinal característico da fase intermediária. Além disso, a obtenção de varreduras de DSC seria certamente necessária, inclusive para analisar se essa coexistência de fases do DMPG neutro também geraria picos definidos de calor específico, como os apresentados pelo DMPG carregado (Fig. IV.5), ou se, pelo contrário, seria caracterizado apenas por um pico calorimétrico largo centrado em $T_m = 40$ °C.

Com o marcador 16-PCSL fizemos um experimento que permitiu concluir que as vesículas de DMPG não se rearranjam no intervalo de temperatura estudado, incluindo nas transições de fase ($T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$). Ou seja, não parece haver fusão entre as vesículas. Esse foi um resultado importante, pois alguns trabalhos da literatura propõem a formação de uma rede tridimensional lipídica na fase intermediária, com a presença de vesículas nas fases vizinhas. Para tal, necessariamente, seria necessário o processo de fusão entre vesículas. Além disso, o aumento da turbidez da amostra em $T_{m^{off}}$ poderia ser explicado por um processo de agregação e fusão das vesículas, o que com esse experimento provamos não estar acontecendo.

Preparamos vesículas de DMPG contendo 3 mol% 16-PCSL. Nessa alta concentração de marcadores de spin na bicamada lipídica, o efeito de troca (*spin exchange*) alarga consideravelmente as três linhas do espectro. Essas vesículas com marcador foram diluídas em duas partes de vesículas de DMPG sem o marcador de spin. Como o 16-PCSL possui uma partição desprezível em meio aquoso, uma diluição dos marcadores entre as bicamadas disponíveis, que seria visível pela diminuição das larguras de linha do espectro, só aconteceria se houvesse o processo de fusão entre as vesículas de DMPG. Como controle, obtivemos o sinal de vesículas com 1 mol% 16-PCSL, concentração final de marcadores caso ocorresse uma completa diluição dos mesmos. Após a diluição, feita a 25 °C, aumentamos a temperatura acima de $T_{m^{off}}$, depois descemos abaixo de $T_{m^{on}}$, subimos novamente a 25 °C, e depois a 40 °C, sempre permanecendo cerca de 30 minutos em cada temperatura. Mesmo depois desse grande ciclo de temperatura, a largura do sinal de EPR ficou praticamente inalterada, como mostra a Fig. IV.23 para o último espectro a 40 °C. Nas outras temperaturas os espectros obtidos após a diluição também eram muito parecidos aos obtidos antes da diluição. Esses resultados mostram que não ocorre um rearranjo dos lipídios em nenhuma das transições, e a unidade da vesícula parece ser preservada durante todo o processo de transição de fase das cadeias.

Fig. IV.23 - Espectro de 16-PCSL incorporado em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl a 40 °C. O espectro verde foi obtido 2 h após a diluição da amostra de 3 mol% (espectro vermelho) em duas partes de DMPG puro, após o seguinte ciclo de temperatura: depois de 30' a 25 °C, 30' a 40 °C, 30' a 17 °C, esquentar a 50 °C e resfriar a 40 °C. O espectro em preto foi obtido com 1 mol% 16-PCSL incorporado em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl. Os espectros foram normalizados com relação à altura do pico central.

ii) Superfície lipídica e estimativa do potencial de superfície Ψ_0

(colaboração com Prof. Dr. Barney Bales, da California State University, Northridge, LA, EUA e com o Prof. Dr. Otaciro R. Nascimento, do Instituto de Física de São Carlos, USP)

Vesículas que contêm lipídios carregados geram um potencial eletrostático que decai em função da distância à bicamada. No caso de membranas biológicas, esse potencial pode ser importante em muitos processos bioquímicos, sendo que, o efeito mais direto e evidente, é aumentar a concentração de moléculas de carga oposta na superfície da membrana. Em suspensões coloidais, a interação eletrostática entre os colóides é, muitas vezes, responsável pela estabilidade da suspensão. O conhecimento do potencial de superfície Ψ_0 , é portanto de grande importância no estudo de sistemas carregados.

Esse problema recebeu muitos tratamentos teóricos, como o dado por Gouy e Chapman (Apêndice A.1), no qual a equação de Poisson-Boltzmann foi aplicada a uma superfície infinita carregada. O potencial eletrostático $\Psi(x)$ e a distribuição de íons $\rho(x)$ em função da distância x à superfície, depende da densidade superficial de cargas na superfície σ e de íons em solução n (força iônica). Esse modelo teórico, mesmo contendo várias aproximações, foi amplamente aplicado no estudo de bicamadas lipídicas carregadas. A aproximação de vesículas por um plano infinito é muitas vezes válida, pelo fato das vesículas possuírem um baixo raio de curvatura.

A equação de Poisson-Boltzmann pode ser também resolvida para uma simetria esférica, entretanto uma solução analítica só é obtida na aproximação de potencial de superfície baixo ($e\Psi_0/kT \ll 1$), também chamada de aproximação de Debye-Hückel. Esse modelo é muito utilizado no tratamento teórico de sistemas micelares e coloidais carregados.

O potencial eletrostático de superfície Ψ_0 tem sido medido de diferentes maneiras, como por exemplo por mobilidade eletroforética, pelo cálculo da partição membrana/água de marcadores fluorescentes ou de spin, carregados com carga oposta à carga da superfície (Castle & Hubbell, 1976; Grieser & Drummond, 1988) e por reações químicas na superfície anfifílica (Cuccovia et al., 1997). É importante mencionar a dificuldade em determinar a interface aquosa em agregados anfifílicos, principalmente em micelas. O valor de Ψ_0 , estimado por esses vários métodos, pode variar consideravelmente, somente pelo fato de $\Psi(x)$ ser extremamente dependente da distância à superfície carregada. Diferentes sondas, por exemplo, podem revelar diferentes valores de Ψ_0 , refletindo apenas pequenas variações de localização na superfície.

Para a determinação do potencial de superfície de DMPG, utilizamos uma sonda paramagnética aquo-solúvel catiônica, chamada dCAT1 (iodato de 4-trimetilamônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina- d_{17} -1-oxil), cuja estrutura química está esquematizada na Fig. III.1. Essa sonda,

por não conter uma região apolar, reside na superfície da bicamada, e portanto não perturba muito o agregado anfifílico. Além disso, o dCAT1 é uma molécula deuteriada, o que reduz significativamente a largura de linha Gaussiana do espectro de EPR. Com isso, o espectro é muito sensível a pequenas variações na mobilidade da sonda, que alteram somente a componente Lorentziana da largura de linha. Espera-se, então, que o espectro dos marcadores longe e próximo à superfície sejam distintos, já que a superfície lipídica impõe uma restrição ao movimento da sonda, assim como uma pequena redução da polaridade do meio. Se o tempo de troca entre as diferentes populações for maior que o tempo típico da medida de EPR (da ordem de ns), o espectro resultante será uma soma dos espectros relativos ao marcador longe e perto da superfície. É possível, então, separar essas duas componentes subtraindo-se o espectro do marcador obtido em solução na ausência de membrana, do espectro total. Dessa forma, é possível calcular a partição do marcador, e, aplicando o modelo de dois sítios discutido no Apêndice 2, estimar o valor do potencial de superfície Ψ_0 . Da componente do espectro relativo à população na superfície da membrana, é possível medir o desdobramento hiperfino médio a_0 , relacionado à polaridade do meio (Tabela II.2), e calcular o tempo de correlação rotacional do dCAT1, fornecendo informações quanto à localização do marcador na superfície anfifílica. Para comparação, estudamos também o detergente negativamente carregado SDS (dodecilsulfato de sódio), que em meio aquoso forma micelas acima de sua $cmc = 8$ mM, com características superficiais bem distintas da superfície de uma bicamada.

Microambiente do dCAT1 na superfície do DMPG

Espectros de 0,1 mM dCAT1 foram obtidos em solução aquosa e na presença de 10 mM DMPG em diferentes condições de força iônica e em 12 mM SDS em água pura, no intervalo de temperatura de 5 a 50 °C. Os espectros em presença de DMPG na fase gel assemelham-se muito aos espectros do marcador livre em solução, indicando que praticamente não existem marcadores próximos à superfície da bicamada. Entretanto, o alto empacotamento das cabeças lipídicas na fase gel pode impedir uma penetração do dCAT1 na superfície da membrana. Entre T_{m}^{on} e T_{m}^{off} , na região de transição, os espectros obtidos apontam claramente a existência de um espectro composto por duas componentes, sendo uma semelhante ao espectro livre em solução, e outra mais imobilizada. A proporção dessas duas componentes é obviamente influenciada pela força iônica do meio. Em alta força iônica (100 mM NaCl) não foi observada uma componente imobilizada para nenhuma temperatura. Na fase fluida, acima de T_{m}^{off} , os espectros tornam-se mais complexos, não podendo ser associados a somente duas componentes.

A decomposição dos espectros é feita subtraindo-se uma certa quantidade do espectro de dCAT1 em solução, do espectro obtido em presença do agregado anfifílico na mesma temperatura, como ilustrado na Fig. IV.24 para bicamadas de DMPG e micelas de SDS. A subtração é feita por tentativa e erro, tendo em vista a qualidade do espectro resultante, que deve ter a aparência de um sinal único de EPR. Os espectros subtraídos foram depois ajustados com sucesso pelo programa LOWFIT, desenvolvido pelo Prof. Dr. Barney Bales, comprovando a qualidade das subtrações. Dessos ajustes foram obtidas, com uma boa precisão, as larguras de linha Lorentziana, a partir das quais é possível calcular o tempo de correlação da sonda na superfície ($\tau_{//}$ e $\tau_{\perp}$), e as posições dos três picos, permitindo o cálculo do desdobramento hiperfino a_o , dado pela distância entre os picos. Fica evidente, só olhando os espectros, que a componente relativa à população de marcadores na superfície micelar é muito mais móvel, pelo fato das linhas serem mais estreitas que as observadas no espectro da componente superficial de DMPG.

Fig. IV.24 - Exemplo de subtração do espectro livre. Os espectros estão mostrados nas proporções em que foram subtraídos. *Esquerda.* 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl. *Direita.* 12 mM SDS em água. $T = 30^{\circ}\text{C}$.

A Fig. IV.25 mostra espectros de dCAT1 em presença de 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl em diferentes temperaturas. Na coluna da esquerda estão os espectros obtidos experimentalmente, e na coluna da direita estão os espectros obtidos como resultado das subtrações, representando, portanto, a população de marcadores na superfície da bicamada. Acima de $T_{m^{on}}$ ocorre uma clara imobilização do marcador na superfície da bicamada com relação à fase gel, possibilitando a decomposição do espectro em suas duas componentes. Na fase fluida, acima de $T_{m^{off}}$, o sinal subtraído é composto por pelo menos duas componentes. Essas componentes podem estar refletindo as diferentes localizações do marcador na superfície lipídica na fase fluida,

onde existem grandes flutuações térmicas da forma das vesículas. Além disso, o tempo de troca entre esses diferentes sítios na superfície, que pode ser da ordem da medida de EPR, pode fazer com que os diferentes espectros estejam sendo parcialmente promediados. Nas dispersões de DMPG em água pura foi possível efetuar a subtração da componente livre a todas as temperaturas, tendo como resultado um espectro de superfície único, semelhante aos obtidos nas outras forças iônicas na fase intermediária. Nas micelas de SDS, o espectro pôde sempre ser associado à soma de uma componente de superfície e uma componente livre em solução. É importante ressaltar que a superfície de micelas é certamente diferente da superfície de membranas. Embora ocorra uma troca relevante entre monômeros em solução e monômeros formando micelas, que é praticamente desprezível em bicamadas, a superfície micelar certamente não pode apresentar o tipo de flutuações superficiais amplas que membranas lipídicas apresentam na fase fluida (Lipowsky, 1991).

Fig. IV.25 - *Esquerda*. Espectro de 0,1 mM dCAT1 em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl a diferentes temperaturas. *Direita*. Espectros resultantes da subtração de uma certa quantidade de espectro de dCAT1 em solução aquosa na mesma temperatura. Varredura total: 50 G. Espectros em preto: $T < T_m^{on}$. Espectros em vermelho: $T_m^{on} < T < T_m^{off}$. Espectros em verde: $T > T_m^{off}$.

O desdobramento hiperfino (a_o), discutido na seção II.1, está diretamente relacionado à polaridade do meio em torno do marcador nitróxido, ou seja, do sítio onde localiza-se o dCAT1 na superfície lipídica (Tabela II.2). Valores altos de a_o indicam uma alta polaridade. Esse parâmetro foi obtido para todos os espectros subtraídos nas temperaturas abaixo de T_m^{off} , pois acima dessa temperatura, na fase fluida, os espectros subtraídos eram complexos e relativos a mais de um sítio.

A subtração pôde ser efetuada para todas as temperaturas no sistema micelar e nas dispersões de DMPG em água pura.

A Fig. IV.26 mostra os valores de a_0 obtidos para os espectros de dCAT1 livre em solução e referentes à população nas superfícies de DMPG em diferentes forças iônicas, e de SDS em água. É possível correlacionar o valor de a_0 medido dos espectros de EPR à polaridade do meio ϵ . A partir da medida do desdobramento hiperfino a_0 de espectros de dCAT1 obtidos em meios de diferentes hidrofiliidades (Mukerjee et al., 1982), chegou-se à relação $\epsilon = -663,8 + 44,2 a_0$ (25 °C).

Fig. IV.26 - Dependência com a temperatura do desdobramento hiperfino a_0 calculado dos espectros de 0,1 mM dCAT1 livre em solução e dos espectros subtraídos de 0,1 mM dCAT1 em presença de 10 mM DMPG em diferentes forças iônicas e de 12 mM SDS em água pura.

Os valores de a_0 obtidos dos espectros de dCAT1 na superfície de DMPG na fase gel indicam uma polaridade semelhante à da água ($\epsilon \approx 80$), mostrando que o marcador não consegue se inserir na superfície lipídica devido ao alto empacotamento característico desta fase. Para temperaturas maiores que $T_{m^{on}}$, a sonda penetra mais na superfície, residindo numa região significativamente menos polar ($\epsilon \approx 60$ em $T = 30$ °C). Esse comportamento foi observado para todas as forças iônicas. É interessante notar que a migração da sonda para a superfície da bicamada inicia-se em $T_{m^{on}}$, mas apresenta um valor constante para todas as condições de força iônica apenas por volta de 30 °C (com exceção de DMPG em água). A transição é, no entanto, mais estreita para forças iônicas maiores. Acima de $T_{m^{off}}$, diferente para cada condição de força iônica, não foi

possível calcular a_0 , pois o espectro era uma soma de pelo menos dois sítios, com polaridades distintas.

A sonda pôde penetrar mais na superfície micelar, evidenciado pelo menor valor de a_0 (correspondendo a $\epsilon \approx 50$), devido ao fato do menor empacotamento das cabeças polares do detergente. A polaridade permanece constante para todas as temperaturas, concordando com o fato de não existirem transições de fase nesse intervalo de temperatura. A altas temperaturas, o dCAT1 parece inserir-se mais profundamente nas membranas de DMPG em água pura, quando a polaridade do meio chega a valores tão baixos quantos os obtidos nas micelas de SDS.

Em espectros relativamente móveis, na região de *motional narrowing* como discutido na seção II.1, como é o caso dos espectros de dCAT1 na superfície lipídica, é possível calcular tempos de correlação rotacional perpendicular ($\tau_{\perp}$) e paralelo ($\tau_{\parallel}$) ao eixo de rotação principal do nitróxido a partir das larguras das três linhas (obtidas dos ajustes feitos pelo programa LOWFIT), de acordo com a Eq. II.20. O eixo de rotação preferencial da molécula de dCAT1 corresponde à direção da ligação N-O, definida como eixo-x. Os marcadores de membrana 14 e 16-PCSL têm, em geral, o eixo-z, definido como a direção do orbital $p\pi$ do nitrogênio, como eixo principal de rotação. Por essa razão, espectros desses marcadores de membrana apresentam o pico central com maior intensidade, enquanto que o dCAT1 apresenta o pico referente à transição $m_l = +1$ (pico de campo baixo) como o mais intenso (Marsh, 1989). A Fig. IV.27 mostra os tempos de correlação perpendicular ($\tau_{\perp}$) e paralelo ($\tau_{\parallel}$) do dCAT1 em solução e na superfície de DMPG e de SDS.

Fig. IV.27 - Tempo de correlação perpendicular (esquerda) e paralelo (direita) ao eixo principal do dCAT1 em solução, e em presença de SDS e DMPG em várias forças iônicas em função da temperatura. Os tempos de correlação foram calculados a partir das larguras de linha medidas nos espectros subtraídos.

Em solução, o dCAT1 apresenta um movimento rápido e isotrópico ($\tau_{\parallel} \sim \tau_{\perp}$). O tempo de correlação paralelo ao eixo principal do dCAT1 ($\tau_{\parallel}$) é praticamente insensível à imobilização causada pela superfície lipídica e micelar, mostrando valores muito parecidos aos obtidos com o marcador livre em solução. Uma pequena restrição ao movimento perpendicular ocorre na superfície de SDS. Entretanto, na superfície de DMPG acima de $T_{m^{on}}$, ocorre uma grande anisotropia do movimento, pois $\tau_{\perp}$ é muito maior que $\tau_{\parallel}$. O empacotamento da superfície acima de 30 °C parece ser o mesmo para todas as forças iônicas, inclusive em água pura, onde o desdobramento hiperfino a_o medido chegou a valores tão baixos quanto os encontrados em micelas de SDS. O aumento em $\tau_{\perp}$ segue a diminuição em a_o observada na Fig. IV.26, também apresentando um valor relativamente constante acima de 30 °C, e uma transição um pouco mais estreita nas condições de maior força iônica. Não foi possível obter $\tau_{\parallel}$ e $\tau_{\perp}$ nas temperaturas acima de $T_{m^{off}}$, devido ao caráter composto do espectro imobilizado.

O empacotamento da superfície de DMPG é muito maior que de micelas de SDS, pois mesmo o marcador inserindo-se mais no agregado micelar (evidenciado pelo menor valor de a_o), a restrição ao movimento é muito menor que na bicamada de DMPG. Espera-se, de fato, que bicamadas lipídicas, mesmo na fase fluida, sejam bem mais compactas que micelas, devido ao alto raio de curvatura e da maior área por cabeça polar desta última.

Cálculo da partição

O valor da partição membrana/água do marcador de spin é obtido através do cálculo da razão entre o número de marcadores imobilizados pela superfície sobre o número total de marcadores (# moles na superfícies / # moles total). Portanto, calculando a razão entre a segunda integral do espectro subtraído (referente à população próxima à membrana) e a do espectro composto antes da subtração, obtemos a partição membrana/água (P) do marcador. (A segunda integral do espectro de EPR é proporcional ao número de spins, pois o sinal detectado é a derivada da absorção).

A partição foi calculada para todos os espectros obtidos tanto em DMPG nas diferentes forças iônicas quanto em SDS. Os valores obtidos em função da temperatura estão mostrados na Fig. IV.28. Devido à dificuldade de subtração na fase gel, os valores apresentados devem ser interpretados como um valor mínimo. Entretanto, vemos uma clara tendência de migração da sonda para a superfície de DMPG acima de $T_{m^{on}}$, quando as subtrações já são confiáveis. Em água pura existe uma distinção clara entre os espectros de dCAT1 em solução e em presença de DMPG mesmo na fase gel, evidenciado pelo alto valor da partição nessa condição. O valor da partição segue também o comportamento de a_o e $\tau_{\perp}$ apresentando um valor constante acima de 30 °C.

Acima de T_{m}^{off} , na fase fluida, os espectros subtraídos têm uma aparência de sinal composto, o que dificulta o julgamento da qualidade do espectro resultante. Mesmo assim, a partição parece ficar inalterada na fase fluida, acima de T_{m}^{off} , mostrando que o número de marcadores de spin na superfície não se altera significativamente, mas apenas passam a ocupar diferentes sítios na superfície da membrana. Existe uma clara diminuição da partição com o aumento da força iônica, resultante de uma diminuição da atração eletrostática do marcador pela membrana. Na fase gel parece também existir essa tendência, embora a qualidade das subtrações não permita uma análise mais detalhada dessa fase. A partição do marcador na superfície micelar de SDS é constante para todas as temperaturas ($P = 0,9$).

