Universidade de São Paulo
Instituto de Física

PROPRIEDADES DINÂMICAS DE FASES
CONDENSADAS DE DNA

Cássio Alves

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Andreoli Oliveira

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Elisabeth Andreoli Oliveira (IF-USP)

Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy (IF-USP)

Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold (CFM-UFSC)

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Alves, Cássio

Propriedades dinâmicas de fases condensadas de DNA. São Paulo, 2010.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física, Departamento de Física Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira

Área de Concentração: Física da Matéria Condensada

Unitermos: 1. Física da matéria condensada; 2. Mudança de fase;
3. Biofísica; 4. Físico-química; 5. Processamento de imagens.

USP/IF/SBI-073/2010

“Por vezes o sopro da vida,
muda a direção da história.”

Anônimo

Aos meus pais,
pelo grande apoio.

Agradecimentos

Sintetizar agradecimentos a todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, mostrou ser uma tarefa difícil. Gostaria de deixar registrada aqui minha imensa gratidão e meu reconhecimento a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o êxito deste trabalho. Agradeço:

A meus Pais pelo grande incentivo e apoio e a toda a família em especial, pelo apoio, respeito, compreensão e principalmente pelo incentivo. Muito Obrigado.

A Lorena G. de Almeida pelo apoio, e companhia nos bons e maus momentos da trajetória deste trabalho.

A orientadora Elisabeth Andreoli pela oportunidade de realizar este trabalho no GFCx e CRPP.

A Laurence Navailles e Frederic Nallet pela orientação, recepção e pelas oportunidades oferecidas no CRPP-Université de Bordeaux na França.

Ao Prof. Cristiano Oliveira pela orientação na área computacional e análise dos resultados, por disponibilizar o software para análise de erros e pela grande contribuição oferecida para este trabalho.

A S. Seiffert e W. Oppermann por disponibilizarem os softwares de análises e simulação.

A Jens Dobrint por disponibilizar os softwares utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Antônio Martins Figueiredo Neto pela disponibilização dos recursos técnicos oferecidos para realização deste trabalho no grupo.

Um agradecimento especial a três pessoas, fundamentais para realização deste trabalho, que também fizeram parte da orientação deste trabalho: Emerson R. T. da Silva, Fernando Batalioto e Odair Gimenes. Ao Emerson pela grande amizade, pelo respeito, pela recepção no grupo do GFCx-USP e do CRPP-Bordeaux, pela motivação, pela orientação nas simulações, pelos softwares disponibilizados e correção dos mesmos, pelas longas discussões e adaptações do instrumental e pela disponibilização dos dados e resultados das partículas de látex. Ao Fernando por todo apoio, pelas sugestões, pelas longas discussões sobre a teoria e os resultados deste trabalho. Ao Odair pelas longas conversas, por sempre apresentar uma boa solução para os problemas mais difíceis, pela

orientação da parte instrumental deste trabalho e pela orientação sobre o processo de análises de imagens.

A N. Cazalas e A. Fevrier pelas amostras e pela disponibilização dos protocolos utilizados.

A Renata N. Bicev pela disponibilização dos dados de raios X sobre a mesofase colestérica do DNA e por todo apoio. A Bruno Honda, Alexsander Duarte, Diogo Soga, Barbara B. Gerbelli, Cleide, Ellen Binotto, Edneuma de Oliveira e José Paulino pelo apoio.

Aos demais colegas e funcionários do grupo GFCX pelo apoio e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao INCT de Fluidos Complexos pelo financiamento deste trabalho.

Resumo

A preparação de vetores sintéticos para terapia gênica envolve a encapsulação de DNA em pequenos volumes em altas concentrações e nessas condições sabe-se que as moléculas de DNA podem se organizar formando estruturas líquido-cristalinas. Essas moléculas, uma vez incorporadas a célula devem difundir e vários trabalhos experimentais têm mostrado que essa difusão é limitada pelo tamanho dos fragmentos de DNA. É nesse contexto que soluções de DNA *in vitro* constituem um sistema modelo para o estudo de processos dinâmicos de difusão na fase isotrópica e na fase anisotrópica.

Neste trabalho investigamos a difusão de fragmentos de DNA de 150 pares de base dispersos em água com concentrações variando no intervalo de 80 a 350 mg/ml, que se situam no domínio da fase isotrópica e da fase colestérica, passando uma região intermediária de coexistência de fases. Nessas soluções foi acrescentado sal, em concentração suficiente para blindar as interações eletrostáticas repulsivas, de maneira que os fragmentos de DNA podem ser tratados como cilindros rígidos e não interagentes. A técnica de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleach) foi empregada para determinação do coeficiente de difusão dos fragmentos de DNA que foram marcados com uma prova fluorescente, que se intercala entre os nucleotídeos por meio de uma ligação covalente. As imagens de FRAP foram analisadas segundo dois métodos diferentes para ajuste do perfil de intensidade de luz na mancha de bleach, que pode ser dado por uma função gaussiana, no caso de um processo de difusão isotrópico, ou uma por uma função de Bessel modificada no caso de um processo de difusão anisotrópico.