Fig. IV.28 - Partição (# moles de marcador na superfície / # moles de marcador total) calculada em função da temperatura do marcador dCAT1 em DMPC em diferentes forças iônicas e em SDS.

Foram feitas medidas preliminares com variação de pH, mantendo-se a força iônica baixa (6 mM, representando Hepes + 2 mM NaCl). Em pH 1 não existe componente imobilizada nos espectros de dCAT1 a nenhuma temperatura, mostrando que o marcador não sente uma atração eletrostática considerável pela membrana lipídica. De fato, sabemos que nessa condição o DMPC encontra-se em seu estado neutro (Fig. IV.22 e Watts et al., 1978). Resultados obtidos em pH 9, mostram os mesmos resultados que os obtidos em pH 7,4, tanto pelos valores de a_0 e τ quanto pelos valores da partição P . Esse resultado mostra que, já em pH neutro, o DMPC está em seu estado desprotonado, como esperávamos, e portanto o aumento de pH não aumenta o potencial de superfície.

O potencial eletrostático de superfície Ψ_0 pode ser diretamente calculado do valor da partição (Eq. A.2.5), conforme discutido no modelo de dois sítios (Apêndice A.2). É necessário, também, atribuir um valor ao volume da superfície lipídica (V_{surf}), definida como NAh , onde N é o número total de lipídios no volume total, A é a área por cabeça polar, e h a espessura da camada na qual o marcador de spin sente a restrição ao movimento devido à superfície lipídica. A área por cabeça polar do DMPG foi estimada em $A = 60 \text{ \AA}^2$ de acordo com valores para a fase fluida obtidos por Marsh, 1974. Assumimos uma espessura h da ordem do tamanho da molécula de dCAT1, $h = 6 \text{ \AA}$. Para micelas de SDS foi usado uma área por cabeça polar maior, $A = 120 \text{ \AA}^2$ (calculado assumindo um número de agregação de 50,6 e um diâmetro de $44 \text{ \AA}$), e o mesmo valor de h . No cálculo do número de anfifílicos formando micelas, foi descontada a quantidade de anfifílicos livres em solução ($N = N_A V_{\text{tot}}(c - \text{cmc})$, onde N_A é o número de Avogadro, c a concentração de anfifílico e $\text{cmc} = 8 \text{ mM}$ em água pura).

O cálculo do potencial de superfície foi feito somente na região de transição, entre $T_{\text{m}^{\text{on}}}$ e $T_{\text{m}^{\text{off}}}$, devido à dificuldade de subtração nas fases vizinhas; na gel, pelos sinais livre e imobilizado serem muito parecidos, e na fluida, pela dificuldade de julgar a qualidade do sinal subtraído, que era também um sinal composto. O cálculo de Ψ_0 foi feito utilizando os valores de partição obtidos experimentalmente nas micelas de SDS, e para as diferentes condições de força iônica em DMPG a 30°C . Os resultados estão mostrados na Tabela IV.4.

Tabela IV.4

Sistema	força iônica, n (mM)	P	Ψ_0 (mV)
10 mM DMPG em			
água	0,1*	0,95	-237
tampão Hepes	4	0,75	-189
+ 2 mM NaCl	6	0,60	-171
+ 5 mM NaCl	9	0,40	-150
+ 10 mM NaCl	14	0,25	-132
12 mM SDS	0,1*	0,90	-220

* concentração de dCAT1, já que em água pura a força iônica é da ordem de $0,001 \text{ mM}$ ($10^{-\text{pH}}$).

O potencial de superfície decresce com a força iônica, seguindo a tendência mostrada pela partição P . Esse método de medida de Ψ_0 é sensível, portanto, dentro de uma certa faixa de força iônica, dada a concentração lipídica. A amostra em alta força iônica (100 mM NaCl) estava abaixo

do limite inferior de sensibilidade do método, pois não foi observada uma quantidade considerável de dCAT1 na superfície de DMPG. De fato, nessa força iônica, $\Psi_o \sim -100$ mV (Cevc et al., 1980), um pouco abaixo do limite de sensibilidade.

O fato da partição aumentar em $T_{m^{on}}$ parece indicar um aumento de Ψ_o no início da transição de fase. Entretanto, Ψ_o depende de V_{surf} , que aumenta após a transição de fase, já que a área por cabeça polar aumenta cerca de 25 %. Esse aumento, mesmo grande, não produziria um aumento de um fator 2 ou 3 no valor da partição, como o observado na Fig. IV.28. O aumento de Ψ_o , portanto, parece indicar de fato um aumento na ionização dos grupos fosfato do DMPG, como proposto em Riske et al., 1997. Aparentemente não há uma mudança significativa de Ψ_o após $T_{m^{off}}$.

O potencial medido na superfície de micelas de SDS, $\Psi_o = -220$ mV, é maior que o calculado em Grieser & Drummond, 1988, medido com uma sonda fluorescente, que por ser hidrofóbica, intercala-se na micela: $\Psi_o = -150$ mV. Essa diferença pode resultar de diferentes localizações das diferentes sondas utilizadas, unida à dificuldade de determinação de uma superfície na micela, ou mesmo por perturbações causadas pela presença da sonda fluorescente. Além disso, pequenas variações na força iônica podem levar a grandes variações do valor de Ψ_o .

Podemos propor, portanto, que em $T_{m^{on}}$ um processo é disparado tendo como consequência um aumento no grau de ionização da superfície e portanto, no potencial de superfície Ψ_o , que só é completado por volta de 30 °C. O conseqüente aumento da repulsão eletrostática entre cabeças polares vizinhas, pode ter importantes implicações no empacotamento do DMPG, além de disparar o início do processo de fusão das cadeias hidrocarbônicas, que só será terminado acima de $T_{m^{off}}$. O aumento do potencial eletrostático pode também aumentar a repulsão entre vesículas de DMPG, como proposto em nosso primeiro trabalho em função dos dados obtidos com espalhamento de luz a vários ângulos. Entretanto, é importante lembrar que o comprimento de Debye (Eq. A.1.17), que define o raio da interação eletrostática, é somente da ordem de 50 Å em 6 mM força iônica, e esperamos distâncias inter-vesiculares da ordem de 500 a 1000 Å. O comprimento de Debye λ_D depende somente da força iônica, e será certamente relevante em dispersões de DMPG em água pura, onde $\lambda_D \sim 1000$ Å.

Comparação com o modelo de Gouy-Chapman-Stern

O modelo de Gouy-Chapman (Apêndice A.1), tem sido amplamente utilizado para calcular Ψ_o a partir da força iônica do meio (n) e do grau de dissociação do lipídio (α). Este depende da associação, ou adsorção, de íons à superfície lipídica, como tratado por Stern. Dessa forma, o modelo é chamado de Gouy-Chapman-Stern. Embora esse modelo tenha várias limitações e aproximações, utilizamos os valores calculados a partir dele (Eq. A.1.21), para compararmos com

os dados de Ψ_o obtidos experimentalmente para o DMPG em diferentes forças iônicas, com o dCAT1.

Para o cálculo de Ψ_o pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern, foi utilizado também $A = 60 \text{ \AA}^2$, uma constante de associação do próton, $K_H = 15,8 \text{ M}^{-1}$ (Toko & Yamafuji, 1980 e a partir de Watts et al., 1978), correspondendo a praticamente todos os grupos fosfato dissociados em pH neutro, e $\epsilon = 80$ (constante dielétrica da água). Dois valores diferentes do grau de dissociação α , correspondendo a dois valores distintos de K_{Na} (constante de associação do sódio) foram usados, na tentativa de um melhor ajuste dos dados. A dependência de Ψ_o com a força iônica obtida experimentalmente e com dois ajustes utilizando o modelo de Gouy-Chapman-Stern estão mostrados na Fig. IV.29.

Fig. IV.29 - Valores de Ψ_o calculados da partição do marcador dCAT1 em bicamadas de DMPG em diferentes forças iônicas a 30 °C. Duas curvas teóricas calculadas pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern são mostradas para comparação, utilizando $K_{Na} = 0,17 \text{ M}^{-1}$ correspondendo a $\alpha = 0,33$ e $K_{Na} = 0,84 \text{ M}^{-1}$ correspondendo a $\alpha = 0,52$.

Embora os valores obtidos pelos dois métodos sejam semelhantes em magnitude, a dependência com a força iônica é muito diferente. É importante ressaltar que os trabalhos na literatura que utilizam o modelo de Gouy-Chapman, na maioria dos casos, trabalham em forças iônicas maiores ou da ordem de 100 mM, enquanto este trabalho está centrado na região de baixa força iônica. As duas curvas teóricas mostradas na Fig. IV.29 foram obtidas assumindo dois valores distintos da constante de associação do sódio, e portanto dois graus de dissociação α distintos: $K_{Na} = 0,17 \text{ M}^{-1}$ ($\alpha = 0,52$) e $K_{Na} = 0,84 \text{ M}^{-1}$ ($\alpha = 0,33$). Esses valores, embora muito diferentes entre si, encontram-se no intervalo de valores propostos na literatura (Eisenberg et al., 1979; Loosley-Millman et al., 1982; Lakhdar-Ghazal et al., 1983; Helm et al., 1986; Lakhdar-Ghazal & Tocanne,

1988 e Tocanne & Tessié, 1990). No trabalho de mestrado (Riske et al., 1997) propusemos que um aumento do grau de ionização de 0,6 para 0,4 em $T_{m^{on}}$ seria suficiente para causar um aumento relevante no valor de Ψ_o . Vemos que os valores de α obtidos dos dados com o marcador dCAT1 também apontam um grau de ionização da ordem de 0,4 acima de $T_{m^{on}}$. Infelizmente, os dados com dCAT1 não nos permitiram calcular com confiabilidade Ψ_o na fase gel.

Na Fig. IV.29 não está colocado o ponto experimental calculado de dispersões de DMPG em água pura. Como já ficou claro, esta condição é bastante complexa. Além disso, o pH da água é em geral um pouco mais ácido que o das soluções tamponadas, e portanto não teria sentido incluir esse ponto no mesmo gráfico. Para comparar o valor de Ψ_o obtido experimentalmente no caso do DMPG em água pura, com o do modelo de Gouy-Chapman-Stern, foi necessário levar em conta a força iônica devido à presença de 0,1 mM dCAT1, carregado positivamente. O valor obtido pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern foi $\Psi_o = -276$ mV e $\alpha = 0,39$ (considerando $[Na^+]_{\infty} = 0$, $K_{dCAT1} = 0$, $n = 0,1$ mM) para ser comparado com $\Psi_o = -237$ mV da Tabela IV.4. Por outro lado, considerando DMPG em água pura na ausência do marcador teríamos um potencial de superfície muito maior, devido à baixíssima força iônica, mas um grau de dissociação menor, já que uma maior quantidade de prótons seria atraída pelo maior potencial de superfície da membrana nesse caso. Os valores obtidos seriam: $\Psi_o = -317$ mV e $\alpha = 0,14$ (considerando $[Na^+]_{\infty} = 0$, $n = 10^{-pH} \approx 0,0025$ mM). É importante ter em mente que dispersões de DMPG em água pura apresentam um comportamento muito complexo, ainda longe de ser entendido. Além disso, quanto menor a força iônica, mais forte é a dependência do valor de Ψ_o com a força iônica. Nas outras forças iônicas, a presença de 0,1 mM dCAT1 é desprezível frente à concentração de sódio.

DMPG em presença de peptídeos catiônicos

(colaboração com os estudantes de doutorado do grupo de Biofísica do IFUSP Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turciello)

A presença dos peptídeos catiônicos α -MSH (carga líquida +1) e Bradicinina (carga líquida +2) altera o comportamento térmico do DMPG, conforme discutido com o marcador de spin 16-PCSL. Como esses dois peptídeos são carregados positivamente, pretendíamos estudar a superfície lipídica de DMPG em presença desses peptídeos, para monitorar possíveis mudanças no potencial de superfície Ψ_o e nas propriedades de superfície do DMPG. Esse é ainda um estudo preliminar, mas que trouxe algumas contribuições interessantes ao estudo da interação de peptídeos com bicamadas de DMPG.

Primeiramente, o marcador de spin dCAT1 localiza-se em posições mais superficiais da membrana, quando em presença dos peptídeos, o que pode ser consequência da rigidez imposta pela presença destes na superfície lipídica, ou por um efeito de repulsão eletrostática entre marcador e peptídeo. A diferente localização do marcador, quando em presença dos peptídeos catiônicos, é sentida tanto pelo maior valor de a_o medido dos espectros, quanto pela maior liberdade de movimento (menor $\tau_{\perp}$). É interessante ressaltar que nenhuma variação considerável de a_o (Fig. IV.26) e $\tau_{\perp}$ (Fig. IV.27) foi observada com a adição de NaCl, enquanto, pela Tabela IV.5, seja evidente em presença dos peptídeos catiônicos, mostrando um efeito específico da interação peptídeo/lipídio. A partição diminui com a adição de 10 mol% α -MSH, mas permanece praticamente inalterada com a adição da mesma proporção de Bradicinina, apesar desta última possuir uma carga líquida +2, enquanto o α -MSH possui apenas uma carga +1. Esse fato parece refletir aspectos diferentes da interação peptídeo/lipídio, além da interação eletrostática. Os valores de a_o , $\tau_{\perp}$ e Ψ_o obtidos em DMPG na ausência e presença de 10 mol% de α -MSH e Bradicinina estão mostrados na Tabela IV.5.

Tabela IV.5

	a_o (G)	$\tau_{\perp}$ (ns)	Ψ_o (mV)
DMPG	16,33 $\pm$ 0,08	1,2 $\pm$ 0,2	- 171
+ 1 mM Bradicinina	16,52 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,2	- 166
+ 1 mM α - MSH	16,53 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,2	- 145

Os valores mostrados na tabela foram obtidos dos espectros a 30 °C.

O efeito mais interessante dos peptídeos nos espectros de dCAT1 em presença de DMPG, ocorre a altas temperaturas, na fase fluida do DMPG puro (acima de T_{m}^{off}). Como visto na Fig. IV.25, os espectros de dCAT1 na fase fluida do DMPG mostram um sinal de superfície complexo que deve ser devido a diferentes localizações do marcador na superfície lipídica, muito diferente dos obtidos na fase intermediária que eram atribuídos a um sítio só. A presença dos peptídeos, curiosamente, faz com que os espectros permaneçam com o mesmo perfil da fase intermediária, ou seja, como um sinal superficial único. Espectros de superfície relativos a mais de um sítio, que caracterizavam a fase fluida do DMPG (Fig. IV.25), não aparecem em presença do α -MSH ou da Bradicinina a nenhuma temperatura, como mostra a Fig. IV.30 para 50 °C. Isso pode ser consequência da rigidez imposta pelo peptídeo, que diminuiria as flutuações da bicamada na fase fluida. Entretanto, como já discutido a partir dos resultados com o 16-PCSL, a presença desses

peptídeos parece favorecer a fase intermediária e inibir T_{m}^{off} . Os resultados obtidos com o marcador dCAT1 sustentam essa hipótese.

Fig. IV.30 - Espectros subtraídos de 0,1 mM dCAT1 em presença de 10 mM DMPG em Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl e com adição de 1 mM Bradicinina e α -MSH a 50 °C. Varredura total: 50 G.

Resultados preliminares com o fosfolípido DPPG, que possui duas cadeias com 16 carbonos cada e que não apresenta a fase intermediária (Schneider et al., 1999), mostram espectros de dCAT1 na fase fluida semelhantes aos obtidos acima de T_{m}^{off} em DMPG. Em nenhuma temperatura foram obtidos espectros de dCAT1 em presença de DPPG que se assemelhassem aos obtidos na fase intermediária do DMPG. Portanto, a existência de um sinal relativo à população na superfície com um caráter de sinal único, é característica da fase intermediária do DMPG (entre T_{m}^{on} e T_{m}^{off}). Podemos sugerir que o empacotamento peculiar da superfície lipídica na fase intermediária proporciona uma sítio estável para a localização da molécula de dCAT1. Seria interessante estudar outros lipídios carregados com o marcador de superfície dCAT1.

IV.1.4 - Anisotropia de fluorescência

Medidas de anisotropia de fluorescência também têm sido utilizadas para monitorar o empacotamento de bicamadas lipídicas (Shinitzky & Inbar, 1974; Pottel et al., 1983; Stubbs et al., 1976). A medida de anisotropia, discutida na seção II.2, reflete o quanto o marcador fluorescente consegue se movimentar no interior de bicamadas lipídicas na escala de tempo da fluorescência (da ordem de ns). O DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) é um dos marcadores mais utilizados em medidas de anisotropia, tanto com fluorescência estática quanto com resolução temporal. A medida de anisotropia de fluorescência fornece informações semelhantes às obtidas com marcadores de spin de membrana, tais como o 14 e 16-PCSL mostrados na seção IV.1.3i.

Como a fluorescência é uma medida ótica, o espalhamento de luz é sempre um inconveniente. Dispersões de DMPG em baixa força iônica apresentam um alto espalhamento abaixo de $T_{m^{on}}$ e acima de $T_{m^{off}}$ (Fig. IV.2). Para minimizar o efeito do espalhamento de luz, as medidas de anisotropia tiveram que ser feitas em uma concentração lipídica menor. Para o estudo do DMPC, a turbidez é sempre um grande problema, e, em geral, utilizam-se vesículas unilamelares diluídas.

Fizemos medidas de anisotropia com 1 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl. A região de mobilidade intermediária entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ está ainda mais acentuada pela medida de anisotropia de fluorescência do que por EPR, o que pode ser devido a pequenas diferenças nas escalas de tempo das duas técnicas (ambas são da ordem de ns). Além disso, devido à maior rigidez da molécula DPH (Fig. III.1), é mais provável que ela monitore a membrana como um todo, enquanto os grupos nitroxídeos ligados a moléculas anfifílicas são mais sensíveis à microregião em que se encontram. A anisotropia de fluorescência de DPH, como mostra a Fig. IV.31, começa a diminuir em $T_{m^{on}}$ só terminando em $T_{m^{off}}$. Uma mudança grande em $T_{m^{on}}$, como foi observada com os marcadores de spin, não é sentida pelo DPH. Semelhante ao observado com EPR (Fig. IV.9), a microviscosidade da membrana começa a diminuir um pouco acima de $T_{m^{on}}$, definida como o pico calorimétrico estreito no perfil de DSC (Fig IV.5). Para o fosfolípido DMPC a diminuição da anisotropia é muito grande e brusca em $T_m = 23,6^\circ\text{C}$ (Fig. IV.4).

Fig. IV.31 - Anisotropia de fluorescência de 0,5 mol% DPH incorporado em 1 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl e em 0,1 mM DMPC em Hepes. As baixas concentrações são necessárias para minimizar a influência do espalhamento de luz na medida de fluorescência. $\lambda_{\text{ex}} = 359 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 428 \text{ nm}$.

Fizemos alguns experimentos preliminares de anisotropia de fluorescência do DPH com resolução temporal, o que permite uma estimativa do tempo de correlação τ_c do fluoróforo a partir do decaimento do valor da anisotropia com o tempo (Eq. II.42). Com fluorescência estática, só é possível conhecer o valor médio do valor da anisotropia na escala de tempo da fluorescência (Eq. II.43). Mesmo com apenas essa medida preliminar utilizando fluorescência com resolução temporal, ficou claro que, na fase gel, os tempos de correlação eram muito grandes (da ordem de μs), enquanto que na fase fluida diminuía bastante (ns), como mostra a Fig. IV.32. Na região entre T_{m}^{on} e $T_{\text{m}}^{\text{off}}$, dois tempos de correlação pareciam estar presentes: o da fase gel, que diminui com a temperatura, e um da fase fluida, indicando uma possível coexistência de marcadores em domínios de diferentes microviscosidades.

Fig. IV.32 - Tempos de correlação obtidos da análise do decaimento temporal da anisotropia de fluorescência de 0,2 mol% DPH incorporado em 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl. Acima de 20 °C os decaimentos só puderam ser ajustados pela soma de duas exponenciais.

IV.1.5 - Espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS)

(colaboração com a Prof^a. Dr^a. Lia Queiroz do Amaral do IFUSP)

Muitos sistemas anfifílicos em solução aquosa formam estruturas tais como fases lamelares, hexagonais e cúbicas (Gennis, 1989; Lipowski & Sackmann, 1995; Epand, 1997). As distâncias características dessas estruturas lipídicas são, de no mínimo 50 Å, sendo portanto bem monitoradas por espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS) (Wiener et al., 1989; Wiener & White, 1992; Nagle et al., 1996). Em vesículas multilamelares, ou em fases lamelares (L_α ou L_β), os lipídios organizam-se mantendo uma camada de água entre suas lamelas. A distância de repetição, caracterizada pela espessura da membrana somada à da camada de água, gera um padrão de difração de Bragg detectado pela técnica de SAXS. As bicamadas lipídicas possuem regiões de diferentes densidades eletrônicas, já que os lipídios são compostos por uma cabeça polar e por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas, que quando empacotados em bicamadas criam regiões de diferentes densidades eletrônicas. A região das cabeças polares é, em geral, mais densa que o meio aquoso. A técnica de SAXS será sensível ao contraste de densidade eletrônica da membrana com o meio aquoso.

Utilizamos essa técnica para o estudo das bicamadas de DMPG em função da temperatura e força iônica do meio, para estudar as mudanças estruturais nas bicamadas lipídicas que poderiam estar ocorrendo em T_m^{on} e T_m^{off} . Para comparação, obtivemos também curvas de SAXS do fosfolipídio DMPC. Na condição de força iônica baixa, na qual está presente a fase intermediária, foi possível aplicar um modelo para a bicamada lipídica e explicar as variações nas curvas de SAXS observadas experimentalmente em função de variações no contraste eletrônico da bicamada (Riske et al., 2001). As curvas obtidas com DMPG em alta força iônica não apresentaram um pico de difração semelhante ao observado com DMPC, mas podem indicar o início de formação de multilamelas.

DMPC

INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: 3511 ex. 1

O DMPC tem sido amplamente estudado por diversas técnicas, inclusive por SAXS. Em geral, esse lipídio forma vesículas multilamelares ou fases lamelares em meio aquoso. A Fig. IV.33 mostra curvas de SAXS do DMPC em função do vetor de espalhamento $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ (2θ sendo o ângulo de espalhamento) para diferentes temperaturas. Os picos observados (q_{max}) indicam a presença de vesículas multilamelares. A distância de repetição ($d = 2\pi/q_{max}$) encontrada na Fig. IV.33 foi de 74 Å na fase gel e 66 Å na fase fluida, concordando com dados da literatura (Marsh, 1990). A diminuição da distância de repetição após T_m reflete a diminuição da espessura da

membrana na fase fluida. A camada de água permanece, em geral, constante, desde que o lipídio esteja completamente hidratado. Espera-se que a bicamada de DMPC tenha uma espessura de cerca de 46 Å na fase fluida, e que portanto a camada de água seja da ordem de 20 Å. Dos nossos dados, entretanto, não foi feita uma análise minuciosa para determinar a espessura da membrana, mesmo porque já existem vários estudos de SAXS com o DMPC, e nossa medida foi feita no sentido de ter um controle. A diminuição da intensidade do pico com a temperatura pode ser devida à precipitação de algumas vesículas de DMPC.

Fig. IV.33 - Curvas de SAXS obtidas de amostras de 10 mM DMPC em 10 mM Hepes pH 7,4 em diferentes temperaturas. As curvas foram corrigidas pela resposta do detetor e pela atenuação da amostra e o espalhamento devido ao tampão foi subtraído.

DMPG em baixa força iônica

Curvas de SAXS foram obtidas com amostras de 50 mM DMPG em 10 mM Hepes pH = 7,4 + 2 mM NaCl. Resultados semelhantes foram obtidos com 10 mM DMPG, entretanto, devido à baixa relação sinal/ruído destes, somente as curvas obtidas na concentração maior puderam ser analisadas. As medidas foram feitas entre 10 e 45 °C em três amostras diferentes. A faixa analisada do vetor de espalhamento q foi de 0,012 a 0,5 Å⁻¹, correspondendo a distâncias entre 10 e 500 Å ($d = 2\pi/q$). Devido à influência do feixe direto em ângulos muito pequenos e à presença de um pico espúrio devido às janelas do kapton no caminho de vácuo na região de q maior, os dados foram analisados entre 0,03 e 0,35 Å⁻¹.

As curvas de SAXS obtidas em função da temperatura mostram um pico largo em torno de $0,12 \text{ \AA}^{-1}$. Esse pico largo é típico de bicamadas não-correlacionadas, e aparece devido às diferenças da densidade eletrônica entre o interior da bicamada e o meio aquoso. Nenhum pico de difração, correspondente às fases lamelar, cúbica ou hexagonal, ou qualquer outra fase conhecida, foi observado para o DMPG. A presença de cargas da superfície da membrana provavelmente impede a organização de estruturas lamelares, na qual as membranas ficam relativamente próximas.

A Fig. IV.34 mostra as curvas de SAXS obtidas para três amostras diferentes com variação de temperatura. As curvas a temperaturas menores que $T_{m^{on}}$, portanto na fase gel, estão centradas em $q_{max} = 0,120 \pm 0,002 \text{ \AA}^{-1}$. Entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ a curva vai perdendo intensidade e q_{max} vai deslocando-se para valores maiores. Após $T_{m^{off}}$ as curvas atingem $q_{max} = 0,135 \pm 0,002 \text{ \AA}^{-1}$ e a intensidade aumenta bruscamente, após ter chegado a um mínimo um pouco abaixo de $T_{m^{off}}$. Esse efeito não pode ser devido a uma possível precipitação dos agregados de DMPG, já que um depósito de material, como o observado em dispersões de DMPC, nunca foi observado com DMPG. Além do mais, a intensidade é parcialmente recuperada acima de $T_{m^{off}}$. O valor de $T_{m^{off}}$ variou de amostra para amostra ($28 - 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$), como já observado anteriormente (seção IV.1.1 e Riske et al., 1999). A forma das curvas nas fases gel e fluida são visivelmente diferentes, principalmente se olharmos o lado direito do pico. As curvas entre T_p (pré-transição) e $T_{m^{on}}$ são praticamente idênticas às obtidas abaixo de T_p , entretanto o mínimo entre o pico e a subida para o feixe direto é menos pronunciado que abaixo de T_p .

Fig. IV.34 - Curvas de SAXS obtidas de três amostras diferentes de 50 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl, em diferentes temperaturas. As curvas foram corrigidas pela resposta do detetor e pela atenuação da amostra e o espalhamento devido ao tampão foi subtraído.

A posição do pico ($q_{\max}$) e sua intensidade ($I_{\max}$), medidas nas curvas das três amostras em função da temperatura, estão mostradas na Fig. IV.35. Nesta figura fica evidente o deslocamento de $q_{\max}$ entre os valores das fases gel ($T < T_{m^{\text{on}}}$) e fluida ($T > T_{m^{\text{off}}}$), evidenciando mais uma vez a existência de uma região de transição nesse intervalo de temperatura. $I_{\max}$, por outro lado, apresenta um comportamento peculiar, pois não apresenta um decréscimo contínuo entre os valores das fases gel e fluida, mas sim um mínimo um pouco abaixo de $T_{m^{\text{off}}}$. O processo iniciado em $T_{m^{\text{on}}}$ leva a um gradual decréscimo na intensidade de SAXS, que é parcialmente recuperada em $T_{m^{\text{off}}}$. É interessante notar a correlação entre o comportamento de $I_{\max}$ e da intensidade de luz espalhada com a temperatura (Fig. IV.2), pois ambas apresentam um decréscimo fora do comum na região de transição entre $T_{m^{\text{on}}}$ e $T_{m^{\text{off}}}$. A intensidade de luz espalhada, entretanto, apresenta mudanças mais bruscas nas duas temperaturas.

Fig. IV.35 - Posição $q_{\max}$ (em cima) e intensidade $I_{\max}$ (em baixo) medidas nas curvas de SAXS de 50 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl (Fig. IV.34). O erro na medida de $q_{\max}$ foi estimado em $1,5 \times 10^{-3} \text{\AA}^{-1}$, e foi omitido para que os valores médios obtidos para as três amostras pudessem ser melhor visualizados. O erro na medida de $I_{\max}$ é menor que o tamanho dos símbolos.

O que pode causar essa diminuição fora do comum na intensidade de SAXS? Uma pequena diminuição deve ser esperada com a transição de fases gel - cristal-líquido, e é o observado entre os

valores de $I_{\max}$ abaixo de $T_{m^{on}}$ e acima de $T_{m^{off}}$, associado à pequena perda de contraste eletrônico quando a membrana passa do estado gel para o fluido. Entretanto, o baixo espalhamento de raio-X um pouco abaixo de $T_{m^{off}}$ deve estar ligado a propriedades particulares da fase intermediária.

Existem várias causas possíveis para a diminuição da intensidade espalhada de raio-X de baixo ângulo:

- i) Interferência entre unidades espalhadoras. Entretanto, um decréscimo dessa ordem deveria estar relacionado a um pico de correlação em q menor, o que não é observado. É possível que hajam picos de correlação em valores de q fora do limite inferior aqui analisado, mas nesse caso esses picos não produziram mínimos na região observada, devido a efeitos como a polidispersidade.
- ii) Mudança na simetria do objeto. Para explicar o grande decréscimo de $I_{\max}$ seria necessária uma mudança muito grande na simetria do objeto (Teixeira et al., 2000).
- iii) Decréscimo no contraste de densidade eletrônica da bicamada. Essa seria a maneira mais simples, já que, como dito no início desta seção, o pico largo observado para o DMPG provém de diferenças no contraste eletrônico com a solução aquosa. É razoável, portanto, supor que diminuições na intensidade desse pico sejam um resultado de uma diminuição no contraste eletrônico da bicamada lipídica.

Análise das curvas de SAXS

Para modelagem das curvas experimentais foi utilizada uma expressão desenvolvida por Porod para o espalhamento de raio-X de baixo ângulo por uma partícula plana (Eq. A.3.5). Essa expressão é proporcional a $F_t^2(q)/q^2$, onde $F_t(q)$ é o fator de forma transversal da bicamada. Esse modelo está descrito com detalhe no Apêndice A.3 e a base teórica na seção II.2. A bicamada lipídica é representada como uma função degrau com três regiões distintas de densidade eletrônica (com comprimento R_i e densidade eletrônica ρ_i): as cabeças polares (R_1, ρ_1), as cadeias acila $(CH_2)_n$ (R_2, ρ_2) e o grupos metila CH_3 no final da cadeia (R_3, ρ_3). Embora o perfil de densidade eletrônica de bicamadas não contenha de fato mudanças bruscas na densidade eletrônica, essa é uma maneira simples de modelar a bicamada e que tem apresentado bons resultados (Wiener et al., 1989 e 1991). Escolhemos três curvas para serem ajustadas pela Eq. A.3.5: uma abaixo de $T_{m^{on}}$ (10 °C), uma entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ (27 °C), a curva que apresentava a menor intensidade, e outra acima de $T_{m^{off}}$ (35 °C), todas curvas da amostra 1 (Fig. IV.34). As curvas experimentais e seus respectivos ajustes teóricos estão mostrados na Fig. IV.36.

Fig. IV.36 - Curvas de SAXS e seus respectivos ajustes teóricos (em preto). 50 mM DMPG em 10 mM Hepes + 2 mM NaCl. $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T < T_p$), $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{m^{on}} < T < T_{m^{off}}$) e $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T > T_{m^{off}}$). Os parâmetros dos ajustes estão mostrados na Tabela IV.6 e Fig. IV.37. As curvas foram deslocadas para uma melhor visualização.

Como as curvas teóricas dependiam de oito parâmetros, muitas eram as soluções que geravam um ajuste razoável. Para descartar soluções fisicamente inconsistentes, vínculos específicos foram impostos. A mesma constante de normalização c foi usada nas três curvas, garantindo o mesmo número de objetos espalhadores para todas as temperaturas. Os parâmetros estruturais da bicamada (R_i e ρ_i) foram obrigados a variar dentro de intervalos consistentes com valores encontrados na literatura (Quinn et al., 1995; McIntosh & Simon, 1986; Wiener et al., 1989; Nagle et al., 1996; Sun et al., 1996; Kodama et al., 1997; Tristram-Nagle et al., 1998 e Petrache et al., 1998). Foi verificada a necessidade de incluir o grupo metila com uma densidade diferente do resto da cadeia hidrocarbônica.

Com a aplicação desses vínculos, foi possível avaliar as possíveis mudanças estruturais envolvidas nas transições de fase do DMPG. Os grupos de parâmetros que geraram bons ajustes mostraram pequenas variações em seus valores, e uma tendência evidente pôde ser observada. Em todos os ajustes obtidos, uma clara diminuição no contraste de densidade eletrônica ocorre na curva a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ (diminuição de ρ_1 e aumento de ρ_3). A curva na fase fluida ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$) mostrou uma clara diminuição no comprimento da cadeia R_2 , consistente com a diminuição de espessura esperada após a transição de fase. Em geral, a amostra a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou valores intermediários de R_2 .

Um grupo de parâmetros típicos, que resultou nos ajustes mostrados na Fig. IV.36, estão listados na Tabela IV.6 e os respectivos perfis de densidade eletrônica da bicamada estão ilustrados na Fig. IV.37.

Tabela IV.6

	R_1 (Å)	R_2 (Å)	R_3 (Å)	t (Å)	ρ_1 (e/Å ³)*	ρ_2 (e/Å ³)*	ρ_3 (e/Å ³)*
10 °C	10,0	12,8	3,3	52,2	0,46	0,32	0,21
27 °C	10,0	12,1	3,0	50,2	0,40	0,32	0,25
35 °C	10,0	8,9	3,5	44,8	0,45	0,29	0,19

$c = 0,012$, $n = 2$, $t = R_1 + R_2 + R_3$ representa o comprimento total da bicamada.

* Os valores absolutos foram obtidos considerando a densidade eletrônica da água $\rho_w = 0,33$ e/Å³ (Nagle et al., 1996) e fixando a densidade eletrônica da cadeia (CH₂)_n na fase gel $\rho_2^{\text{gel}} = 0,32$ e/Å³ (Wiener et al., 1989).

Fig. IV.37 - Perfis de densidade eletrônica $\rho(x)$ da bicamada que geram os melhores ajustes das curvas experimentais da Fig. IV.36. As linhas tracejadas representam o nível ρ_w (densidade eletrônica do meio aquoso). Os perfis estão deslocados para uma melhor visualização.

Foi modelada também uma curva a 15 °C (entre T_p e $T_{m^{on}}$). Para tal, foi necessária a soma de dois ajustes com diferentes valores de $(R_2 + R_3)$, um deles um pouco menor e o outro um pouco maior que os apresentados na Tabela IV.6 para a amostra a 10 °C, podendo estar ligado à presença de uma fase ondulada (*ripple*) entre essas duas temperaturas.

O ajuste das curvas mostrou que as diferenças básicas entre a amostra a 10 e 35 °C são uma diminuição de R_2 e ρ_2 e uma pequena diminuição de ρ_1 , consistentes com resultados obtidos na literatura de perfis de densidade eletrônica antes e depois da transição principal (MacIntosh & Simon, 1986). Os valores de R_2 obtidos dos ajustes da curva a 27 °C mostram que a espessura da bicamada apresenta um valor intermediário entre as fases gel e fluida. Entretanto, o baixo valor de ρ_1 e R_3 e o alto valor de ρ_3 , apontam um menor contraste eletrônico. Os parâmetros estruturais do grupo metila parecem indicar uma pequena interdigitação das monocamadas que formam a membrana. O grande decréscimo de ρ_1 a 27 °C ($\Delta\rho$ decresce quase um fator 2) pode advir de uma separação entre as cabeças polares. Um aumento contínuo de até 6,5% na distância entre as cabeças polares após $T_{m^{on}}$ seria suficiente para explicar essa diminuição de ρ_1 um pouco abaixo de $T_{m^{off}}$.

Como visto na seção IV.1.3ii o potencial de superfície Ψ_o , aumenta após $T_{m^{on}}$. Esse aumento foi explicado em termos de um aumento do grau de ionização da membrana causado por uma aumento na dissociação do sódio, contra-íon do DMPG (Riske et al., 1997 e 1999). A saída de sódios não representa uma diminuição grande na densidade eletrônica da cabeça polar do DMPG, mesmo porque, muito provavelmente, é substituído por moléculas de água. No entanto, o efeito mais evidente seria um aumento considerável da repulsão eletrostática entre cabeças polares vizinhas, o que tenderia a separá-las, explicando a diminuição da densidade eletrônica nessa região.

É provável, portanto, que a saída de sódios em $T_{m^{on}}$ dispare um processo de separação das cabeças, que conseqüentemente vai levar a um rearranjo gradual das cadeias hidrocarbônicas, iniciando o processo de fusão, e impondo um empacotamento não usual à membrana na fase intermediária. Somente após $T_{m^{off}}$, as cadeias e cabeças polares se rearranjam numa fase fluida.

Alta força iônica

Para verificar o efeito da força iônica, resultados preliminares de SAXS em presença de 100 e 500 mM NaCl serão mostrados aqui. Nessas altas forças iônicas não existe uma região de transição caracterizada por um baixo espalhamento de luz e as curvas de DSC apontam uma transição gel - cristal-líquido estreita em T_m , semelhante ao comportamento observado com DMPC.

Primeiramente foram obtidas curvas de SAXS com 10 mM (Fig. IV.38a) e 50 mM (Fig. IV.38b) DMPG na presença de 100 mM NaCl. Nessa condição $T_m = 22,4$ °C (Fig. IV.6).

Fig. IV.38 - Curvas de SAXS de a) 10 mM e b) 50 mM DMPG em 10 mM Hepes + 100 mM NaCl a várias temperaturas. As curvas foram corrigidas pela resposta do detetor, pela atenuação da amostra e o espalhamento devido ao tampão foi subtraído.

Nos dois gráficos, vemos que as curvas de SAXS apresentam um comportamento misto com a presença de um pico muito pronunciado em $0,12 \text{ \AA}^{-1}$ superposto a um pico largo semelhante aos observados em baixa força iônica. Esse comportamento é bem mais evidente na amostra mais concentrada devido à melhor estatística, mas também porque a proporção desses dois picos é diferente nas duas concentrações lipídicas. Na amostra mais diluída, o pico estreito é mais marcante que o pico largo. O pico mais estreito em $q = 0,12 \text{ \AA}^{-1}$ pode estar associado a uma distância de repetição de $52 \text{ \AA}$, ou seja, praticamente somente a espessura da bicamada, sem nenhuma camada considerável de meio aquoso entre as lamelas. O pico de segunda ordem em $0,24 \text{ \AA}^{-1}$ não seria detectado por localizar-se em um mínimo do fator de forma. Vale lembrar que na Fig. IV.33 foi encontrado um pico de difração para o DMPC em $q = 0,095 \text{ \AA}^{-1}$, correspondendo a uma distância de repetição de $66 \text{ \AA}$ na fase fluida. Entretanto, é possível que o pico detectado seja algum pico de ordem maior, e o de primeira ordem estaria numa região de q mascarada pelo feixe direto ou pelo mínimo do fator de forma. Nesse caso teríamos uma distância de repetição bem maior, o que estaria de acordo com a presença de um potencial de superfície ainda considerável mesmo em 100 mM NaCl ($\Psi_0 \sim -100 \text{ mV}$). O aumento da temperatura causa uma diminuição

considerável na intensidade do pico, e um pequeno deslocamento em sua posição para valores maiores de q .