Na fase isotrópica a função gaussiana é a que melhor descreve o perfil de intensidade de luz da mancha de bleach e o valor obtido para o coeficiente de difusão dos fragmentos de DNA está em torno de $20 \mu m^2/s$, que é um valor compatível com os valores encontrados na literatura para soluções de DNA com fragmentos de mesma dimensão na fase isotrópica. Na fase colestérica, a análise das imagens de FRAP mostrou que o perfil de intensidade de luz é mais bem ajustado por uma função de Bessel modificada, permitindo a determinação dos coeficientes, D_1 e D_2 , que correspondem aos coeficientes de difusão paralelo e perpendicular à direção de orientação molecular local, respectivamente. Nessa mesofase, os valores obtidos para o coeficiente de difusão estão

entre $10^{-1}\mu m^2/s$ e $10^{-2}\mu m^2/s$, com uma anisotropia, $D_1/D_2 \cong 12$. Esses resultados são compatíveis com os obtidos para soluções de vírus f_d na fase nemática. Também foram feitas medidas para amostras com composição que se situam na região intermediária entre a fase isotrópica e a fase colestérica e que podem apresentar duas ou até três fases em coexistência. A análise das imagens permitiu a identificação de processos de difusão anisotrópico e isotrópicos, em uma mesma amostra, comprovando a coexistência de fases que não são identificadas apenas pela observação da textura em microscopia de luz polarizada.

Palavras-chave: Difusão, Cristais Líquidos, DNA

Abstract

Preparation of synthetic vectors for gene therapy applications implies encapsulation of DNA in small cavities in high concentrations and in these conditions DNA molecules self-organize forming liquid crystalline structures. Once incorporated to the cell, DNA must diffuse in cytoplasm and many experimental work have demonstrated that such diffusion is limited by the fragments size. In this context, DNA solutions can be regarded as a promising model system for investigating isotropic and anisotropic diffusion.

In this work we have investigated diffusion of DNA fragments, (150 base pairs), dissolved in water, for concentrations varying from 80 mg/ml to 350 mg/ml, ranging the domains of isotropic and cholesteric phases, with an intermediary region of phase coexistence. Salt was added to the solution, in concentration high enough to screen repulsive electrostatic interactions allowing us to regard DNA fragments as non interacting rigid rods. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleach) technique was used to determine diffusion coefficients of DNA fragments marked with a fluorescent probe, which binds covalently to the nucleotides. Analysis of FRAP images are performed following two possible fittings to the intensity profile in bleach zone, which can be a Gaussian function, for isotropic diffusion, either a Bessel modified function if the diffusion process is anisotropic.

In the isotropic phase the Gaussian function was found to be more appropriate to describe the intensity profile in the bleach spot zone, resulting in a diffusion coefficient around $20 \mu m^2/s$, which is compatible with values reported in literature for DNA solutions of fragments of the same dimension in the isotropic phase. Image analysis in the cholesteric phase has shown that light intensity profile of the bleach spot is best fitted with a Bessel modified function, allowing us to determine two diffusion coefficients, D_1 and D_2 , corresponding to the diffusion coefficients parallel and perpendicular to the local molecular orientation, respectively. In such mesophase the obtained values for the diffusion coefficients are around $10^{-1} \mu m^2/s$ and $10^{-2} \mu m^2/s$, with an anisotropy; $D_1/D_2 \cong 12$. Such results are compatible with results obtained in the nematic phase of virus f_d solutions. Solutions with concentrations lying in the intermediary zone presenting two or even three phase in coexistence were also investigated. By applying the

two fitting profiles to the bleach spot it was possible to identify zones in the sample corresponding to isotropic diffusion process and other zones presenting anisotropic diffusion process. This confirms the coexistence of isotropic and anisotropic phases, which cannot be identified only by optical polarized microscopy.

Keywords: Diffusion, Liquid Crystals, DNA

Sumário

Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Símbolos	xiii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
2.1 MESOFASES LÍQUIDO CRISTALINAS	7
2.1.1 Microscopia de Luz Polarizada e Caracterização das Mesofases LC	11
2.1.2 Caracterização do DNA Utilizado	16
2.1.3 Mesofases Líquido-Cristalinas de Soluções de Fragmentos de DNA	16
2.1.4 Transições de fase em soluções de cilindros rígidos	19
2.2 DIFUSÃO	22
2.2.1 Leis de Fick	23
2.2.2 Difusão de Partículas Isométricas em Solução Diluída	26
2.2.3 Difusão de Partículas Anisométricas	28
2.3 TÉCNICA DE FRAP	37
2.3.1 Moléculas Fluorescentes	39
2.3.2 Recuperação de Fluorescência	41
3 METODOLOGIA	47
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	47
3.2 IMPLEMENTAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FRAP	50
3.3 MÉTODO DE ANÁLISE DAS IMAGENS DE FRAP	51
3.3.1 Análise das Imagens de FRAP	53

4	RESULTADOS	56
4.1	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS EXPERIMENTAIS E DE ANÁLISE DOS DADOS	56
4.1.1	Simulação das Imagens de FRAP	56
4.1.2	Calibração do Arranjo Experimental Desenvolvido no GFCx . .	58
4.2	DIFUSÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	63
4.2.1	Fase Isotrópica	63
4.2.2	Mesofase Colestérica, Domínio Planar	70
4.2.3	Coexistência de Mesofases	72
4.3	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	76
5	CONCLUSÕES	87
A	Solução da Segunda lei de Fick	91
B	Software de Análise	93
	Referências Bibliográficas	96

Lista de Abreviaturas

GFCx	Grupo de Flúidos Complexos (<i>Grupo de Flúidos Complexos</i>).
FRAP	Recuperação de Fluorescência Após Photobleching
bleach	photobleaching
DLS	Dynamic Light Scattering
LC	Líquido Cristalina
lp	Comprimento de Persistência
FRS	Espalhamento forçado Rayleigh
QELS	Espalhamento de luz quase-elástico
CRPP	Centre de Reserche Paul Pascal
TF	Transformada de Fourier

Lista de Símbolos

C	Concentração
C_0	Concentração inicial ou quantidade total de substância
D	Coefficiente de Difusão ($\mu m^2/s$)
t	Tempo (s)
J	Fluxo de Matéria
A	Valor Constante
d	diâmetro
pb	pares de base
ϕ	fração volumétrica
d_{eff}	diâmetro efetivo
X_i	índice em que uma fase anisotrópica começa a aparecer na solução LC
X_a	índice em que a fase isotrópica desaparece na solução LC
L	comprimento
k	constante de Boltzmann
η	viscosidade
S	parâmetro de ordem

Lista de Figuras

1.1	<i>Estrutura do DNA</i>	2
1.2	<i>(a) Representação esquemática de uma Mesofase isotrópica constituída de moléculas alongadas. (b) Representação esquemática de uma mesofase nemática, o diretor $\hat{n}$ indica o eixo preferencial de alinhamento das moléculas, o eixo diretor [1].</i>	3
1.3	<i>Representação da mesofase Colestérica: as setas vermelhas representam os eixos locais nemáticos em rotação em torno do $\hat{z}$, eixo diretor colestérico.</i>	3
2.1	<i>Orientação de uma molécula em forma de bastão, em relação ao diretor $\vec{n}$ [1]</i>	9
2.2	<i>Comportamento do parâmetro de ordem escalar S em uma transição de primeira ordem. T_c é a temperatura crítica de transição, figura didática adaptada.</i>	9
2.3	<i>Exemplo Representativo de uma transição de segunda ordem. O parâmetro de ordem S varia continuamente com a temperatura T até T_c, temperatura crítica de transição, figura didática adaptada.</i>	10
2.4	<i>Representação de duas mesofases esmélicas [1]: a) Representação da mesofase esmélica A, (b) Representação da mesofase esmélica C</i> . . .	11
2.5	<i>Fase Hexagonal: corresponde a um arranjo com o centro de massa dos cilindros formando uma rede hexagonal 2D. Nesta mesofase os cilindros apresentam mobilidade na direção paralela ao seu próprio eixo. a) Representação da Mesofase hexagonal dos fragmentos de DNA; b) Foto obtida usando microscopia de luz polarizada de uma amostra na mesofase hexagonal (DNA + água)</i>	12

2.6	$E_{//}$ e $E_{\perp}$ representam a direção do campo elétrico paralela e perpendicular à direção de orientação de um meio anisotrópico, com orientação dada pelo vetor $\hat{n}$ [2]. E_i é o campo elétrico da onda incidente sobre a amostra, E_t é o campo elétrico da onda transmitida pelo analisador e ϕ é a diferença de fase entre as duas componentes após atravessar o meio anisotrópico. Para um meio isotrópico ϕ seria igual a zero e não haveria campo elétrico transmitido pelo analisador.	13
2.7	(a) Representação da mesofase colestérica na região de domínio homeotrópico. (a') Textura visualizada, entre polarizadores cruzados, na região colestérica homeotrópica (fingerprints). $P/2$ é igual a metade do passo colestérico [3].	14
2.8	(a) Representação da mesofase colestérica na região de domínio planar. (a') Textura visualizada, entre polarizadores cruzados, na região colestérica planar [3]. C é eixo diretor colestérico e eixo de propagação da luz.	15
2.9	Foto obtida usando microscopia de luz polarizada de uma amostra na mesofase colestérica (fragmentos de DNA + água): H é uma região de domínio homeotrópico e P é uma região de domínio planar.	15
2.10	Diagrama de transição de mesofases (temperatura vs concentração) dos fragmentos de DNA (~ 150 pb) em solução de (A) 0,01M de Na^+ e (B) 0,1 M de Na^+ . Isotrópica (I); Isotrópica viscosa (I'); pré-colestérica (PC); colestérica (C); Alta ordem (AO). Adaptado de [4].	18
2.11	Evolução do passo colestérico [5] com diferentes sais e concentração de sal da solução tampão de fragmentos de DNA	19
2.12	Cilindro de dupla hélice. (a) A orientação molecular é desenhada concêntrica a superfície do cilindro. O passo entre as moléculas ocorre ao longo do raio. (b) Os cilindros de dupla hélice estão desordenados em um líquido isotrópico em uma fase tipo BPIII. (c) Cúbica simples. (d) Cúbica de corpo centrado. [3].	20
2.13	Esquema do processo difussivo através de um elemento de volume de espessura Δx [6]. Em que x é a posição, C a concentração e D uma constante de proporcionalidade. J é o fluxo de material que passa num ponto x	25