Os picos largos, bem mais evidentes nas curvas obtidas com 50 mM DMPG em alta força iônica (Fig. IV.38b), são muito semelhantes aos obtidos em baixa força iônica nas fases vizinhas à intermediária. As curvas de DMPG em alta força iônica na fase gel (15 e 17 °C) estão centradas em torno de $0,120 \text{ \AA}^{-1}$ e são muito parecidas com as curvas abaixo de $T_{m^{on}}$ na amostra em 2 mM NaCl (Fig. IV.34). Nas curvas na fase fluida (25 - 45 °C), o pico está centrado em valores maiores de q ($= 0,135 \text{ \AA}^{-1}$) com uma intensidade um pouco menor. Esses picos são praticamente idênticos aos obtidos em 2 mM NaCl acima de $T_{m^{off}}$. As curvas de baixa intensidade, características da região entre $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ na amostra de baixa força iônica, não aparecem em presença de 100 mM NaCl a nenhuma temperatura. A Fig. IV.39 compara as curvas a 10 e 45 °C obtidas em alta e baixa força iônica, mostrando que o pico largo é idêntico nas duas condições de força iônica. A 10 °C está mostrado também o pico estreito obtido da amostra 10 mM DMPG em 100 mM NaCl (Fig. IV.38a), mostrando que ele é o mesmo nas duas concentrações lipídicas.

Fig. IV.39 - Comparação das curvas de SAXS obtidas em baixa (2 mM NaCl) e alta (100 mM NaCl) força iônica. *Esquerda.* $T = 10 \text{ °C}$ (fase gel). A curva de 50 mM DMPG em 100 mM NaCl é mostrada como uma superposição das curvas de 10 mM DMPG em 100 mM NaCl (somente a parte do pico estreito dessa curva está mostrada) com a curva obtida com 50 mM DMPG em 2 mM NaCl. *Direita.* $T = 45 \text{ °C}$ (fase fluida). As curvas em alta e baixa força iônica são iguais na amostra de 50 mM DMPG. A curva de 10 mM DMPG em 100 mM NaCl não está mostrada. As curvas foram normalizadas para que pudessem ser comparadas.

O comportamento da componente larga dos picos de SAXS de DMPG em presença de 100 mM NaCl com a temperatura é consistente com todos os outros dados obtidos com outras técnicas, mostrando que, em alta força iônica, a membrana passa direto do empacotamento da fase gel para o da fase fluida, não apresentando o baixo contraste eletrônico característico da fase intermediária. Ainda não está clara, entretanto, a interpretação do pico mais estreito apresentado pelas curvas de SAXS de 10 mM e 50 mM DMPG em 100 mM NaCl. Tentativas preliminares de simulação com o modelo de densidade eletrônica aplicado às curvas de baixa força iônica, mostraram ser impossível o ajuste de um pico tão pronunciado mantendo parâmetros R_i e ρ_i com alguma consistência física. Assim, parece possível a indicação de formação de multilamelas.

Resultados muito interessantes foram obtidos nas amostras de 50 mM DMPG em presença de 500 mM NaCl, embora não seja possível entendê-los ainda. Nessa condição, de acordo com os dados de calorimetria diferencial de varredura, o comportamento térmico do DMPG é praticamente idêntico ao do DMPC, ambos com $T_m = 23,5^\circ\text{C}$ (Fig. IV.4). Entretanto, como mostrado na Fig. IV.40, as curvas de SAXS de DMPG em presença de 500 mM NaCl não apresentaram o padrão característico de vesículas multilamelares como o DMPC (Fig. IV.34). Na fase gel (10°C) dois picos largos se sobrepõem ($q = 0,10$ e $0,14 \text{ \AA}^{-1}$). Na fase fluida ($25 - 45^\circ\text{C}$) o padrão das curvas de SAXS muda bastante, apresentando um pico estreito em $q = 0,07 \text{ \AA}^{-1}$ e outro, menos estreito em $q = 0,15 \text{ \AA}^{-1}$. O padrão obtido não se assemelha a nenhum padrão conhecido de estruturas lipídicas. Uma coexistência de estruturas pode estar ocorrendo, sendo que o pico estreito em $q = 0,07 \text{ \AA}^{-1}$, muito provavelmente, indica a presença de multilamelas com uma distância de repetição de $89 \text{ \AA}$.

Fig. IV.40 - Curvas de SAXS de 50 mM DMPG em 10 mM Hepes + 500 mM NaCl a várias temperaturas. As curvas foram corrigidas pela resposta do detector, pela atenuação da amostra e o espalhamento devido ao tampão foi subtraído.

IV.1.6 - Microscopia Ótica

(colaboração com o Dr. Hans-Günther Döbereiner, MPIKG-Golm, Alemanha)

Microscopia ótica por contraste de fase

A observação ótica de vesículas lipídicas tem revelado interessantes aspectos destas, como por exemplo propriedades elásticas da bicamada (Helfrich, 1974; Lipowsky, 1991; Sackmann, 1994; Döbereiner et al., 1995 e 1997) e a observação de células de seres vivos. Entretanto, para visualização ótica é necessário que as vesículas tenham um diâmetro da ordem de microns. No caso do DMPG, e de muitos outros lipídios, métodos especiais de preparo têm que ser empregados para que as vesículas assumam tais dimensões. Além disso, para o estudo de propriedades elásticas de bicamadas, é necessário que as vesículas analisadas sejam unilamelares.

Vesículas de DMPG preparadas por agitação mecânica, usadas em quase todo esse trabalho, têm diâmetros da ordem de 1000 Å. A observação ótica de uma dispersão de 10 mM DMPG em Hepes + 2 mM NaCl mostrou a existência de uma textura, provavelmente devida à presença de vesículas muito pequenas para serem distinguidas por microscopia ótica, nas fases fluida (acima de T_{m}^{off}) e gel (abaixo de T_{m}^{on}). Na região de transição entre T_{m}^{on} e T_{m}^{off} , entretanto, uma transparência completa foi observada, nenhuma vesícula ou textura sendo distinguida. Essa observação está de acordo com os dados obtidos com espalhamento de luz, nos quais a turbidez da amostra é extremamente reduzida na região de transição (Fig. IV.2).

Vesículas gigantes unilamelares (GUV's), suficientemente grandes para serem visualizadas pelo microscópio ótico, têm sido preparadas por alguns métodos, os mais utilizados sendo eletroformação e *swelling* (incubação de um filme lipídico em alta temperatura, com um período de pré-hidratação), ambos descritos na seção III.2. Este último método, no entanto, forma vesículas gigantes muito diluídas, que não apresentaram o comportamento térmico esperado com a presença de uma larga região de transição, como será discutido na seção IV.2. O outro método, por eletroformação, desde que acima de T_{m}^{off} , possibilitou a formação de vesículas gigantes da ordem de 10 microns de DMPG concentradas, embora a concentração precisa não tenha sido determinada. Nem todas as vesículas eram unilamelares, e vesículas muito pequenas deviam formar-se também, já que uma textura semelhante à observada nas preparações por agitação mecânica, era vista em algumas regiões ou mesmo como fundo para as vesículas gigantes.

Na fase fluida, logo após serem formadas, as vesículas de DMPG apresentavam flutuações térmicas de forma, como esperado (Lipowsky, 1991; Bagatolli & Gratton, 1999). Diminuindo a temperatura abaixo de T_{m}^{off} , um estranho fenômeno acontecia: as bicamadas iam gradualmente desaparecendo, até a dispersão ficar completamente transparente. Curiosamente, ao subir a

temperatura acima de T_m^{off} (desde que não se permanecesse muito tempo na região de transição), as vesículas reapareciam. É muito importante ressaltar que a textura de vesículas pequenas apareciam e desapareciam junto com as vesículas gigantes, o que é uma indicação fortíssima de que estas comportam-se como as pequenas, e portanto, estão mostrando o que ocorre com todas as bicamadas de DMPG em função da temperatura.

A região de transição deve favorecer a reorganização das vesículas gigantes em várias pequenas, pois, se a temperatura é mantida por um tempo razoável (~ 10 minutos) na fase intermediária, nenhuma vesícula gigante é observada com o aumento da temperatura acima de T_m^{off} , e detecta-se apenas a textura de vesículas pequenas. Da mesma forma, diminuindo a temperatura abaixo de T_m^{on} , o que sempre demorava mais de 10 minutos, somente uma textura de vesículas muito pequenas aparece na fase gel. Como as vesículas tinham que ser preparadas na fase fluida, não foi possível a observação de vesículas gigantes na fase gel. A partir do momento em que as vesículas ficam muito tempo na fase intermediária, o aspecto ótico dessa dispersão é muito semelhante ao observado em dispersões lipídicas preparadas por agitação mecânica, conforme discutido acima.

Quando uma vesícula gigante era visualizada tendo como fundo a textura de vesículas pequenas, ficava claro que a vesícula desaparecia e reaparecia no mesmo lugar, evidenciando que a bicamada da vesícula tornava-se óticamente transparente, mas que a vesícula não era destruída para formar outras estruturas. Além disso, a vesícula desaparece gradualmente com a diminuição da temperatura. A Fig. IV.41, uma seqüência de fotos de uma vesícula gigante tendo como fundo uma textura de vesículas pequenas, mostra diversos ciclos por T_m^{off} , mostrando que essa mesma vesícula gigante aparece e desaparece diversas vezes, sem contudo perder sua unidade. Uma vez desfeita, seria altamente improvável que ela se formasse novamente. Como o controle de temperatura não foi possível em todas as amostras, em algumas não foi possível definir qual a temperatura exata. Na Fig. IV.41 está indicado se a temperatura é maior, menor ou da ordem de T_m^{off} , sendo que $T_m^{off} \sim 30^\circ\text{C}$. A Fig. IV.42 mostra uma outra vesícula gigante multilamelar passando por um ciclo de T_m^{off} . Nesta figura fica bem evidente que a textura de fundo e a vesícula gigantes desaparecem juntas.

Fig. IV.41 - Imagens consecutivas de uma vesícula gigante de DMPC em Hepes + 2 mM NaCl passando por vários ciclos através de $T_m^{\text{off}} \sim 30^\circ\text{C}$. Na fase fluida a vesícula é visível, enquanto que na região de transição a amostra é transparente.

Fig. IV.42 - Sequência de fotos de uma vesícula gigante de DMPC em HEPES + 2 mM NaCl. A temperatura foi baixada até que a amostra ficasse transparente e depois aumentada até que a vesícula reaparecesse. Como as temperaturas não puderam ser monitoradas com um termopar nessas preparações, valores aproximados estão mostrados abaixo de cada foto. $T_m^{off} \sim 30^\circ\text{C}$.

A sequência de fotos mostrada na Fig. IV.43 é muito interessante, pois mostra várias vesículas gigantes passando por um ciclo por T_m^{off} . À medida que as vesículas vão sumindo com a diminuição da temperatura, as formas das vesículas também se alteram, semelhante ao observado na 8ª foto da Fig. IV.41. Foi observado com vesículas de DMPC (resultados não mostrados e Bagatolli & Gratton, 1999) que durante a transição a vesícula assume estranhas formas, possivelmente devido à coexistência de domínios na fase gel com domínio fluidos. Portanto, a observação dessas formas no DMPC seria um indício do início da transição fluido-gel. Todas as vesículas aparecem e desaparecem a uma mesma temperatura.

Fig. IV.43 - Sequência de fotos de vesículas gigantes de DMPG em Hepes +2 mM NaCl. As temperaturas estão indicadas em baixo de cada foto. A temperatura, mostrada abaixo de cada foto, foi medida com um termopar em contato com a amostra.

Diluído algumas vesículas gigantes preparadas por eletroformação em uma dispersão de 2 mM DMPG preparado por agitação mecânica o comportamento não se altera, pois as vesículas gigantes desaparecem abaixo de T_m^{off} e reaparecem na fase fluida. A textura da dispersão de vesículas pequenas não é claramente vista, provavelmente devido à baixa concentração lipídica

desta. Uma sequência de fotos mostrando dois ciclos por T_m^{off} está na Fig. IV.44. Depois de cada ciclo por T_m^{off} , as vesículas estão menores, reforçando a idéia de que a fase intermediária facilita um processo de vesiculação, durante o qual vesículas menores se formam de regiões de vesículas maiores (*budding-fission*).

Fig. IV.44 - Sequência de fotos de vesículas gigantes de DMPG diluídas em 2 mM DMPG em HEPES + 2 mM NaCl (preparado por agitação mecânica). A temperatura, mostrada abaixo de cada foto, foi medida com um termopar em contato com a amostra.

Das vesículas aqui mostradas, fica claro que é a bicamada em si que fica opticamente transparente, e num primeiro momento a unidade da vesícula não é perdida. Entretanto, a fase intermediária parece favorecer a quebra das vesículas gigantes em várias pequenas, como as formadas por agitação mecânica. É possível que a presença de regiões de altíssima curvatura,

devido à possível coexistência de domínios fluidos e rígidos e/ou devido ao empacotamento característico da fase intermediária, favoreça a separação de pedaços da vesícula gigante em outras vesículas menores (vesiculação). O processo inverso, de fusão, não parece acontecer.

É interessante correlacionar a observação ótica das vesículas gigantes de DMPG com a descrita em Gershfeld et al., 1986. Embora não sejam mostradas imagens das vesículas de DMPG nesse trabalho, os autores discutem que acima de uma temperatura T^* da ordem de 30 °C, ocorre uma explosão de vesículas no campo do microscópio ótico. Não está claro se eles observam uma textura de vesículas, ou se de fato vesículas gigantes são formadas. Pela nossa experiência, vesículas gigantes não seriam formadas espontaneamente acima de T_{m}^{off} . A explosão de vesículas observada em Gershfeld, 1986, foi interpretada como uma transformação de uma rede tri-dimensional em vesículas. Essa temperatura T^* é provavelmente o que chamamos de T_{m}^{off} . No entanto, como vemos a vesícula desaparecer gradualmente com a diminuição da temperatura, e reaparecer novamente na maioria das vezes, nossa interpretação é que a bicamada perde contraste ótico e fica transparente. Essa perda de contraste foi observada também com espalhamento de raio-X de baixo ângulo, como apresentado na seção anterior, reforçando nossa hipótese. Schneider et al., 1999, por microscopia eletrônica, observam vesículas somente nas fases gel e fluida, e não na intermediária. Muito provavelmente a perda de contraste também impossibilite a observação da bicamada por microscopia eletrônica. Entretanto, é curioso que a medida de índice de refração e do incremento deste com a concentração lipídica (dn/dc) em função da temperatura (Riske et al., 1997), não tenha mostrado um decréscimo considerável na fase intermediária. Talvez essas medidas de índice de refração tenham que ser repetidas com um aparelho mais preciso.

Microscopia ótica de fluorescência

A microscopia ótica de fluorescência tem sido também bastante utilizada no estudo de propriedades de vesículas lipídicas (Holopainen et al., 2001; Bagatolli & Gratton, 1999). Incorporando-se marcadores fluorescentes na bicamada lipídica e com o uso de filtros adequados ou de um laser monocromático, é possível excitar a fluorescência dessas sondas e, através do microscópio, observar a emissão fluorescente da vesícula, que na grande maioria das vezes cai na faixa do visível. A vantagem dessa técnica sobre a microscopia ótica seria poder observar os marcadores fluorescentes inseridos na bicamada lipídica quando esta estivesse opticamente transparente. Para tal, utilizamos a sonda fluoresceína ligada a um fosfolipídio, que portanto insere-se na membrana. Essa sonda absorve (~ 470 nm) e emite (~ 560 nm) em largas bandas, além de não ocorrer efeito de saturação da intensidade de fluorescência (*photo-bleaching*) o que a torna muito propícia a esse tipo de estudo. A imagem por fluorescência, entretanto, é de uma qualidade

inferior à da microscopia por contraste de fase. Por isso, fica complicado separar a fluorescência de vesículas gigantes da obtida como fundo, devido às vesículas pequenas. Várias tentativas de diluição de vesículas gigantes fluorescentes em uma textura não-fluorescente de vesículas pequenas foram feitas, entretanto nenhuma teve êxito total.

Os estudos realizados com essa técnica precisam de um maior investimento experimental para que uma resposta clara ao problema possa ser definida. Uma coisa fica evidente desde já: na região de transição, a membrana não é tão nítida como nas fases vizinhas. Enquanto na fase fluida a membrana é nitidamente distinguida por imagem de fluorescência, na fase intermediária uma imagem difusa é observada. Entretanto, a fluorescência fica localizada em uma região, mesmo que a bicamada não seja nítida. Devido a problemas com as imagens de fluorescência não foi possível mostrar nenhuma figura adquirida com esse método.

IV.2 - DISPERSÕES DILUÍDAS

(colaboração com o Dr. Hans-Günther Döbereiner, MPIKG-Golm, Alemanha)

A existência da fase intermediária está restrita a uma certa faixa de força iônica e concentração lipídica. Conforme discutido durante todo o trabalho, o aumento da força iônica diminui o intervalo de temperatura no qual a transição ocorre, até que desaparece em alta força iônica (~100 mM NaCl). O aumento da concentração lipídica também tem o mesmo efeito, embora não tenhamos constatado o desaparecimento total da fase intermediária. Entretanto, para concentrações lipídicas inferiores a uma certa região de concentração, que chamamos de c' ($c' \leq 0,4 \pm 0,2$ mM DMPG), em baixa força iônica, ocorre uma mudança acentuada no comportamento térmico do DMPG. Nesse regime diluído ($c < c'$), a transição ocorre numa faixa de temperatura mais estreita, e com outro padrão calorimétrico, a transição sendo centrada em uma única T_m , que aumenta até 41 °C com a diluição lipídica. O efeito da força iônica e do pH no regime diluído é muito diferente do apresentado no regime de altas concentrações (entre 0,7 mM e 800 mM DMPG). Nesta seção será mostrado o comportamento do DMPG diluído através das técnicas de anisotropia de fluorescência do DPH, DSC, e microscopia ótica de vesículas gigantes diluídas. Infelizmente, a técnica de EPR não é sensível a essas baixas concentrações lipídicas, pois o marcador de spin tem que ser mantido em uma baixa proporção com relação aos lipídios.

É importante ressaltar a relevância do estudo de dispersões lipídicas carregadas diluídas. Primeiramente, para o cálculo da partição de peptídeos catiônicos em bicamadas negativamente carregadas, a concentração lipídica tem que ser variada e a força iônica mantida baixa, para aumentar a quantidade de peptídeos na superfície da membrana. Como observamos que a T_m aumenta consideravelmente com a diminuição da concentração de DMPG, a diluição lipídica poderia levar à transição gel - cristal-líquido, mesmo a temperatura constante, o que certamente alteraria a interação peptídeo/lipídio. Além disso, estudos com vesículas gigantes observadas com microscopia ótica, podem requerer uma alta diluição lipídica para que somente uma vesícula seja visualizada. É interessante notar também, que as membranas de bactérias possuem cerca de 10 mol% de PG. O comportamento observado para as dispersões diluídas pode ter alguma relevância biológica, já que um pequeno aumento de T_m foi observado mesmo em vesículas de DMPC contendo somente 10 mol% DMPG, em comparação com vesículas puras de DMPC (resultado não mostrado).

A Fig. IV.45 mostra a diferença entre os comportamentos térmicos do DMPG acima e abaixo da região de c' . A curva de DSC da amostra de 1 mM DMPG (Fig. IV.45a) tem o padrão característico do regime de alta concentração, como mostrado na Fig. IV.7: um perfil calorimétrico complexo composto de diversos picos que indicam a região de transição delimitada por T_m^{on} e T_m^{off} . A anisotropia de fluorescência, que indica a microviscosidade da membrana, apresenta um decréscimo gradual de seu valor com a temperatura entre T_m^{on} e T_m^{off} , como também já mostrado (Fig. IV.31). Por outro lado, no regime diluído (abaixo de c'), o DMPG apresenta uma transição de fase mais estreita centrada em torno de 27,5 °C (Fig. IV.45b). O padrão de DSC é mais simples que o apresentado por dispersões no regime de alta concentração, e observa-se claramente que a transição ocorre em torno de uma temperatura única, T_m , sem a existência de picos característicos marcando o início e o final da transição. Os valores de anisotropia decrescem bastante em torno de T_m e a transição é mais estreita que a observada na Fig. IV.45a.