2.14	<i>Resultados do coeficiente de Difusão de fragmentos de 150pb de DNA solubilizados em diferentes concentrações e em diferentes concentrações de NaCl, obtidos por meio do uso da técnicas de Espalhamento Rayleigh (FRS) e Espalhamento quase elástico de luz(QELS) [7].</i>	31
2.15	<i>Coeficiente de difusão de cilindros de argila em solução, [8]. Os pontos experimentais (■) são ajustados segundo as simulações de Löwen (o) para cilindros com $L/D=4$. Os pontos (Δ) correspondem a simulações com para $L/D=6$. A linha pontilhada representa o modelo de Odijk, que é aplicável em um pequeno intervalo de concentrações.</i>	32
2.16	<i>Curva da previsão teórica da razão dos coeficientes de Difusão, $\frac{D_{//}}{D_{\perp}}$ para cilindros com fator de forma $p = 25$ [9] em função do parâmetro de ordem, S.</i>	34
2.17	<i>Razão dos coeficientes de difusão de longo alcance, $\frac{D_{//}}{D_{\perp}}$ plotados como função do parâmetro de ordem nemático S. A linha sólida é o limite superior. Resultados na fase esmética A são dados por triângulos [10].</i>	34
2.18	<i>Comportamento do coeficiente de difusão de partículas coloidais cilíndricas com fator de forma $L/d=19$, na fase isotrópica (■) e na fase nemática em coexistência, na direção paralela aos cilindros (●) e perpendicular aos cilindros (◆). A linha pontilhada representa o comportamento do coeficiente de difusão na fase isotrópica extrapolado para todo domínio de concentração [11].</i>	35
2.19	<i>Evolução do coeficiente de difusão em uma solução de vírus fd, com fator de forma $\frac{L}{d} \cong 130$, na fase isotrópica e nemática. (a) $D_{//}$ (■) e $D_{\perp}$ (▲); (b) Comparação da anisotropia de difusão com simulações [12].</i>	36
2.20	<i>Após o photobleaching: Imagens retiradas por meio do uso de microscopia fluorescente, de amostras de fragmentos de 150pb de DNA, 200(mg/ml), marcados com YOYO</i>	38
2.21	<i>Estrutura química das moléculas de YO e YOYO [13].</i>	40
2.22	<i>Absorção(-), excitação fluorescente (...) e emissão (- -) de YO em glicerol. O espectro de emissão excita no comprimento de onda de 488nm e o espectro de excitação emite no comprimento de onda de 550nm [13].</i>	41
2.23	<i>(a) Evolução da intensidade de luz na região da mancha de photobleaching. Para cada instante t_i o perfil é ajustado à uma gaussiana. (b) O coeficiente de difusão D é obtido a partir da evolução das variâncias das gaussianas no tempo. O coeficiente angular da reta é $4D$.</i>	43

2.24	<i>Esquema do emprego da técnica de FRAP em uma mesofase colestérica no domínio planar. A esquerda o modelo espacial da integração das elipses formadas após o photobleaching em cada uma das “camadas” nemáticas locais, neste caso o ajuste realizado é a Bessel modificada de ordem zero I_0.</i>	46
3.1	<i>Esquema microscopia confocal: confocalidade [14].</i>	51
3.2	<i>Representação esquemática do Arranjo Experimental desenvolvido no GFCx. (a) Representação do arranjo para realização do photobleaching; (b) Representação do arranjo para realização da observação usando FRAP.</i>	52
3.3	<i>Fotos do Arranjo Experimental desenvolvido no GFCx.</i>	53
3.4	<i>Fluxograma do algoritmo desenvolvido por Seiffert e Oppermann [15, 16] para realizar análise de imagens de FRAP, imagens de amostras fluorescentes e ilustrações dos ajustes dos dados</i>	54
4.1	<i>Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 10% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0\mu\text{m}^2/\text{s}$. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).</i>	59
4.2	<i>Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 10% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0\mu\text{m}^2/\text{s}$, a mancha de bleach ocupa uma área da imagem muito maior do que na figura (4.1). (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).</i>	60
4.3	<i>Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 20% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0\mu\text{m}^2/\text{s}$. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).</i>	61
4.4	<i>Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 40% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0\mu\text{m}^2/\text{s}$. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).</i>	62
4.5	<i>Distribuição de tamanho das partículas de látex. Figura gentilmente cedida pelo estudante Emerson Rodrigo Teixeira da Silva.</i>	64

4.6	<i>Imagens adquiridas por meio do arranjo experimental desenvolvido no GFCx e resultados das análises para amostra de esferas (diâmetro de 100nm) de látex 0,03% em volume em solução de 50% de glicerina. (a) Imagem da mancha de photobleach.(b) Perfil das imagens de FRAP, e ajuste de um perfil Gaussiano. (c) Evolução da largura da mancha de photobleach</i>	65
4.7	<i>Imagens adquiridas no microscópio confocal e resultados das análises para amostra de 81(2)(mg/ml)(DNA+água deionozida) de fragmentos de DNA nas fases isotrópica e isotrópica viscosa. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).</i>	68
4.8	<i>Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 81(2)(mg/ml)(DNA em solução aquosa) de fragmentos de DNA na mesofase isotrópica.</i>	69
4.9	<i>Imagens adquiridas no microscópio confocal pra solução de fragmentos de DNA na mesofase colestérica. Imagens de baixo aumento: (a) fluorescencia da amostra, (b) textura de microscopia em luz polarizada: domínio planar (P) e domínio homeotrópico (H). (c) Mancha de photobleaching (d) textura correspondente à região planar onde foi realizado o photobleaching.</i>	73
4.10	<i>Análise das imagens adquiridas no microscópio confocal para solução na fase colestérica. (a) e (b) perfil gaussiano ajustado e (c) e (d) ajuste com perfil de função de Bessel modificada.</i>	74
4.11	<i>Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo.</i>	75
4.12	<i>Imagens adquiridas no microscópio confocal da amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂) de fragmentos de DNA. Imagens de baixo aumento: (a) fluorescencia da amostra, (b) textura de microscopia em luz polarizada: oticamente isotrópica. (c) Imagens, de fluorescencia da amostra, com aumento na região de photobleaching:</i>	80
4.13	<i>Análise das imagens adquiridas no microscópio confocal para solução na de 165(2)(mg/ml)(DNA+C₂H₇NO₂). (a) e (b) perfil gaussiano ajustado e (c) e (d) ajuste com perfil de função de Bessel modificada.</i>	81
4.14	<i>Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂) de fragmentos de DNA em uma região de coexistência de mesofases.</i>	82

4.15	<i>Imagens adquiridas no microscópio confocal e resultados das análises para amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂). (a) e (b) perfil gaussiano ajustado e (c) e (d) ajuste com perfil de função de Bessel modificada.</i>	83
4.16	<i>Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂) de fragmentos de DNA em uma região de coexistência de mesofases.</i>	84
4.17	<i>Imagens adquiridas com o arranjo desenvolvido no GFCx e resultados das análises para amostra de 160(1)(mg/ml)(DNA+água deionizada) de fragmentos de DNA. (a) Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado (Gaussiano ou Bessel) em cada imagem. (b) Perfil retirado, das imagens de FRAP, e ajuste de um perfil Gaussiano. (c) Evolução da largura da mancha de photobleach (ajuste de perfil Gaussiano), em função do tempo. (d) Perfil retirado, das imagens de FRAP, e ajuste de um perfil Bessel Modificado. (f) Evolução da largura da mancha de photobleach (ajuste de perfil Bessel modificada), em função do tempo.</i>	85
4.18	<i>Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 160(1)(mg/ml)(DNA+água deionizada) de fragmentos de DNA em uma região de coexistência de mesofases.</i>	86
4.19	<i>Evolução dos valores dos coeficientes de difusão para amostras nas mesofases isotrópica, colestérica e com coexistência de mesofases. I corresponde ao domínio da fase isotrópica e N* à mesofase colestérica. Na região entre as duas fases há coexistência de duas ou até três mesofases.</i>	86
B.1	<i>Fluxograma de funcionamento do software de Análise. Em que N é o total de imagens e i é a i-ésima imagem.</i>	95

Lista de Tabelas

2.1	<i>Algumas características das moléculas de DNA.</i>	16
2.2	<i>Valores esperados para as concentrações críticas para a transição isotrópica - anisotrópica, segundo os modelos de Onsager e Flory, considerando fragmentos de DNA com $L=50\text{nm}$ e $d=2\text{nm}$.</i>	22
2.3	<i>Regime de concentração para soluções de cilindros rígidos com $p = L/d = 25$ [17].</i>	29
4.1	<i>Comparação dos resultados obtidos por meio de imagens simuladas e dois tipos diferentes de análise das mesmas imagens.</i>	58
4.2	<i>Valores dos coeficientes de Difusão, de fragmentos de DNA, obtidos neste trabalho e valores encontrados na literatura. DLS: Espalhamento de luz dinâmico; QELS: Espalhamento de luz quase-elástico; FRS: Espalhamento forçado Rayleigh.</i>	70
4.3	<i>Valores médios dos coeficientes de Difusão de fragmentos de DNA, em regiões de coexistência de mesofases nas contrações de fragmentos de DNA próximas de $160(\text{mg/ml})$. * valor de apenas uma medida.</i>	77
4.4	<i>Síntese geral dos valores dos coeficientes de Difusão, de fragmentos de DNA, obtidos neste trabalho com uso de FRAP. Primeiro bloco amostras isotrópicas, segundo bloco amostras com coexistência de mesofases e terceiro bloco amostra colestérica. técnicas: X^C - microscopia confocal; X^F - microscopia convencional; GFCx * valor de apenas uma medida.</i>	77