Fig. IV.45 - Valores de anisotropia de fluorescência de 0,5 mol% DPH (■) e curvas de DSC (—) de 1 mM (a) e 0,1 mM (b) de DMPG em Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. $\lambda_{ex} = 359$ nm, $\lambda_{em} = 428$ nm. Velocidade de varredura das curvas de DSC: 20 °C/h.

A mudança de comportamento com a diluição não se dá em uma concentração específica, mas sim em uma faixa de concentração lipídica, onde o comportamento térmico é dependente da preparação da amostra de um modo ainda desconhecido. Nessa faixa de concentração, que chamamos de c' , as curvas de DSC obtidas podiam ser tanto características do regime de alta quanto do de baixa concentração, e algumas curvas de DSC eram compostas por uma mistura desses dois perfis calorimétricos, pois tanto o padrão complexo do regime de alta concentração quanto o pico a 27,5 °C estavam presentes. De acordo com experimentos de DSC e anisotropia de fluorescência, delimitamos a faixa de concentração c' máxima durante a qual a mudança de comportamento térmico ocorre: $0,2 < c' < 0,6$ mM DMPG. Essa região é marcada, portanto, por uma instabilidade. Por exemplo, a Fig. IV.46 mostra uma série de curvas de DSC obtidas entre 0,1 e 1 mM DMPG, onde a região definida como c' apresenta uma clara instabilidade. As amostras de 0,3 e 0,5 mM DMPG apresentam o padrão de dispersões concentradas, enquanto que as amostras de 0,4 e 0,2 mM apresentam o comportamento das dispersões diluídas. A amostra de 0,6 mM DMPG mostrou um perfil de DSC com a presença tanto do pico a 27,5 °C quanto do perfil complexo observado acima de c' . Essa figura deixa clara a instabilidade do comportamento térmico do DMPG na faixa de concentração que chamamos de c' .

Fig. IV.46 - Curvas de DSC entre 0,1 e 1 mM DMPG em Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. Velocidade de varredura: 20 °C/h. As curvas estão deslocadas da origem ($C_p = 0$) para melhor visualização.

Logo abaixo, ou na região de c' , o valor de T_m apresentado pela amostra no regime de baixa concentração é sempre de 27,5 °C. Entretanto, quando a concentração lipídica é abaixada mais ainda, um grande aumento de T_m ocorre, chegando a um valor limite de 41 °C em torno de 0,005 mM (5 μ M). Abaixo desta concentração, as técnicas de DSC e anisotropia de fluorescência não têm mais sensibilidade de detectar a presença da transição de fase. Na Fig. IV.47a estão mostradas curvas de DSC e de anisotropia de fluorescência medidas em concentrações decrescentes de DMPG, ilustrando o grande aumento de T_m com a diminuição da concentração lipídica¹. Os valores de T_m em função da concentração lipídica estão mostrados no gráfico ao lado (Fig. IV.47b). Mesmo que a mudança no comportamento térmico não se dê sempre na mesma concentração, e que os valores de T_m em função da diluição abaixo de c' dependam da preparação, uma tendência evidente de mudança no comportamento térmico abaixo de uma certa concentração, e aumento de

¹ Comparando as curvas referentes a 200 μ M (0,2 mM) DMPG das Figs. IV.46 e IV.47, vemos que uma apresenta o comportamento térmico de dispersões diluídas (Fig. IV.45b), enquanto a outra apresenta um perfil de DSC composto pelos padrões calorimétricos do DMPG acima e abaixo de c' (Fig. IV.47a). De fato, essa concentração pertence à região de c' , e é esperada essa variação entre preparações diferentes.

T_m com a diluição, foram sempre claramente observados, tanto com DSC quanto com anisotropia de fluorescência.

Fig. IV.47 - a) Valores de anisotropia de fluorescência de 0,5 mol% DPH (em cima) e curvas de DSC (em baixo) de diferentes concentrações de DMPG em Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl. $\lambda_{\text{ex}} = 359 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 428 \text{ nm}$. Velocidade de varredura das curvas de DSC: 60°C/h . As curvas de DSC estão deslocadas da origem ($C_p = 0$), e as curvas de 200 e 500 μM estão multiplicadas por dois para uma melhor visualização. b) Valores de T_m em função da concentração lipídica no regime diluído ($c < c'$), medidos de resultados de anisotropia e DSC.

A pré-transição só foi detectada até 0,1 mM DMPG ($T_p = 14,4^{\circ}\text{C}$), apresentando um valor maior do que o observado no regime de alta concentração. Abaixo dessa concentração, no entanto, não foi possível verificar se ela está presente ou não, devido à baixa resolução das curvas de DSC. A entalpia da transição principal foi medida para todas as concentrações ($\Delta H_m \sim 5 \text{ kcal/mol}$), embora o erro em sua medida aumentasse com a diluição. Esse valor é semelhante ao obtido no regime de alta concentração em alta força iônica, quando existe um pico único em T_m , ou no intervalo entre T_m^{on} e T_m^{off} , em baixa força iônica.

É importante chamar a atenção para o alto valor de T_m alcançado, 41 °C. No regime de alta concentração, essa alta T_m foi conseguida abaixando-se o pH até neutralização dos grupos fosfato do DMPG (Fig IV. 22), indicando que a repulsão entre cabeças polares adjacentes, que favorece a maior área por cabeça da fase fluida, não está mais presente. Com a adição de NaCl, que também tem o efeito de blindagem das cargas, o valor máximo atingido é $T_m = 29$ °C em 2 M NaCl (Cevc , 1980).

Outra técnica utilizada no estudo do DMPG diluído foi a observação de vesículas gigantes por microscopia ótica. Na verdade, foi essa a técnica que revelou a existência dessa alta T_m nas baixas concentrações, pois, devido ao modo de preparo das vesículas gigantes de DMPG por *swelling*, a concentração final era sempre muito pequena. A partir daí iniciou-se todo o estudo com DSC e anisotropia de fluorescência.

Membranas na fase gel não apresentam flutuações térmicas em sua forma, claramente observadas quando a membrana está na fase fluida (Sackmann, 1994; Bagatolli & Gratton, 1999). Portanto, a observação de vesículas em função da temperatura indica a temperatura a partir da qual as bicamadas apresentam flutuações de forma, ou seja, T_m . O momento da transição é muito evidente, pois a coexistência de domínios fluidos e rígidos, faz com que a vesícula assuma estranhas formas, nas quais os pedaços fluidos apresentam um alto raio de curvatura, enquanto os domínios na fase gel tendem a ficar planos e rígidos. Esse fenômeno é uma característica geral de lipídios, tendo sido observado também com DPPC e DMPC (resultados não mostrados; Bagatolli & Gratton, 1999).

Utilizando o método de *swelling* (seção III.2) foi possível crescer vesículas gigantes de DMPG no regime diluído e observá-las com um microscópio ótico. É importante ressaltar que esse método é diferente do utilizado na seção IV.1.6 (eletroformação), onde as vesículas gigantes formavam-se no regime concentrado (acima de c'). Como será mostrado, o comportamento térmico das vesículas gigantes diluídas é bem diferente do observado para as concentradas, o que é uma consequência da concentração lipídica e não do método de preparo. Uma seqüência de fotos de uma mesma vesícula de DMPG está mostrada na Fig. IV.48. A 35 °C a vesícula está na fase gel, pois nenhuma flutuação de forma foi observada (Fig. IV.48a). Essa mesma forma foi observada desde 15 °C. Vesículas de DMPG na fase gel sempre apresentaram formas poligonais não flutuantes, indicando que a membrana prefere adotar um raio de curvatura quase nulo, forçando a presença de partes planas ligadas por "cantos". Diferentemente, vesículas de DMPC na fase gel apresentavam sempre uma forma esférica rígida (resultados não mostrados). A foto seguinte, a 41 °C, mostra as estranhas formas assumidas pela vesícula durante a transição de fase (Fig. IV.48b). A 43 °C a vesícula apresenta uma forma prolata com visíveis flutuações de forma, indicando que a bicamada está na fase fluida (Fig. IV.48c). Esse comportamento foi obtido com diversas

preparações de vesículas gigantes diluídas de DMPG. A vesícula só assume uma forma flutuante quando a transição está completa, com a membrana homogeneamente na fase fluida.

a) 35 °C

b) 41 °C

c) 43 °C

d) Anisotropia

Fig. IV.48 - Imagens obtidas de uma vesícula gigante de DMPG no regime diluído em Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl em três temperaturas distintas: abaixo (a), em (b) e acima de T_m (c). d) dependência dos valores de anisotropia de fluorescência de 0,5 mol% DPH incorporado em vesículas gigantes.

Na Fig. IV.48d está mostrado um experimento de anisotropia de fluorescência feito com vesículas gigantes no regime diluído, que aponta $T_m = 40$ °C. Embora a concentração lipídica no método de preparação das vesículas gigantes não tenha sido determinada, elas eram sempre muito diluídas, pois somente poucas vesículas apareciam no campo de visão do microscópio ótico. De acordo com o valor de T_m mostrado na Fig. IV.48d, a concentração lipídica das vesículas gigantes deve estar em torno de 10 μ M (Fig. IV.47).

A observação ótica das vesículas gigantes é muito importante para a constatação de que a transição gel - cristal-líquido ocorre de fato a essa alta temperatura. Os dados de DSC, por

exemplo, se não correlacionados com os de anisotropia de fluorescência e microscopia ótica, não são conclusivos a respeito da transição a qual se referem, embora a entalpia seja muito semelhante à da transição gel - fluido. A anisotropia de fluorescência, por apresentar um valor tão alto a baixas temperaturas, fortemente indica a presença de uma fase gel. As três técnicas combinadas deixam claro que essa transição é de fato a transição gel - cristal-líquido, que passa a assumir valores altos abaixo de c' , chegando a 41 °C.

Seria muito importante a determinação da cmc^2 (concentração micelar crítica) do DMPG para caracterização completa do regime diluído. Em geral, assume-se que a cmc de lipídios com duas cadeias é sempre muito baixa, e poucos são os estudos de cmc nesses sistemas. Entretanto, a presença de cargas na cabeça polar pode aumentar consideravelmente esse valor. Algumas tentativas foram feitas, mas como são resultados ainda muito preliminares preferimos não mostrá-los aqui. Fica claro que a cmc do DMPG não é um evento abrupto e definido como em sistemas micelares, um dos exemplos mais estudados sendo o SDS (dodecil sulfato de sódio). Foram feitas medidas de tensão superficial, um dos métodos clássicos de determinação de cmc , embora sem um resultado muito claro. A técnica de ITC (Calorimetria de titulação isotérmica), também com resultados não muito definitivos, apontou algo em torno de 10 μM como sendo a cmc . A fluorescência do marcador pireno, extremamente dependente da polaridade do meio, tem sido também utilizada como método de detecção da cmc (Gala & Sackmann, 1974; L'Heureux & Fragata, 1986; Lantzsich et al., 1998). Medidas preliminares foram feitas com essa técnica, e parecem indicar $cmc \sim 8 \mu M$, embora alguns problemas não tenham sido ainda resolvidos. Algumas medidas, também preliminares, com espalhamento de luz dinâmico também parecem indicar uma cmc em torno de 10 μM . A questão da cmc do DMPG, e sua possível dependência com a temperatura e força iônica fica, portanto, em aberto.

Variação com a força iônica

O comportamento térmico do DMPG é extremamente sensível à força iônica do meio, devido à carga do grupo fosfato. No regime de baixa concentração não é diferente, embora o efeito do acréscimo de sal seja bem distinto do apresentado para altas concentrações. Contrário ao esperado para vesículas carregadas, onde o aumento de sal aumenta a estabilidade da fase gel, aumentando T_m , o aumento da força iônica no regime diluído causa uma grande diminuição em T_m .

² Mesmo que, em geral, lipídios de duas cadeias como o DMPG, tendam a formar bicamadas, utiliza-se o termo cmc mesmo que na verdade seja a concentração a partir da qual vesículas de formem.

Os efeitos causados pelo aumento da força iônica nos regimes de alta (10 mM DMPG) e de baixa (0,1 mM DMPG) concentração estão mostrados na Fig. IV.49 com curvas de DSC. Resultados semelhantes foram obtidos com anisotropia de fluorescência (abaixo de c'), entretanto, as curvas de DSC são mais ilustrativas, pois detectam com maior clareza $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$ ou T_m no regime diluído. Analisando os dois sistemas podemos fazer as seguintes observações:

i) No regime de alta concentração (10 mM DMG, Fig. IV.49a), o aumento da força iônica reduz consideravelmente a região de transição, aumentando $T_{m^{on}}$ e reduzindo bastante $T_{m^{off}}$, até que uma T_m única é observada, como já havia sido mostrado anteriormente (Fig. IV.6).

ii) O efeito causado pelo aumento da força iônica no regime diluído (0,1 mM DMPG, Fig. IV.49b) é muito diferente, causando a diminuição do valor de T_m . Em água pura, o comportamento é muito semelhante ao sistema tamponado em baixa força iônica, entretanto com T_m ainda maior, $T_m = 42,5^\circ\text{C}$. Essa curva de DSC de 0,1 mM DMPG em água pura não apresenta nenhum indício da pré-transição. Como nessa concentração a sensibilidade da técnica seria suficiente para detectar T_p (Fig. IV.45b), a pré-transição não parece ocorrer.

iii) A amostra de 100 mM NaCl no regime diluído apresentou $T_m = 24^\circ\text{C}$, valor um pouco maior que no regime concentrado, onde $T_m = 22,4^\circ\text{C}$. Em uma força iônica ainda maior (500 mM NaCl), o valor de T_m parece ser independente da concentração lipídica, pois os valores apresentados em 0,1 e 10 mM DMPG são praticamente idênticos ($T_m = 23^\circ\text{C}$).

Fica claro, portanto, que a diferença no comportamento térmico abaixo e acima de c' é extremamente acentuada em forças iônicas baixas, enquanto que em alta força iônica o comportamento do DMPG parece ser independente da concentração lipídica. Foi visto, também, que dispersões de 10 e 0,1 mM DMPC, apresentam um comportamento térmico muito similar (Fig. IV.31 e Fig. IV.9).

Fig. IV.49 - Curvas de DSC de 10 mM (a) e 0,1 mM (b) DMPG em diferentes forças iônicas. Velocidade de varredura: 20 °C/h (a) e 60 °C/h (b). As curvas estão deslocadas da origem ($C_p = 0$) para melhor visualização.

Não foi feito um estudo detalhado do comportamento do DMPG em diversas forças iônicas no regime diluído. Em água pura (baixíssima força iônica) e 100 mM NaCl (alta força iônica) foram obtidas curvas de DSC em concentrações decrescentes de DMPG, como mostra a Fig. IV.50.

Em 100 mM NaCl (Fig. IV.50b), T_m aumenta um pouco com a diluição, chegando a 26 °C em 10 μ M DMPG. Nessa condição de força iônica o comportamento térmico ainda é sensível à concentração lipídica, embora não de forma tão marcante quanto em 2 mM NaCl (Fig. IV.46 e IV.47).

A Fig. IV.50a, com curvas de DSC de DMPG em água pura, mostra que para concentrações lipídicas maiores que 200 μ M o perfil de DSC começa a ficar mais e mais complexo. A mudança de comportamento parece ser bem mais lenta que no sistema tamponado com 2 mM NaCl, onde percebe-se claramente a existência de dois padrões distintos de DSC (acima e abaixo de c'). Em 10 μ M DMPG a T_m de DMPG em água pura atinge 44 °C e torna-se mais larga. Não está claro ainda se c' depende da força iônica ou não. Para tal, um estudo bem detalhado de DSC teria que ser feito.

Fig. IV.50 - Curvas de DSC de diferentes concentrações de DMPG em água pura (a) e Hepes + 100 mM NaCl. Velocidade de varredura: 60 °C/h. As curvas estão deslocadas da origem ($C_p = 0$) para melhor visualização.

Variação com o pH

O pH da solução também tem um papel crucial no comportamento térmico do DMPG, pois o próton pode ligar-se ao grupo fosfato do DMPG, neutralizando-o. Em sistemas lipídicos carregados, em geral, estima-se o pK aparente (pK_a) da ligação próton-fosfato, pela variação que a ligação do próton causa na temperatura de transição de fase principal T_m , já que esta é extremamente sensível à interação entre as cabeças polares. Isso foi feito por Watts et al., 1978 para dispersões concentradas de DMPG em presença de 100 mM NaCl, resultando em um $pK_a = 2,9$. Em 6 mM de força iônica (Hepes + 2 mM NaCl), condição utilizada no presente trabalho, esse valor é maior, devido ao maior potencial de superfície que aumenta a concentração de prótons na superfície lipídica. Fazendo a correção para o potencial de superfície, $pK_a = 4,1$ na condição aqui estudada³.

Como o DMPG apresenta esse alto valor de T_m em amostras muito diluídas, semelhante ao obtido em baixo pH no regime concentrado, resolvemos estudar a dependência do comportamento térmico do DMPG em baixa força iônica com o pH nos dois regimes.

³ Fazendo uso da Eq. A.1.26, que relaciona a quantidade de íons na superfície de potencial Ψ_0 à concentração de íons em solução, e lembrando que $[H^+] = 10^{-pH}$, chega-se a $pK_a = pK_i - e\Psi_0/2.3kT$, onde pK_i é o pK intrínseco. $pK_i = 1,2$ (Watts et al., 1978 e Toko & Yamafuji, 1980. Ψ_0 foi obtido da Tabela IV.4

A Fig. IV.51 mostra medidas de anisotropia de fluorescência do DPH feitas em dispersões de 10 μ M DMPG (Fig. IV.51b) e de 1 mM DMPG (Fig. IV.51a) em diferentes valores de pH entre 2,7 e 11. Os valores de T_m (ou de $T_{m^{on}}$ acima de pH 6 no regime concentrado) em função do pH, obtidos dos perfis de anisotropia, estão mostrados na Fig. IV.51c.

Fig. IV.51 - Valores de anisotropia de 0,5 mol% DPH incorporado em 1 mM (a) e 10 μ M (b) DMPG em água pura + 6 mM NaCl em diferentes valores de pH, ajustados através de adição de HCl ou NaOH. $\lambda_{ex} = 359$ nm, $\lambda_{em} = 428$ nm. (c) Valores de T_m em função do pH medidos de (a) e (b).

Em 1 mM DMPG, regime de alta concentração, os valores de T_m indicam $pK_a \sim 4,5$, semelhante ao calculado por Watts et al., 1978. Na condição protonanda (pH 2,7) $T_m = 42$ °C, de acordo com o apresentado anteriormente (Fig. IV.22). Acima de pH 6, a transição monitorada por anisotropia de fluorescência torna-se mais larga, o que provavelmente indica o surgimento da fase intermediária.

Na amostra diluída de 10 μ M DMPG, T_m diminui de 38 °C em pH neutro para 36,5 °C em pH 9 e 34 °C em pH 11, mostrando que ainda existe uma dependência de T_m com o pH mesmo acima de pH 7⁴. É importante notar que, no regime concentrado, as amostras acima de pH 6 apresentavam todas o mesmo comportamento térmico (Fig. IV.51a), visto também com os marcadores de spin 16-PCSL e dCAT1 (resultados não mostrados). Não medimos amostras em meios de maiores valores de pH, pois o grande aumento da concentração de sódios em solução, provenientes do acréscimo de hidróxido de sódio, alteraria o comportamento do DMPG.

Em valores de pH inferiores a 6, no regime diluído, a T_m foi alargando-se, até ficar praticamente indetectável em pH 2,7. Por essa razão as curvas obtidas em pH < 6 não estão mostradas na Fig. IV.51. É importante mencionar que Watts et al., 1978, detectaram um fenômeno parecido quando o pH era muito inferior ao necessário para a completa neutralização das cargas do DMPG.

O fato de não termos detectado a pré-transição na condição de DMPG em água pura (Fig. IV.49 e IV.50) é mais uma indicação de que o DMPG diluído está descarregado, pois a pré-transição não ocorre em dispersões lipídicas de DMPG em seu estado neutro (Watts et al., 1978). De fato, a fase *ripple* está presente somente em lipídios com cabeças polares grandes, tais como o PC e o PG carregado, e portanto essa fase não seria esperada em bicamadas de PG em seu estado neutro.