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Motivação

O DNA é a molécula que carrega a informação genética de um indivíduo e é formada por duas fitas que formam uma dupla hélice. Quatro tipos de nucleotídeos (ou bases) se combinam de maneira complementar formando ligações com pontes de hidrogênio entre as fitas. Essa molécula é um biopolímero com comprimento de persistência da ordem de 50nm (150 pares de base) rodeado por cargas negativas (2 elétrons/ par de base), figura(1.1). Nos seres vivos, o DNA encontra-se exclusivamente no núcleo das células eucariotas e as cadeias podem atingir alguns metros de comprimento. A concentração é relativamente alta, da ordem de dezenas de miligramas por ml e durante o ciclo celular o DNA passa por processos alternados de condensação e dispersão [3,4]. A condensação pode ser provocada por diferentes fatores; agentes químicos que modificam as interações eletrostáticas entre os diferentes segmentos, modificação das interações entre o DNA e o solvente, interações de volume excluído por mudanças na conformação do polímero ou aumento de concentração, distorção da estrutura helicoidal ou ainda uma combinação desses fatores.

Mesofases líquido cristalinas de DNA podem ser observadas *in vitro* em soluções concentradas, com uma fase nemática colestérica (N*), figuras (1.2 e 1.3) e uma fase colunar hexagonal (H). A transição da fase isotrópica, figura (1.2(a)), para a fase colestérica,

Figura 1.1: *Estrutura do DNA*

figura (1.3), se dá com uma região de coexistência de fases, cujas naturezas dependem da concentração de sal presente na solução e do tamanho dos fragmentos [3,4]. Na fase nemática colestérica as moléculas organizam-se localmente como em um nemático, com ordem orientacional de longo alcance, porém a direção de orientação descreve uma hélice no espaço. Algumas observações *in vivo* [18] confirmam a existência de um arranjo das moléculas que correspondem a um ordenamento colestérico.

Recentemente, muitos estudos têm se concentrado na preparação de vetores onde o DNA encontra-se encapsulado em pequenos volumes, tendo em vista aplicações em terapia gênica. Alguns estudos demonstraram que a difusão do DNA no citoplasma é limitada pelo tamanho dos fragmentos e pelas ligações com proteínas, presentes em alta concentração no meio celular [19–21]. Mudanças de conformação, agregação com proteínas, heterogeneidade do meio e efeitos de confinamento, são fatores que afetam a difusão do DNA no meio celular e que tornam a descrição desse fenômeno bastante

Figura 1.2: (a) Representação esquemática de uma Mesofase isotrópica constituída de moléculas alongadas. (b) Representação esquemática de uma mesofase nemática, o diretor $\hat{n}$ indica o eixo preferencial de alinhamento das moléculas, o eixo diretor [1].

complexa [22–25].

Figura 1.3: Representação da mesofase Colestérica: as setas vermelhas representam os eixos locais nemáticos em rotação em torno do $\hat{z}$, eixo diretor colestérico.

Efeitos de confinamento no movimento browniano foram observados experimentalmente em partículas no sangue [26] e também na difusão de nucleosomos em soluções de proteínas [27], mimetizando a concentração de DNA e histones no núcleo. Esses efeitos foram explorados em sistemas modelos, como por exemplo, na investigação do movimento browniano de esfero-cilindros confinados em duas dimensões [28], na difusão

de moléculas confinadas entre bicamadas de lipídios [29–32] e na difusão de DNA sobre uma membrana [25].

Difusão em sistemas coloidais

Em uma solução diluída cilindros rígidos não interagentes estão completamente desordenados, mas à medida que a solução torna-se mais concentrada, os cilindros passam a apresentar certo ordenamento alinhando-se com seus eixos de simetria paralelos entre si, porém a posição do centro de massa permanece desordenada. Essa transição foi descrita originalmente por Onsager [33, 34], considerando cilindros rígidos bastante longos. Nessa transição, há uma diminuição da entropia rotacional que é compensada pelo aumento da entropia de translação. A mobilidade dos cilindros na direção do seu eixo de simetria é mais rápida do que na direção transversal, resultando em uma anisotropia de difusão.

Uma das dificuldades para a descrição teórica da dinâmica browniana de cilindros está relacionada às interações hidrodinâmicas de longo alcance, mediadas pelo fluxo do solvente. No caso de soluções diluídas essas interações podem ser desprezadas e é possível obter soluções analíticas para o coeficiente de difusão. Estudos experimentais e teóricos têm sido feitos para investigar o comportamento dinâmico de cilindros ou em soluções nos diferentes regimes de diluição [7–10, 12, 35, 36] e vários resultados teóricos podem ser aplicados para descrever o comportamento de fragmentos de DNA em solução.

Em soluções diluídas fragmentos de DNA de 150 pares de base comportam-se como bastões rígidos não interagentes e o coeficiente de difusão é da ordem de 10 a 20 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ [7, 19]. Do ponto de vista teórico, a difusão de cilindros rígidos no regime diluído foi estudada por diferentes autores e o coeficiente de difusão é obtido introduzindo-se algumas correções na equação de Stokes-Einstein e independe da concentração de [35]. Para fragmentos longos, pode-se esperar um comportamento difusivo

característico de cadeias flexíveis, e alguns resultados experimentais mostram essa mudança de comportamento [22, 23].

Aumentando-se a concentração de cilindros, mas ainda fase isotrópica passamos para o regime semidiluído, em que o coeficiente de difusão passa a depender da concentração. Nesse regime de diluição encontramos na literatura alguns resultados experimentais obtidos para soluções de partículas de argila [8], fragmentos de DNA [7], soluções de vírus mosaico de Tabaco (vírus f_d) [12], partículas de goetita [37], e também trabalhos teóricos que procuram estabelecer uma relação entre o comportamento do coeficiente de difusão e a concentração [8–10].

Em fases anisotrópicas, o processo de difusão foi estudado experimentalmente para o cristal líquido termotrópico PAA por diferentes pesquisadores [38, 39]. Há uma grande dispersão nos valores experimentais para o coeficiente de difusão (D) e a anisotropia de difusão $\left(\frac{D_{//}}{D_{\perp}}\right)$ observada é da ordem de 2. Em soluções de esfero-cilindros confinados [28] e em soluções de vírus de tabaco na fase nemática [12], na fase esmética [40] o passeio aleatório de uma partícula individual pode ser seguido utilizando microscopia de fluorescência e partículas marcadas com provas fluorescentes. Para os esferos cilindros confinados em duas dimensões, os dados experimentais mostram um desvio do comportamento gaussiano esperado para o valor do deslocamento quadrático médio $\langle r^2(t) \rangle$ [28] e anisotropia de difusão da ordem de 7 a 10. Na fase esmética, em que os vírus se organizam em camadas periódicas com ordem orientacional no interior das camadas, verificou-se que o deslocamento das partículas na direção perpendicular as camadas esmélicas pode ser descrito como um processo browniano unidimensional em um potencial periódico com um fator de fricção bastante alto, tornando o processo subdifusivo, isto é $\langle r^2(t) \rangle = Ct^\gamma$, onde t é o tempo de observação, e $\gamma < 1$.

Existem na literatura várias abordagens teóricas diferentes com previsões sobre a anisotropia o comportamento do coeficiente de difusão na fase nemática e sobre sua evolução ao longo dessa fase [9, 10]. De modo geral, a evolução da anisotropia ao longo

da fase nemática prevista por esses modelos concorda qualitativamente com resultados experimentais, isto é, há um aumento da anisotropia com aumento do parâmetro de ordem, mas há discrepâncias sobre os valores [12].

Objetivos

O objetivo deste trabalho é estudar a difusão de fragmentos de DNA em soluções na fase isotrópica e na fase colestérica. Para esse estudo serão utilizados fragmentos de DNA de 150 pares de base e serão preparadas soluções contendo sal em concentração suficiente para blindar as interações eletrostáticas repulsivas, de maneira que os fragmentos de DNA podem ser tratados como cilindros rígidos e não interagentes.

Os fragmentos de DNA têm aproximadamente 2nm de diâmetro e 50nm de comprimento, e não podem ser visualizados individualmente. Assim a técnica mais apropriada para o estudo do processo de difusão, é a técnica de FRAP que consiste em produzir uma destruição local irreversível em uma região muito pequena da amostra (*bleach*), com condições de contorno bem conhecidas. Para isso as moléculas de DNA são marcadas com uma prova fluorescente (YOYO), que se intercala entre os nucleotídeos, por meio de uma ligação covalente. Por difusão, a fluorescência no local do *bleach* é recuperada, e a análise da evolução da recuperação de fluorescência permite a determinação do coeficiente de difusão. Neste trabalho, serão utilizados métodos de análise das imagens de FRAP que permitem a investigação de processos de difusão anisotrópicos e a determinação dos valores dos coeficientes de difusão em diferentes direções e da anisotropia de difusão.

O estudo de soluções de DNA in vitro pode trazer contribuições para a compreensão de propriedades físico-química de polietrólitos concentrados e também para a compreensão de processos biológicos relevantes que envolvem a difusão de macromoléculas.