Os efeitos causados pelo aumento da concentração de NaCl e do pH da solução no regime diluído, fortemente sugerem que o grupo fosfato associa-se ao próton abaixo de c' até sua completa neutralização em torno de 10 μ M DMPG. Isso resulta no enorme aumento de T_m observado, e explica o comportamento não usual de T_m com a força iônica, pois, considerando que o DMPG está associado ao próton, o aumento de NaCl diminuiria o pK_a da associação PG-H⁺ assim como aumentaria a competição entre os íons, favorecendo o sódio.

Ainda não temos uma explicação para esse possível processo de associação do prótons com a superfície lipídica de DMPG diluído. Não foi possível explicar um aumento do grau de dissociação com a diluição lipídica aplicando somente a teoria de Gouy-Chapman-Stern (Apêndice 1), principalmente pelo fato desta não conter uma dependência explícita com a concentração lipídica.

Tentamos, então, aplicar um modelo de troca iônica (Quina & Chaimovich, 1979), sugerido pela Prof^a. Dr^a. Iolanda Cuccovia (IQUSP-SP). Nesse modelo, é possível calcular a quantidade de

⁴ É importante lembrar que a amostra em pH 11 possui uma força iônica maior (7 mM) que a amostra em pH neutro (6 mM), proveniente do 1 mM hidróxido de sódio adicionado à solução para que o valor de pH aumentasse. Como foi observado uma diminuição de T_m com a quantidade de sal, essa diminuição de T_m observada na Fig. 7b poderia ser uma consequência do aumento de 1 mM Na⁺, e não do aumento do pH. Fizemos, então, uma amostra de pH 11 com um total de 5 mM de força iônica (4 mM NaCl + 1 mM NaOH) e obtivemos T_m = 34 °C. Adicionamos, então, 1 mM NaCl e medimos novamente T_m = 34 °C, verificando que o efeito de 1 mM NaCl não era crucial para o valor de T_m . A diminuição de T_m de 38 para 34 °C na Fig. 7b, portanto, era de fato consequência do aumento de pH 7 para 11.

um íon X ligado à superfície anfifílica carregada, em função da concentração de anfifílicos e de sua cmc, da concentração do íon X, da concentração de contra-íons do anfifílico utilizado, Y, do grau de ionização α , e de uma constante de troca entre os íons X e Y ($K_{X/Y}$). A vantagem desse modelo seria a dependência explícita com a concentração de anfifílicos. Esse modelo tem sido utilizado, principalmente, com detergentes catiônicos (Quina et al., 1980; Cuccovia et al., 1997a e 1997b). Em sistemas micelares, em geral pode-se assumir um grau de ionização α constante, praticamente independente de condições externas. De acordo com nossos dados experimentais, uma neutralização total da superfície pela ligação de prótons, teria que ocorrer em baixíssimas concentrações de DMPG ($\sim 10 \mu\text{M}$) para explicar $T_m = 41^\circ\text{C}$. Logo, tivemos que obrigar o grau de dissociação α a variar de $\alpha \sim 0,5$ para concentrações acima de c' (conforme estimado em Riske et al., 1997 e 1999), para praticamente $\alpha = 0$ abaixo de c' . Mesmo assumindo $\alpha \sim 0$ no regime diluído, foi necessário assumir uma enorme constante de troca entre sódio (contra-íon do DMPG) e próton, $K_{H/Na} \sim 10^5$, para garantir uma alta predominância de prótons associados à superfície. Já que a quantidade de prótons do nosso sistema ($\sim 10^{-4} \text{ mM H}^+$, definida pelo pH do tampão Hepes) é muito menor que a de sódios (6 mM Na^+).

Ainda não está clara a validade dessas suposições, e se elas não são análogas a simplesmente assumir que, em torno de c' , a constante de afinidade do grupo fosfato pelo próton (K_H) cresce muito, enquanto a de afinidade pelo sódio (K_{Na}) diminui, como resposta a mudanças na superfície de DMPG.

V. CONCLUSÕES

V.1 - Caracterização do comportamento térmico do DMPG

Durante o trabalho de doutorado foi possível avançar significativamente na compreensão do comportamento térmico do fosfolípido aniônico DMPG. Foram feitos estudos em função da concentração lipídica, força iônica e pH do meio.

[DMPG] - O comportamento do DMPG depende da concentração lipídica, como discutido no decorrer do trabalho. Juntando os vários dados obtidos com variação da concentração de DMPG na condição de força iônica mais estudada (Hepes pH 7,4 + 2 mM NaCl) foi possível montar um diagrama de fases esquemático temperatura x concentração de DMPG, como ilustra a Fig. V.1.

Fig. V.1 - Diagrama de fase esquemático do DMPG em 10 mM Hepes + 2 mM NaCl. A área hachureada corresponde à região de c' , onde foi encontrada uma grande instabilidade no comportamento térmico do DMPG. A linha pontilhada indica resultados preliminares em concentrações lipídicas bem altas. A linha a temperaturas menores representa a pré-transição. Os dados foram obtidos com DSC, Anisotropia de fluorescência do DPH, EPR do marcador 16-PCSL e espalhamento de luz.

A região hachureada na Fig. V.1 indica a região de c' , onde foi encontrada uma grande instabilidade do comportamento térmico do DMPG. Abaixo dessa região (regime diluído), o DMPG apresenta uma temperatura de transição única centrada em T_m , que aumenta de 27,5 °C em

0,1 mM DMPG para 41 °C em 5 μ M DMPG. Não foi possível detectar a pré-transição abaixo de 0,1 mM DMPG, devido à insensibilidade da técnica de DSC, mas, se a hipótese de neutralização do DMPG com a diluição estiver certa, a pré-transição não deve ocorrer abaixo de uma certa concentração lipídica. Isso porque a fase *ripple* não seria esperada em bicamadas formadas por lipídios com cabeças polares relativamente pequenas, como é o caso do DMPG associado ao próton.

Infelizmente, não foi possível ainda a determinação da cmc do DMPG em função da temperatura e força iônica do meio, o que enriqueceria bastante o diagrama de fases apresentado na Fig. V.1.

Acima de c' (regime concentrado), a transição gel - cristal-líquido ocorre em uma extensa região de transição, delimitada por temperaturas denominadas $T_{m^{on}}$ e $T_{m^{off}}$, que marcam o início e o final da transição, respectivamente. Essa região de transição, ou fase intermediária, é opticamente transparente. O aumento da concentração lipídica faz com que o intervalo em temperatura da fase intermediária diminua gradualmente, até que, por volta de 1 M, parece desaparecer, a transição se dando em torno de uma única temperatura de transição, T_m . A pré-transição aumenta um pouco com a concentração lipídica.

[NaCl] - A região de transição (fase intermediária) é consideravelmente reduzida com o aumento da força iônica, como ficou evidente durante todo o trabalho com dispersões concentradas de DMPG. Na Fig. V.2a está um diagrama de fases temperatura x concentração de NaCl de 10 mM DMPG, portanto no regime concentrado. Vale lembrar que comportamentos semelhantes foram observados com outros sais.

Fig. V.2 - Diagrama de fase esquemático de a) 10 mM DMPG e b) 0,1 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4 em função da quantidade de NaCl adicionada. A temperatura da pré-transição foi obtida só para algumas amostras.

Acima de 100 mM NaCl, não existe fase intermediária e a temperatura de transição principal T_m aumenta com o aumento da concentração de sal, como esperado para lipídios carregados (Träuble et al., 1976; Cevc et al., 1980). Dispersões de DMPPG em água pura representam um estudo à parte, por ser um sistema bem mais complexo, e por essa razão os resultados obtidos nessa condição não estão mostrados na Fig. V.2a, e não serão discutidos aqui.

No regime diluído, o aumento de NaCl causa uma grande diminuição do valor de T_m , como mostrado na Fig. V.2b, até que em 500 mM NaCl o valor de T_m em 0,1 mM DMPPG é o mesmo que o apresentado na Fig. V.2a para 10 mM DMPPG. De maneira geral, o aumento de NaCl diminui a dependência do comportamento térmico com a concentração lipídica.

pH - As figuras V.1 e V.2 apresentam diagramas de fase de DMPPG em pH neutro. No regime concentrado, o DMPPG encontra-se em seu estado desprotonado nesse pH, mesmo na menor força iônica estudada (Hepes + 2 mM NaCl). Verificamos que a diminuição do pH vai neutralizando a superfície da bicamada até sua completa protonação, observada pelo grande aumento de T_m . A Fig. IV.51c mostra a variação de T_m com o pH, indicando $pK_a \sim 4,5$ e a existência da fase intermediária para $pH \geq 6$. No regime diluído, o aumento de pH causa um aumento de T_m até pH 11, indicando que em pH neutro existe uma quantidade considerável de prótons associada à superfície lipídica.

Um diagrama de fases completo e detalhado, em função da concentração de DMPPG, NaCl e do pH do meio, ainda não foi obtido, embora as linhas gerais tenham sido descritas acima.

A caracterização do DMPPG, mostrada nas Figs. V.1, V.2 e IV.51c, é de grande importância para os trabalhos que utilizam DMPPG como membrana modelo em estudos de relevância biológica. É necessário saber como comporta-se o DMPPG, dada a condição de concentração, força iônica e pH, para então avaliar o efeito da adição de ligantes, ou da mudança de condições externas.

V.2 - Fase intermediária

A característica particular do comportamento térmico do DMPPG é sem dúvida a existência da fase intermediária, em certos intervalos de concentração lipídica, força iônica, temperatura e pH. Durante este trabalho, ficou evidente que a fase intermediária, embora contenha propriedades específicas não encontradas nas fases vizinhas, coincide com a região de transição de fase gel - cristal-líquido, que se dá entre T_m^{on} e T_m^{off} .

A fase intermediária é ainda um problema em aberto na literatura. Alguns autores (Gershfeld et al., 1986; Heimburg & Biltonen, 1994; Schneider et al., 1999; Koshinuma et al., 1999) propõem a existência de uma rede lipídica tri-dimensional, que poderia inclusive ser a fase esponja L_3 (Strey et al., 1990). Entretanto, dois resultados obtidos no presente trabalho de doutorado contradizem essa hipótese. Primeiramente, não ocorre fusão entre as vesículas de DMPG nem em $T_{m^{on}}$ e nem em $T_{m^{off}}$, conforme mostrado pelo experimento de diluição com o marcador de spin 16-PCSL (Fig. IV.23, Riske et al., 1999). Em segundo lugar, o resultado muito interessante obtido com as vesículas gigantes observadas com microscópio ótico (Fig. IV.41-44), mostram que a bicamada lipídica, claramente distinguível na fase fluida, desaparece gradualmente à medida que a temperatura é diminuída abaixo de $T_{m^{off}}$, e volta a aparecer com o subsequente aumento da temperatura acima de $T_{m^{off}}$. Muitas vezes, observou-se o desaparecimento e aparecimento de uma mesma vesícula por diversos ciclos de temperatura através de $T_{m^{off}}$, mostrando que a unidade da vesícula não era perdida nessa transição.

No trabalho desenvolvido no mestrado (Riske et al., 1997), propusemos um grande aumento na repulsão eletrostática entre vesículas em $T_{m^{on}}$, causado por um aumento considerável no grau de ionização da superfície, e, portanto, do potencial de superfície Ψ_o , para explicar o decréscimo do espalhamento de luz nessa região. Com o método de medida de Ψ_o , utilizando o marcador de spin dCAT1 (seção IV.1.3ii), foi possível estimar Ψ_o em função da força iônica na fase intermediária (Riske et al., 1999). Embora não tenha sido possível estimar Ψ_o com precisão na fase gel, nos pareceu claro que a partição do marcador catiônico na superfície lipídica aumentava consideravelmente acima de $T_{m^{on}}$, dando suporte ao aumento de Ψ_o proposto anteriormente.

O aumento do potencial eletrostático em $T_{m^{on}}$, causado por um aumento no grau de ionização da superfície, pode ter implicações mais relevantes ainda na repulsão entre cabeças polares vizinhas nas bicamadas de DMPG, do que entre vesículas. Os resultados de SAXS (Riske et al., 2001), mostram uma perda considerável do contraste eletrônico da bicamada iniciado em $T_{m^{on}}$, e que atinge um máximo um pouco abaixo de $T_{m^{off}}$. Esse baixo contraste eletrônico sugere uma alta repulsão entre cabeças polares, que poderia ter como consequência também a criação de regiões com diferentes curvaturas, impondo um empacotamento não usual à membrana.

Com o marcador de spin 16-PCSL, foi visto um espectro de EPR característico na fase intermediária, sugerindo também um empacotamento diferente nessa região. Provavelmente esse espectro é composto pela coexistência de duas populações de marcadores, uma localizada em regiões "normais" da bicamada, e outra em regiões desta que apresentariam um empacotamento não usual, com uma alta curvatura. O marcador nesta região peculiar apresentaria uma grande liberdade e amplitude de movimento, fazendo com que tenha acesso a regiões de polaridades maiores. Só foi possível separar os dois sinais com o marcador 16-PCSL, provavelmente devido à

localização de seu grupo paramagnético. Talvez, a grande amplitude de movimento deste grupo nitróxido no final da cadeia hidrocarbônica, permite que este tenha acesso a regiões de polaridade bem distintas quando localizado nas regiões de altíssima curvatura da fase intermediária. Dessa forma, o 16-PCSL daria origem a sinais de EPR com uma diferença considerável no seu desdobramento hiperfino, o que levaria à separação dos dois sinais. Com os outros marcadores menos internos (5-, 12- e 14-PCSL), os sinais provenientes desses dois microambientes seriam mais parecidos entre si, principalmente no valor de a_o , dada a menor amplitude de movimento do grupo nitróxido à medida que ele se localiza mais próximo à região da cabeça polar, impossibilitando, portanto, a separação dos dois sinais.

Somente na fase intermediária foi possível obter um espectro de superfície único para o marcador catiônico dCAT1 em presença de DMPG. Na fase fluida do DMPG, e também de outro lipídio carregado (DPPG), o sinal proveniente dos marcadores na superfície lipídica eram complexos e relativos a certamente mais de um sítio. Bcamadas fluidas apresentam flutuações, que podem ser observadas em vesículas gigantes por microscopia ótica (Fig. IV.41-44 e IV.48; Lipowsky, 1991). Essas flutuações devem existir também em vesículas menores, da ordem das que estudamos por RPE com DMPG. Como o marcador dCAT1 não está ancorado à superfície, já que não possui cadeias hidrofóbicas, e está “preso” a ela somente pela atração eletrostática, a flutuação da superfície pode fazer com que os marcadores dCAT1 localizem-se em vários sítios diferentes, cada um com características um pouco distintas de polaridade e mobilidade. O espectro observado seria, então, a soma de todas essas componentes. Por outro lado, podemos especular que a possível existência de regiões de altíssima curvatura na fase intermediária, formaria um sítio estável para a localização do marcador dCAT1 na superfície. Além disso, como a membrana não está completamente na fase fluida, as flutuações térmicas amplas seriam inibidas.

O empacotamento não usual da membrana, além de levar à uma perda do contraste de densidade eletrônica da bicamada, pode levar também à perda do contraste ótico, o que explicaria a transparência da membrana por microscopia ótica e o baixo espalhamento de luz da amostra.

Com base nos dados apresentados aqui, podemos propor que um aumento do grau de dissociação em $T_{m^{on}}$ dispara o processo de fusão das cadeias hidrocarbônicas, por aumentar a área por lipídio. A forte repulsão entre as cabeças polares obriga a membrana a adotar um empacotamento muito peculiar, fazendo com que o contraste ótico e de densidade eletrônica reduzam-se consideravelmente. Na região de transição pode haver a coexistência de domínios mais rígidos com domínios fluidos de altíssima curvatura, como observado em vesículas gigantes (Fig. IV.48b, Bagatolli & Gratton, 1999). Essa regiões muito curvas podem inclusive ser compostas por lipídios com uma maior ionização. Acima de $T_{m^{off}}$, a bicamada poderia se reorganizar numa fase fluida convencional.

O problema do baixo espalhamento de luz de amostras de DMPPG na fase intermediária levou a Prof^a. Dr^a. Carla Goldman, do nosso grupo de Biofísica, a propor um modelo matemático que poderia explicar tal fenômeno (Goldman et al., 1999). Embora seja um modelo muito simples, que apenas trata da flutuação de monômeros em relação a um estado de equilíbrio, e que em princípio não leva em conta nenhuma propriedade específica do DMPPG, esse modelo consegue explicar a existência de três fases em função da temperatura. Em temperaturas menores predominariam agregados duros (*hard*), enquanto que na fase a altas temperaturas os agregados predominantes seriam moles (*soft*), com grande semelhança com as fases gel e fluida de bicamadas lipídicas. A fase intermediária seria caracterizada pela coexistência de agregados moles e duros, mas com uma grande predominância de monômeros. Nesse modelo, os monômeros não são necessariamente lipídios em solução, mas podem ser vesículas menores. Curiosamente, esse modelo também reproduz a diminuição do intervalo em temperatura da fase intermediária com a concentração lipídica, observada experimentalmente (Fig. V.1). Mais recentemente, um novo trabalho (Goldman, 2001) mostrou que o aumento da concentração de impurezas no sistema, que poderiam mimetizar o efeito de sal adicionado, também diminui o intervalo de temperatura da fase intermediária, conforme observado experimentalmente para o aumento de sal em dispersões de DMPPG (Fig. V.2a).

Interação com peptídeos catiônicos - O presente trabalho trata basicamente de dispersões de DMPPG. Entretanto, alguns resultados muito interessantes foram obtidos em presença de peptídeos catiônicos, que surgiram da colaboração com os alunos de doutorado Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turchiello. Embora sejam resultados preliminares, parece que as alterações causadas no comportamento térmico do DMPPG pela presença de α -MSH e Bradicinina, são um efeito geral de peptídeos catiônicos que apresentam uma penetração parcial na fase lipídica (Biaggi et al., 1997 e Turchiello et al., 2000). Os dados apresentados aqui, sugerem que esses peptídeos têm uma preferência pelo empacotamento peculiar da membrana na fase intermediária, abolindo T_m^{off} e deixando a amostra transparente a todas as temperaturas. Assim como para o dCAT1, a presença das regiões muito curvas na superfície do DMPPG, poderia formar um sítio favorável à localização desses peptídeos.

V.3 - Dispersões diluídas

O comportamento térmico descoberto para o DMPPG diluído em baixa força iônica foi uma grande surpresa para nós. A altíssima T_m observada por diversas técnicas para concentrações de

DMPG muito baixas, só é encontrada em dispersões concentradas de DMPG, quando o pH da solução é muito baixo, de forma a neutralizar completamente a superfície. Esse dado, aliado à diminuição de T_m de dispersões diluídas de DMPG com a força iônica, nos levou a sugerir que um enorme aumento na quantidade de prótons associados à membrana ocorre em torno de c' . As mudanças estruturais envolvidas ainda estão longe de serem compreendidas. É possível que, abaixo de c' , não exista mais interação alguma entre vesículas de DMPG, alterando de forma crucial o balanço de interações do sistema.

De um modo geral, o presente trabalho apresenta interessantes aspectos físico-químicos de sistemas anfifílicos carregados.

V.4 - Caminhos futuros

O trabalho desenvolvido aqui com as dispersões aquosas do fosfolípido aniônico DMPG, deixa vários caminhos abertos para o futuro, já que muitas questões não puderam ainda ser elucidadas.

- i) Os resultados obtidos aqui com as dispersões de DMPG em água pura mostram os interessantes aspectos desse sistema, onde a interação eletrostática tanto entre as cabeças polares vizinhas em uma bicamada, quanto entre vesículas, são fortíssimas. Pelos dados obtidos, parece que uma fase fluida convencional não está presente mesmo até 50 °C.
- ii) O processo que dispara o possível aumento da ionização da superfície ainda não está claro para nós. É possível que o aumento do espalhamento de luz um pouco antes de T_m^{on} (Fig. IV.5) tenha correlação com tal processo.
- iii) Seria interessante fazer um estudo minucioso do comportamento térmico de dispersões concentradas de DMPG com a variação do pH do meio. Em especial, seria muito importante obter varreduras de DSC entre pH 1 e 7 para definir em que pH aparece a fase intermediária e que aspecto tem a curva de DSC do DMPG neutro, onde foi vista uma clara coexistência de fases em torno de $T_m \sim 40$ °C (Fig. IV.22a).

iv) De modo geral, seria interessante obter mais informações sobre o empacotamento peculiar da fase intermediária. Foi iniciado há pouco tempo, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Lia Q. Amaral, um estudo por espalhamento de raio-X de alto ângulo (WAXS), para monitorar a interação entre as cadeias hidrocarbônicas, e um estudo em menores valores de q por SAXS, para garantir o monitoramento de maiores distâncias. Um estudo sistemático com microscopia ótica de fluorescência certamente ajudaria a desvendar o que ocorre com as bicamadas de DMPG na fase intermediária quando elas se tornam opticamente transparentes.

v) A interação do DMPG com peptídeos catiônicos é certamente um problema interessante a ser seguido, por exemplo com um estudo por SAXS, microscopia ótica e de fluorescência, e DSC. Durante este trabalho foi iniciado (resultados não mostrados) um estudo da interação de DMPG com o hormônio melatonina, que é descarregado e que particiona-se entre o interior da bicamada e o meio aquoso.

vi) Seria interessante estudar o comportamento térmico do DMPG acima de 1 M DMPG, onde parece que a fase intermediária desaparece e o sistema comporta-se “normalmente”. Além disso, gostaríamos de entender por que o aumento da concentração lipídica também diminui a região de transição.

vii) O trabalho iniciado nas dispersões diluídas de DMPG merece ser continuado, para que possam ser entendidos os mecanismos que levam a essa mudança acentuada no comportamento térmico.

viii) Seria de grande importância medir a cmc do DMPG em função da temperatura e força iônica do meio.

ix) Iniciamos, juntamente com o aluno de iniciação científica Rafael P. Barroso, o estudo de dispersões de outros lipídios aniônicos em baixa força iônica, como o DPPG, DLPG, DMPS e DMPA. A idéia é, inicialmente, estudar esses sistemas lipídicos por EPR com os marcadores de spin 16-PCSL e dCAT1, medir o espalhamento de luz e obter varreduras de DSC.

APÊNDICE

A.1 - Modelo de Gouy-Chapman-Stern

(McLaughlin, 1977 e Evans & Wennerström, 1986)

A teoria desenvolvida por Gouy e Chapman no início do século XX tem sido vastamente utilizada no estudo de interfaces carregadas. A membrana celular, composta principalmente por lipídios e proteínas, possui em geral uma carga total negativa, devido a grupos carregados nas cabeças polares dos lipídios. Essa densidade superficial de cargas negativa é de extrema importância na interação da membrana celular com ligantes, como peptídeos, proteínas, íons e hormônios, que em sua maioria apresentam uma carga positiva. O estudo teórico dessa interface carregada formada pela membrana é, portanto, de fundamental relevância biológica, e o modelo de Gouy-Chapman tem sido amplamente aplicado, mesmo com todas as aproximações e falhas que apresenta (Träuble et al., 1976; Cevc et al., 1980 e Peitzsch et al., 1995).

O modelo parte de um plano infinitamente carregado com densidade superficial σ , que vamos assumir ser negativa:

Além dos contra-íons que neutralizam o sistema como um todo, o meio externo pode conter cargas adicionais, provenientes de um eletrólito adicionado. Muito longe da superfície carregada ($x \rightarrow \infty$) a concentração de íons só é devida à presença desse eletrólito, que pode ou não ser simétrico. No decorrer desse desenvolvimento utilizaremos somente o caso de eletrólito simétrico, por ser de mais fácil resolução e por ter sido o caso estudado no presente trabalho.

Os íons distribuídos nas proximidades da superfície carregada formam a chamada camada difusa. Próximo à superfície encontram-se mais íons de sinais opostos à carga líquida da superfície que de mesmo sinal, devido à interação eletrostática. Entretanto, a agitação térmica dos íons faz com que os contra-íons não neutralizem a superfície carregada.

A equação de Poisson relaciona o potencial eletrostático Ψ à distribuição de cargas ρ :

$$\bar{\nabla}^2 \Psi(\vec{r}) = -\frac{\rho(\vec{r})}{\epsilon \epsilon_0} \quad (\text{A.1.1})$$

Onde ϵ é a constante dielétrica do meio e ϵ_0 é a permissividade do vácuo.

Várias aproximações têm que ser feitas para que a Eq. A.1.1 possa ser resolvida analiticamente:

- a) ϵ é constante em todo o espaço, apresentando uma descontinuidade brusca em $x = 0$
- b) Os íons são cargas pontuais (efeitos específicos são desprezados)
- c) Efeitos de carga imagem em uma interface com constantes dielétricas distintas não entram no modelo
- d) A densidade superficial de cargas σ é uniforme em todo o plano carregado.

Para o caso de uma superfície infinita o problema pode ser tratado unidimensionalmente, já que o potencial eletrostático depende somente da distância x ao plano carregado. A equação de Poisson muitas vezes é escrita em coordenadas polares para resolução de problemas de partículas esféricas carregadas, como por exemplo colóides e micelas. Entretanto, nesse caso, a equação só pode ser resolvida analiticamente para potenciais de superfície baixos, para os quais é possível linearizar a equação (Debye-Hückel). No estudo de vesículas carregadas, seria ideal tratar o problema com simetria esférica, entretanto no caso que estudamos, no qual o potencial de superfície é alto, a solução da equação teria que ser numérica, então é preferível tratar a aproximação de um plano infinitamente carregado (lembrando que as vesículas apresentam um raio de curvatura relativamente pequeno).

Escrevendo a equação de Poisson unidimensional, temos:

$$\frac{\partial^2 \Psi(x)}{\partial x^2} = -\frac{\rho(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (\text{A.12})$$

A densidade de cargas $\rho(x)$ pode ser escrita em termos do números de cargas positivas e negativas:

$$\rho(x) = z e (n^+(x) - n^-(x)) \quad (\text{A.1.3})$$

onde e é a carga do elétron e z é a valência do eletrólito. O número de cargas positivas [$n^+(x)$] e negativas [$n^-(x)$] pode ser escrito em função da quantidade de íons adicionados no infinito pela distribuição de Boltzmann:

$$n^\pm(x) = n^\pm(\infty) e^{\frac{\pm ze\Psi(x)}{kT}} \quad (\text{A.1.4})$$

Como estamos tratando o caso de eletrólito simétrico $n^+(\infty) = n^-(\infty) \equiv n(\infty)$. A expressão para a densidade de cargas pode ser escrita como:

$$\rho(x) = e n(\infty) \left[e^{-ze\Psi(x)/kT} - e^{ze\Psi(x)/kT} \right] \quad (\text{A.1.5})$$

Substituindo a Eq. 5 na 2, a equação diferencial para $\Psi(x)$ fica:

$$\frac{\partial^2 \Psi(x)}{\partial x^2} = -\frac{e n(\infty)}{\epsilon \epsilon_0} \left[e^{-ze\Psi(x)/kT} - e^{ze\Psi(x)/kT} \right] \quad (\text{A.1.6})$$

Essa equação, conhecida como equação de Poisson-Boltzmann, é não-linear de segunda ordem. Fazendo uso de uma propriedade de derivadas é possível transformá-la em uma equação de primeira ordem. Usando a identidade

$$\frac{d}{dx} \left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = 2 \frac{d\Psi}{dx} \frac{d^2\Psi}{dx^2} \quad (\text{A.1.7})$$

na Eq. A.1.6 podemos escrever:

$$\frac{d}{dx} \left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = -2 \frac{d\Psi}{dx} \frac{e n(\infty)}{\epsilon \epsilon_0} \left[e^{-ze\Psi(x)/kT} - e^{ze\Psi(x)/kT} \right] \quad (\text{A.1.8})$$

Integrando a Eq. A.1.8,

$$\int_x^\infty \frac{d}{dx'} \left(\frac{d\Psi}{dx'} \right)^2 dx' = -2 \int_x^\infty \frac{d\Psi}{dx'} \frac{e n(\infty)}{\epsilon \epsilon_0} \left[e^{-ze\Psi(x')/kT} - e^{ze\Psi(x')/kT} \right] dx' \quad (\text{A.1.9})$$

e utilizando as condições de contorno do potencial eletrostático e de sua derivada no infinito:

$$\Psi(x \rightarrow \infty) = \frac{d\Psi}{dx} \Big|_{x \rightarrow \infty} = 0$$

temos

$$\left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = \frac{2 n(\infty) kT}{\epsilon \epsilon_0} \left[e^{-ze\Psi(x)/kT} + e^{ze\Psi(x)/kT} - 2 \right] \quad (\text{A.1.10})$$

O termo entre parênteses pode ser reescrito, pois é um quadrado perfeito:

$$\left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = \frac{2 n(\infty) kT}{\epsilon \epsilon_0} \left[e^{-ze\Psi(x)/2kT} - e^{ze\Psi(x)/2kT} \right]^2 \quad (\text{A.1.11})$$

Portanto

$$\left(\frac{d\Psi}{dx} \right) = \sqrt{\frac{2 n(\infty) kT}{\epsilon \epsilon_0}} \left[e^{-ze\Psi(x)/2kT} - e^{ze\Psi(x)/2kT} \right] \quad (\text{A.1.12})$$

Temos agora uma equação diferencial de primeira ordem. Utilizando a descontinuidade do campo elétrico em $x = 0$,

$$\left(\frac{d\Psi}{dx}\right)_{x=0} = -\frac{\sigma}{\epsilon\epsilon_0} \quad (\text{A.1.13})$$

obtemos uma expressão que relaciona σ com $\Psi(x=0) = \Psi_0$:

$$\sigma = \sqrt{2n(\infty)\epsilon\epsilon_0 kT} \left(e^{-ze\Psi_0/2kT} - e^{ze\Psi_0/2kT} \right) \quad (\text{A.1.14})$$

Em geral σ , a densidade superficial de cargas, é conhecida, e queremos saber qual o potencial eletrostático de superfície, Ψ_0 . Para que seja possível expressar Ψ_0 em função de σ , é necessário tomar o limite de campo baixo ou alto, já que a Eq. A.1.14 é uma equação transcendental. Para nosso problema, no qual temos uma densidade superficial de cargas alta, é razoável utilizar a

aproximação de campo alto, $\left|\frac{e\Psi_0}{kT}\right| \gg 1$. Nessa aproximação Ψ_0 é dado por:

$$\Psi_0 = -\frac{kT}{ze} \ln\left(\frac{\sigma^2}{2\epsilon\epsilon_0 kT n(\infty)}\right) \quad (\text{A.1.15})$$

Na aproximação de campo baixo $\Psi_0 \propto \sigma$.

Da Eq. A.1.12 é possível também calcular o potencial eletrostático em função da distância x à superfície:

$$\Psi(x) = -\frac{kT}{ze} \ln\left(\frac{1 + \gamma e^{-\kappa x}}{1 - \gamma e^{-\kappa x}}\right) \quad \gamma = \frac{e^{ze\Psi_0/2kT} - 1}{e^{ze\Psi_0/2kT} + 1} \quad (\text{A.1.16})$$

onde κ é o inverso do comprimento de blindagem de Debye λ_D , e que define a maneira como o potencial cai à medida que a distância x aumenta, é dado por:

$$\kappa = \left(\frac{2e^2 n(\infty) z^2}{\epsilon\epsilon_0 kT}\right)^{1/2} \quad (\text{A.1.17})$$

É importante notar que κ depende somente da força iônica do meio. A Eq. A.1.16 pode ser analisada nos dois limites, de campos baixo e alto:

$$\begin{aligned} \left|\frac{e\Psi_0}{kT}\right| \ll 1 \quad & \Psi(x) = \Psi_0 e^{-\kappa x} \\ \left|\frac{e\Psi_0}{kT}\right| \gg 1 \quad & \Psi(x) = \frac{2kT}{ze} \ln \frac{1 + e^{-\kappa x}}{1 - e^{-\kappa x}} \end{aligned} \quad (\text{A.1.18})$$

Para o sistema estudado, no qual a superfície carregada é formada por fosfolípidios, é interessante expressar σ em termos do grau de dissociação (α) e da área por cabeça polar (A) do fosfolípido:

$$\sigma = \frac{e\alpha}{A} \quad (\text{A.1.19})$$

O número de íons no infinito, $n(\infty)$, pode ser expresso em termos da concentração molar n (mol/l). Para tal, é necessária uma mudança de unidades, lembrando que foi usado sempre o sistema MKS.

$$n(\infty) = N_A 10^3 n \quad (\text{A.1.20})$$

onde N_A é o número de Avogadro. A Eq. A.1.18 pode ser então rescrita como

$$\Psi_o = -\frac{kT}{e} \ln \left(\frac{e^2 \alpha^2}{2 \times 10^3 \epsilon \epsilon_o A^2 k T N_A n} \right) \quad (\text{A.1.21})$$

onde $z = 1$, já que só utilizamos eletrólitos monovalentes.

O grau de dissociação α também é desconhecido e depende de Ψ_o . Ele é definido como a fração entre a concentração de DMPG na forma negativa sobre todas as outras espécies possíveis:

$$\alpha = \frac{[PG^-]}{[PG^-] + \sum_{i=1}^N [PGX_i]} \quad (\text{A.1.22})$$

onde $[]$ refere-se à concentração molar. X_i representa qualquer íon positivo que se associa com o DMPG. No atual caso estamos considerando a possível associação dos grupos fosfato da cabeça polar do DMPG com prótons e com sódios, portanto a Eq. A.1.22 pode ser particularizada para:

$$\alpha = \frac{[PG^-]}{[PG^-] + [PGH] + [PGNa]} \quad (\text{A.1.23})$$

A concentração de formas associadas de DMPG vai depender da constante de associação de cada reação possível:

$$[PG^-] + [X^+] \leftrightarrow [PGX] \quad K_X = \frac{[PGX]}{[PG^-][X^+]} \quad X = H, Na \quad (\text{A.1.24})$$

Multiplicando o numerador e o denominador da Eq. A.1.23 por $1/[PG^-]$, e escrevendo em termos das constantes de associação, temos:

$$\alpha = \frac{1}{1 + K_H [H^+]_o + K_{Na} [Na^+]_o} \quad (\text{A.1.25})$$

onde $[]_o$, que refere-se à concentração molar na superfície da membrana ($x = 0$), pode ser expressa pela distribuição de Boltzmann:

$$[X^+]_o = [X^+]_{\infty} e^{-\frac{e\Psi_o}{kT}} \quad X = H, Na \quad (\text{A.1.26})$$

Entretanto, o potencial de superfície Ψ_o também depende do grau de dissociação α , portanto é necessário substituir a Eq. A.1.21 em A.1.26 e então em A.1.24 para obter a expressão para cálculo do grau de dissociação:

$$\beta \alpha^3 + \alpha - 1 = 0 \quad (\text{A.1.27})$$

$$\beta = \frac{e^2}{2 \times 10^3 A^2 \epsilon \epsilon_o k T N_A} \left(K_H \frac{[H^+]_{\infty}}{n} + K_{Na} \frac{[Na^+]_{\infty}}{n} \right)$$

Essa é uma equação de terceiro grau que pode ser resolvida numericamente, obtendo-se o grau de dissociação a partir das constantes de associação dos íons e de suas concentrações no infinito.

A.2 - Modelo de partição entre dois sítios

O modelo de dois sítios (Castle & Hubbell, 1976) considera que o marcador pode estar ou livre em solução ou próximo à superfície da membrana. Na realidade, existe uma distribuição com a distância à membrana dada pela distribuição de Boltzmann, regulada pelo potencial de superfície Ψ_o . A aproximação feita considera que, até uma distância fixa à membrana (h), o espectro do marcador apresenta um caráter de menor mobilidade, e para distâncias maiores que h o sinal do marcador já pode ser identificado ao espectro do marcador livre em solução. No modelo, essa aproximação entra com o fato de fazermos com que o potencial eletrostático seja nulo em todo o espaço, com exceção da superfície da membrana, onde assume o valor Ψ_o , o qual queremos calcular.

Considerando, então, esse modelo de dois sítios, podemos escrever, na aproximação de gás ideal, os potenciais químicos nas duas fases:

$$\mu_{\text{sol}} = \mu^{\circ}_{\text{sol}} + kN_A T \ln X_{\text{sol}} \quad (\text{A.2.1})$$

$$\mu_{\text{surf}} = \mu^{\circ}_{\text{surf}} + kN_A T \ln X_{\text{surf}} + ZeN_A \Psi_{\text{surf}}$$

onde μ° representa o potencial químico "standard", k a constante de Boltzmann, N_A o número de Avogadro, T a temperatura absoluta, Ze a carga do marcador de spin ($Z = 1$), e X_{sol} e X_{surf} as frações molares do marcador de spin no meio aquoso e na superfície dos agregados, respectivamente. Como estamos utilizando um marcador de spin aquo-solúvel, que não apresenta uma região apolar, podemos assumir que a única interação presente é a eletrostática, e que não existe uma afinidade especial do marcador pela fase lipídica., logo $\mu^{\circ}_{\text{sol}} = \mu^{\circ}_{\text{surf}}$. A contribuição eletrostática será dada pelo potencial eletrostático na superfície, ou seja $\Psi_{\text{surf}} = \Psi_o$.

No equilíbrio termodinâmico os potenciais químicos nas duas fases têm que ser iguais, ou seja, $\mu_{\text{sol}} = \mu_{\text{surf}}$, o que resulta em:

$$\Psi_o = -\frac{kT}{e} \ln \left(\frac{X_{\text{surf}}}{X_{\text{sol}}} \right) \quad (\text{A.2.2})$$

A razão das frações molares pode ser aproximada por:

$$\frac{X_{\text{surf}}}{X_{\text{sol}}} \approx \frac{n_{\text{bound}}/V_{\text{surf}}}{n_{\text{free}}/V_{\text{sol}}} \quad (\text{A.2.3})$$

onde n_{free} e n_{bound} representam o número de moles de marcadores de spin livres em solução e localizados no volume V_{surf} , dentro do qual o marcador sente a imobilização da superfície. V_{sol} representa o volume de solução aquosa. A partição do marcador na superfície da membrana é definida como a razão:

$$P = \frac{n_{\text{bound}}}{n_{\text{free}} + n_{\text{bound}}} \quad (\text{A.2.4})$$

O número de moles total de spin, $n_{\text{free}} + n_{\text{bound}}$, é proporcional à segunda integral do espectro de EPR obtido de dCAT1 em presença de agregados anfifílicos. Se, desse sinal composto conseguimos subtrair o espectro devido ao marcador livre em solução, temos como resultado o espectro devido somente ao marcador próximo à superfície da membrana, cuja área é proporcional a n_{bound} . Então, se temos um espectro de EPR que é claramente devido à soma de duas populações do marcador de spin (o que ocorre quando a frequência de troca entre as populações é menor do que a frequência da microonda), podemos decompor o espectro em suas duas componentes: marcador livre em solução, e próximo à superfície do agregado. A partição será dada pela razão entre a segunda integral do espectro subtraído, pela segunda integral do espectro composto.

Substituindo as Eq. A.2. 3 e A.2.4 em A.2.2

$$\Psi_o = -\frac{kT}{e} \ln \left(\frac{P}{1-P} \frac{V_{\text{sol}}}{V_{\text{surf}}} \right) \quad (\text{A.2.5})$$

Como o volume disponível para o marcador na superfície do agregado é muito pequeno, assumimos que $V_{\text{sol}} = V_{\text{total}}$. Para estimar V_{surf} temos que estipular um valor para a espessura da camada na qual o marcador de spin pode localizar-se (h), de forma que $V_{\text{surf}} = (N.A.h)$, onde N é o número total de lipídios no volume V_{total} e A é a área por cabeça polar.

A Eq. A.2.5, portanto, relaciona o potencial de superfície à partição do marcador de spin na membrana, que pode ser obtido experimentalmente.

A.3 - Modelo para a densidade eletrônica de bicamadas lipídicas

Nesta seção será desenvolvido um modelo para o espalhamento de raio-X de baixo ângulo por uma bicamada lipídica de densidade eletrônica $\rho(x)$. O espalhamento de uma partícula plana (membrana no caso) promediado em todas as direções do espaço é dado por (Porod, 1982):

$$I_1(q) = A \frac{2\pi}{q^2} F_t^2(q) \quad (\text{A.3.1})$$

onde A é a área total da partícula plana, q é o vetor de espalhamento dado por $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, e o expoente de q é 2 devido à simetria da partícula. F_t é o fator de forma transversal da bicamada, dado por:

$$F_t(q) = \int_{-\frac{1}{2}}^{+\frac{1}{2}} \rho(x) \cos(qx) dx \quad (\text{A.3.2})$$

$\rho(x)$ é o perfil de densidade eletrônica perpendicular à superfície da bicamada, e t é a espessura da membrana. Se existem N membranas espalhando a intensidade total será dada por:

$$I(q) = N I_1(q) S(q) \quad (\text{A.3.3})$$

onde $S(q)$ é a função de interferência, variando entre 0 (interferência destrutiva) e N (interferência construtiva). $S(q) = 1$ na ausência de correlação. No caso de multilamelas, $S(q)$ será dada por uma função de interferência que terá máximos em $q = 2\pi/d$, onde d é a distância de repetição (espessura da bicamada + distância entre lamelas). No presente caso assumiremos $S(q) = 1$, pois não vemos a existência de um padrão de interferência nas curvas de SAXS. A intensidade total será, então, proporcional a NA , a área total correspondendo ao número de lipídios formando bicamadas. Nessa aproximação de membranas planas não correlacionadas, dada uma concentração de lipídio total, o número e tamanho das vesículas não podem alterar a intensidade espalhada, e mudanças observadas na intensidade devem ser atribuídas a mudanças no perfil de densidade eletrônica da bicamada.

O perfil de densidade eletrônico da bicamada lipídica $\rho(x)$ pode ser dividido em três regiões distintas: a cabeça polar, a cadeia acila $(\text{CH}_2)_n$ e o terminal metil CH_3 . Embora membranas reais sejam caracterizadas por mudanças contínuas entre essas regiões, foi mostrado que um modelo simples de três níveis pode fornecer uma aproximação muito boa (Wiener et al., 1989 e 1991) Esse modelo está esquematizado a seguir:

Os parâmetros R_i são os comprimentos de cada região e ρ_i suas respectivas densidades eletrônicas. A espessura t da bicamada é dada então por $t = R_1 + R_2 + R_3$. ρ_w é a densidade do meio aquoso. Como o raio-X é sensível à diferença da densidade eletrônica entre a membrana e o meio aquoso podemos definir os contraste eletrônicos de cada região como $\Delta\rho_i = \rho_i - \rho_w$.

Resolvendo a integral (Eq. A.3.2) para cada região constante de densidade eletrônica chegamos à seguinte expressão para o fator de forma:

$$F_t(q) = \frac{2}{q} \left[2\Delta\rho_1 \sin\left(\frac{qR_1}{2}\right) \cos q\left(\frac{R_1}{2} + R_2 + R_3\right) + 2\Delta\rho_2 \sin\left(\frac{qR_2}{2}\right) \cos q\left(\frac{R_2}{2} + R_3\right) + \Delta\rho_3 \sin(qR_3) \right] \quad (\text{A.3.4})$$

Utilizamos a seguinte expressão para ajustar nossos dados experimentais:

$$I = \frac{c}{q^2} F_t^2(q) \quad (\text{A.3.5})$$

onde c é uma constante de normalização. Foi verificado que o expoente de q era de fato 2, o que garantiu a validade da escolha de simetria plana para o problema.

Referências

- Alonso, A.; Meirelles, N.C. e Tabak, M. Lipid chain, dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. *Chem. Phys. Lipids* 104 (2000) 101-111.
- Atherton, N.M. "Principles of Electron Spin Resonance", Ellis Horwood Limited, 1993.
- Bagatolli, L.A. e E. Gratton. Two-phase fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 77 (1999) 2090-2101.
- Bales, B.L. Inhomogeneously broadened spin-label spectra, em "Biological Magnetic Resonance", vol. 8. Rds. Berliner, L.J. e Reuben, J. Plenum Publishing Corporation, New York, 1989. pp. 77-129.
- Benatti, C.R.; E. Feitosa, R.M. Fernandez, e M.T. Lamy-Freund. Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spins labels. *Chem. Phys. Lipids* (2001). No prelo.
- Berliner, L.J. e J. Reuben. "Biological Magnetic Resonance", vol. 8. Plenum Publishing Corporation, New York, 1989.
- Biaggi, M.H., K.A. Riske, e M.T. Lamy-Freund. Melanotropic peptides-lipid bilayer interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog. *Biophys. Chem.* 67 (1997) 139-149.
- Blume, A. Biological calorimetry: membranes. *Themochim. Acta* 193 (1991) 299-347.
- Cantor, C.R. e Schimmel, P.R. "Biophysical chemistry. Part II. Techniques for the study of biological structure and function". Cap. 7, 13 e 14. W.H. Freeman and Company, NY. 1980.
- Castle, J.D. e W.L. Hubbell. Estimation of membrane surface potential and charge density from the phase equilibrium of a paramagnetic amphiphile, *Biochemistry* 15 (1976) 4818-4831.
- Cevc, G., Watts, A. e Marsh, D. Non-electrostatic contribution to the titration of the ordered-fluid phase transition of phosphatidylglycerol bilayers. *FEBS Letters* 120 (1980) 267-270.
- Cevc, G. e D. Marsh. em "Phospholipid bilayers: physical principles and models". Wiley, New York, 1987.
- Cuccovia, I.M.; I.N. da Silva, e H. Chaimovich. New method for estimating the degree of ionization and counterion selectivity of cetyltrimethylammonium halide micelles: chemical trapping of free counterions by water soluble arenediazonium ion. *Langmuir* 13 (1997) 647-652.
- Cuccovia, I.M.; A. Agostinho-Neto, C.M.A. Wendel, H. Chaimovich, e L. Romsted. Determination of interfacial co-ion concentration in ionic micelles by chemical trapping: halide concentration at the interface of sodium dodecyl sulfate micelles. *Langmuir* 13 (1997) 5032-5035.
- Disalvo, E.A. Optical properties of lipid dispersions induced by permeant molecules. *Chem. Phys. Lipids* 59 (1991) 199-206.

- Döbereiner, H.-G., Evans, E., Seifert, U. e Wortis, M. *Phys. Rev. Letters* 75 (1995) 3360-3363.
- Döbereiner, H.-G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U. e Wortis, M. *Phys. Rev. E* 55 (1997) 4458-4474.
- Eisenberg, M.; Gresalfi, T.; Riccio, T. e McLaughlin, S. Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry* 18 (1979) 5213-5223.
- Epand, R.M. e S.W. Hui. Effect of electrostatic repulsion on the morphology and thermotropic transitions of anionic phospholipids. *FEBS Letters* 209 (1986) 257-260.
- Epand, R.M., B. Gabel., R.F. Epand, A. Sem, e S.W. Hui. Formation of a new stable phase of phosphatidylglycerol. *Biophys. J.* 63 (1992) 327-332.
- Epand, R.M. "Lipid polymorphism and membrane properties". Academic Press, NY. 1997.
- Evans, D.F. e Wennerstöm, H. Electrostatic interactions in colloidal systems. Em: "The colloidal domain, where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet", VCH Publishers, New York, 1994, pp. 110-114.
- Evans, E. *Biophys. J.* 14 (1974) 923.
- Farge, E. e Devaux, P.F. *Biophys. J.* 61 (1992) 347-357.
- Fernandez, R.M. e Lamy-Freund, M.T. Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: a comparative study with sodium ions and cholesterol. *Biophys. Chemistry* 87 (2000) 87-102.
- Freed, J.H. Em "Spin Labeling, Theory and Applications" Eds. Berliner, L.J. Academic Press, 1976. pp. 53-132.
- Gala, H-J e Sackmann, E. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. *Biochim. Biophys. Acta* 339 (1974) 103-115.
- Gaffney, B.J. em "Spin Labeling, Theory and Applications" Eds. Berliner, L.J. Academic Press, 1976. pp. 567-571.
- Gennis, R.B. "Biomembranes. Molecular Structure and Function". Springer-Verlag, New York, 1989.
- Gershfeld, N.L., Stevens Jr, W.F. e Nossal, R.J. Equilibrium studies of phospholipids bilayer assembly. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 19-28.
- Glatzer, O. e O. Kratky. "Small Angle X-ray scattering". Academic Press, New York, 1982.
- Goldman C., K.A. Riske, e M.T. Lamy-Freund. Role of soft and hard aggregates in the thermodynamics of lipid dispersions. *Phys. Rev. E* 60 (1999) 7349-7353.
- Goldman, C. Modified surface fluctuations by impurity binding in amphiphilic dispersions. *J. Chem. Phys.* 111 (2001). No prelo.
- Griffith, O.H.; Dehlinger, P.J.; e Van, S.P. J. *Membrane Biology* 15 (1974) 159-192.
- Griffith, O.H. e Jost, P.C. em "Spin Labelling. Theory and Applications" Vol.1. Ed. Berliner, L.J. Academic Press, 1976. pp. 453-523.

- Griser, F. e C.J. Drummond. The physicochemical properties of self-assembled surfactant aggregates as determined by some molecular spectroscopic probe technique. *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 5580-5593.
- Guinier, A. "Small angle X-ray scattering". John Wiley & Sons, NY. 1955.
- Guinier, A. "X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals and amorphous bodies". Dover, NY, 1994.
- Guisoni, N. e Henriques, V.B. Square water as a solvent: Monte Carlo simulations. *Braz. J. Phys.* 30 (2000) 736-740.
- Heimburg, T. e Biltonen, R.L. Thermotropic behavior of Dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33 (1994) 9477-9488.
- Helfrich, W. *Phys. Lett.* 50A (1974) 115-116.
- Helm, C.A.; Laxhuber, L.; Lösche, M. e Möhwald, H. Electrostatic interactions in phospholipid membranes. I: Influence of monovalent ions. *Colloid & Polymer Sci* 264 (1986) 46-55.
- Holopainen, J.M.; Brockman, H.L.; Brown, R.E., e Kinnunen, P.K.J. Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine: Impact of the N-acyl chain. *Biophys. J.* (2001) 765-775.
- Israelachvili, J. "Electrostatic forces between surfaces in liquids. in: Intermolecular and Surface Forces". Academic Press. London, 1992.
- Käs, J. e Sackmann, E. *Biophys. J.* 60 (1991) 825-844.
- Kellermann, G.; Vicentin, F.; Tamura E.; Rocha, M.; Tolentino, H.; Barbosa, A.; Craievich, A.; e Torriani, I. The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 880-883.
- Knowles, P.F.; Marsh, D. e Rattle, H.W.E. "Magnetic Resonance of Biomolecules" John Wiley & Sons, NY, 1976.
- Kodama M., T. Miyata, e T. Yokoyama. Crystalline cylindrical structures of Na⁺-bound dimyristoylphosphatidylglycerol as revealed by microcalorimetry and electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1168 (1993) 243-248.
- Kodama, M., H. Aoji, H. Takahashi, e I. Hatta. Interlamellar waters in dimyristoylphosphatidylethanolamine-water system as studied by calorimetric and X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1329 (1997) 61-73.
- Koshinuma, M., Tajima, K., Nakamura, A. e Gershfeld, N.L. *Langmuir* 15 (1999) 3430-3436.
- L'Heureux e M. Fragata. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. *J. Colloid Interface. Sci.* 117 (1986) 513-522.
- Lakhdar-Ghazal, F. e Tocanne, J.F. Modulation of the adsorption of alkaline cations to phosphatidylglycerol by a dimannosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 943 (1988) 19-27.

- Lakhdar-Ghazal, F., Tichiadou, J.L. e Tocanne, J.F. Effect of pH and monovalent cations on the ionization state of phosphatidylglycerol in monolayers. *Eur. J. Biochem.* 134 (1983) 531-537.
- Lakowicz, J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Plenum Press, New York and London, 1986.
- Lantzsch, G.; H. Binder, H. Heerklotz, P. Welzel, e G. Klose. Aggregation behavior of the antibiotic Meonomycin A in aqueous solution. *Langmuir* 14 (1998) 4095-4104.
- Lipowski, R. *Nature* 349 (1991) 475-481.
- Lipowsky, R. e E. Sackmann. "Structure and Dynamics of Membranes. From Cells to Vesicles", Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1995.
- Loosley-Millman, M.E., Rand, R.P. e Parsegian, V.A. Effects of monovalent ion binding and screening on measured electrostatic forces between charged phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 40 (1982) 221-232.
- Marsh, D. An interaction spin label study of lateral expansion in dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 363 (1974) 373-386.
- Marsh, D. em "Membrane Spectroscopy". Ed. Ernst Grell, Springer Verlag, 1981.
- Marsh, D. Experimental methods in spin-label spectral analysis. em "Biological Magnetic Resonance", vol. 8. Eds. Berliner, L.J. e Reuben, J. Plenum Publishing Corporation, New York, 1989. pp. 255-303.
- Marsh, D. "CRC handbook of lipid bilayers". CRC Press, Boca Raton, 1990.
- McIntosh, T.J. e S.A. Simon. Area per molecule and distribution of water in fully hydrated dilaurylphosphatidylethanolamine bilayers. *Biochemistry* 25 (1986) 4948-4952.
- McLaughlin, S. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Curr. Top. in Membr. Transp.* 9 (1977) 71-144.
- Méléard, P.; Gerbeaud, C.; Pott, T.; Fernandez-Puente, L., Bivas, I.; Mitov, D.; Dufourcq, J. e Bothorel, P. *Biophys. J* 72 (1997) 2616-2629.
- Mingtao, Ge e J. H. Freed. Electron-spin resonance study of aggregation of gramicidin in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers and hydrophobic mismatch. *Biophys. J.* 76 (1999) 264-280.
- Mitchell, D.J., e Ninham, B.W. *Langmuir* 5 (1989) 1121-1123.
- P. Mukerjee, C. Ramachandran, R.A. Pyter. Solvent effects on the visible spectra of nitroxides and relation to nitrogen hyperfine splitting constants. Nonempirical polarity scales for aprotic and hydroxylic solvents. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3189-3197.
- Nagle, J.F., R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, e H.I. Petrache. X-ray structure determination of fully hydrated $L\alpha$ phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 70 (1996) 1419-1431.

- Peitzsch, R.M.; M. Eisenberg; K.A. Sharp; e S. McLaughlin. Calculations of the electrostatic potential adjacent to model phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 68 (1995) 729-738.
- Petrache, H.I., S. Tristram-Nagle, e J.F. Nagle. Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 95 (1998) 83-94.
- Porod., General theory. em "Small Angle X-ray scattering". Eds. Glatter, O. e O. Kratky. Academic Press, New York, 1982.
- Pottel, H., van Der Meer, W., e Herreman, W. *Biochim. Biophys. Acta* 730 (1983) 181-186.
- Quina, F. H., H. Chaimovich. Ion exchange in micellar solutions. 1. Conceptual framework for ion exchange in micellar solutions. *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 1844-1859.
- Quinn, P.J., H. Takahashi, e I. Hatta. Characterization of complexes formed in fully hydrated dispersions of dipalmitoyl derivatives of phosphatidylcholine and diacylglycerol. *Biophys. J.* 68 (1995) 1374-1382.
- Riske, K.A. Dissertação de Mestrado - IFUSP, 1997.
- Riske K.A., M.J. Politi, W.F. Reed, W.F., M.T. Lamy-Freund. Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions. *Chem. Phys. Lipids* 89 (1997) 31-44.
- Riske K.A., O.R. Nascimento, M. Peric, B. Bales, M.T. Lamy-Freund. Probing DMPG vesicle surface with a cationic aqueous soluble spin label. *Biochim. Biophys. Acta* 1418 (1999) 133-146.
- Riske K.A., L. Q. Amaral e M. T. Lamy-Freund. Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (2001) 297-308.
- Rosoff, M. Drug delivery. em "Vesicles". Marcel Dekker, NY, 1996. pp. 445-560.
- Sackmann, E. *FEBS Lett.* 346 (1994) 3-16.
- Sackmann, E. Physical basis of self-organization and function of membranes: Physics of vesicles. em "Structure and Dynamics of Membranes. From Cells to Vesicles". Eds. R. Lipowsky e E. Sackmann. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1995. pp. 213-304.
- Salonen, I.S., Eklund, K.K., Virtanen, J.A. e Kinnunen, P.K.J. Comparison of the effects of NaCl on the thermotropic behaviour of *sn*-1' and *sn*-3' stereoisomers of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 982 (1989) 205-215.
- Schneider, M., D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen, e T. Heimburg. Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14312-14317.
- Seifert, U. *Adv. Phys.* 46 (1997) 13-37.
- Shinitzky, M. & Inbar, M., *J. Mol. Biol.* 85 (1974) 603-615.
- Smith, I.C.P. em "Biological Applications of Electron Spin Resonance". Eds. Swartz, H.M.; Bolton, J.R. e Borg, D.C. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc, 1972. pp. 483-539.

- Strey, R., R. Schomacker, D. Roux, F. Nallet e U. Olsson. Dilute lamellar (L3) phases in the binary water-C₁₂E₅ system. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 86 (1990) 2253-2261.
- Stubbs, G. W., Litman, B. J., Barenholz, Y. *Biochemistry* 15 (1976) 2766-2772.
- Sun, W.-J., S. Tristram-Nagle, R.M. Suter, e J.F. Nagle. Structure of gel phase saturated lecithin bilayers: temperature and chain length dependence. *Biophys. J.* 71 (1996) 885-891.
- Swartz, H.M.; Bolton, J.R. e Borg, D.C. "Biological Applications of Electron Spin Resonance". Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc, 1972.
- Teixeira, C.V.; Itri, R.; e Amaral, L.Q. Micellar shape transformation induced by decanol: A study by small-angle X-ray scattering (SAXS). *Langmuir* 16 (2000) 6102-6109.
- Tocanne, J.F. e Tessié, J. Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (1990) 111-142.
- Toko, K. e K. Yamafuji. Influence of monovalent and divalent cations on the surface area of phosphatidylglycerol monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 26 (1980) 79-99.
- Träuble, H., Teubner, M., Wooley, P. e Eibl, H. Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of pH and univalent cations on membrane structure. *Biophys. Chem.* 4 (1976) 319-342.
- Tristram-Nagle, S., H.I. Petrache, e J.F. Nagle. Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 75 (1998) 917-925.
- Turchiello R.F., L. Juliano, A.S. Ito, M.T. Lamy-Freund. How bradykinin alters the lipid membrane structure: a spin label comparative study with bradykinin fragments and other cations. *Biopolymers* 54 (2000) 211-221.
- Voet D.; J.G. Voet. "Biochemistry". 2ª edição. John Wiley & sons, Inc. New York, 1995.
- Watts A., K. Harlos, W. Maschke, e D. Marsh. Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. *Biochim. Biophys. Acta* 510 (1978) 63-74.
- Wiener, M.C. e S.H. White. Structure of a fluid dioleoyl phosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of X-ray and neutron diffraction data. III. Complete Structure. *Biophys. J.* 61 (1992) 434-447.
- Wiener, M.C., Suter, R.M., d Nagle, J.F. Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys. J.* 55 (1989) 315-325.
- Wiener, M.C., G.I. King, e S.H. White. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. I. Scaling of neutron data and the distribution of double bonds and water. *Biophys. J.* 60 (1991) 568-576.
- Winterhalter, M., e Helfrich, W. *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 6865-6967.
- Zhang, Y.P., R.N.A.H. Lewis, e R.N. McElhaney. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behaviour of the n-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. *Biophys. J.* 72 (1997) 779-793.

Trabalhos publicados