Capítulo 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 MESOFASES LÍQUIDO CRISTALINAS

Os cristais líquidos formam um estado intermediário da matéria entre a fase líquida e sólida. Sua denominação vem do fato de apresentarem propriedades mecânicas similares às de um líquido, exibindo, porém, anisotropia em suas propriedades ópticas, elétricas e magnéticas, que são características de sólidos cristalinos. A existência desse estado intermediário da matéria (mesofase), é devida a duas características principais: i) fluidez de líquidos e ii) ordenamento molecular intermediário (sólido-líquido), ou seja, ordem orientacional e posicional de longo alcance de sólidos cristalinos (no máximo duas dimensões). A ordem orientacional das moléculas (ou agregados de moléculas) é a principal característica dos cristais líquidos e está relacionada à orientação média de suas moléculas em relação a uma direção preferencial. Esta direção preferencial é descrita por um vetor unitário $\hat{n}$, denominado diretor, figura 1.2(b). Como ficará claro no decorrer do texto, outra característica importante é que as direções $\hat{n}$ e $-\hat{n}$ são equivalentes.

A característica fundamental para a formação de mesofases líquido cristalinas (LC) é que as moléculas de um material ou substância, em estudo, apresentem anisotropia de forma, ou seja, essas mesofases só são exibidas por materiais ou substâncias constituídos por moléculas com anisometria.

Os materiais que apresentam mesofases líquido cristalinas dividem-se em duas grandes famílias, segundo o parâmetro relevante para as transições de fase, podendo ser Cristais Líquidos Termotrópicos ou Liotrópicos [41]. Os Cristais Líquidos Termotrópicos são constituídos por substâncias orgânicas, compostas por moléculas anisométricas (moléculas alongadas, ou em forma de disco) que apresentam transição de mesofases principalmente por mudança de temperatura e pressão. Os Cristais Líquidos Liotrópicos são formados por agregados de moléculas com anisotropia de forma que apresentam transição de mesofases principalmente pela mudança da concentração relativa de seus componentes ou pela mudança de temperatura.

A classificação das mesofases líquido cristalinas é feita segundo as simetrias que elas exibem, isto é, segundo a ordem posicional e ordem orientacional [33, 41] que elas apresentam.

Em uma mesofase líquido cristalina é possível encontrar moléculas, em solução, dispostas aleatoriamente, como em um líquido, com ordem orientacional ou posicional com um maior ou menor grau de mobilidade. Para caracterizar o grau de ordenamento de um conjunto de moléculas em relação à um eixo preferencial de alinhamento (eixo diretor, figura(2.1)) define-se um parâmetro de ordem.

Para cristais líquidos o parâmetro de ordem S é uma medida do grau de ordenamento das moléculas em relação à um eixo diretor $\hat{n}$ e é definido segundo a equação equação(2.1), onde θ representa o ângulo entre o eixo de simetria da molécula e a direção média de orientação, caracterizada pelo vetor $\hat{n}$ (figura 2.1), e $\langle \cos^2\theta \rangle$, representa uma média orientacional sobre todas as moléculas. Em um sistema perfeitamente ordenado, $\theta = 0$ ou $S=1$, e para a fase isotrópica com orientações aleatórias $S=0$.

$$S = \frac{1}{2} \left(3 \langle \cos^2\theta \rangle - 1 \right) \quad (2.1)$$

As transições de mesofases líquido cristalinas podem ser de dois tipos: de primeira ou segunda ordem. A transição de primeira ordem, figura(2.2), apresenta uma descon-

Figura 2.1: Orientação de uma molécula em forma de bastão, em relação ao diretor $\vec{n}$ [1]

tinuidade no parâmetro de ordem em uma temperatura crítica e apresenta coexistência de mesofases durante a transição. A transição de fase de segunda ordem, figura(2.3), apresenta continuidade no parâmetro de ordem com a mudança de temperatura e a mudança estrutural do sistema não é abrupta. Neste tipo de transição, não há coexistência de fases durante a transição.

Figura 2.2: Comportamento do parâmetro de ordem escalar S em uma transição de primeira ordem. T_c é a temperatura crítica de transição, figura didática adaptada.

Algumas mesofases líquido cristalinas são:

Figura 2.3: *Exemplo Representativo de uma transição de segunda ordem. O parâmetro de ordem S varia continuamente com a temperatura T até T_c , temperatura crítica de transição, figura didática adaptada.*

- Mesofase Nemática:** É a mesofase líquido cristalina mais simples, caracterizada pela ordem orientacional de longo alcance, figura(1.2(b)) e ordem posicional apenas de curto alcance. A mesofase nemática pode ser formada por moléculas alongadas como cilindros e achatadas como discos.
- Mesofase Colestérica:** Esta mesofase é formada por moléculas quirais, isto é, que não apresentam simetria por reflexão e foram identificadas pela primeira vez para moléculas derivadas do colesterol, daí seu nome. Na fase colestérica as moléculas organizam-se localmente, como em uma fase nemática, com ordem orientacional de longo alcance, porém com uma torção na direção perpendicular à direção média de orientação, formando um estrutura helicoidal, como é mostrado na figura (1.3). O eixo da hélice é chamado de eixo colestérico, e para uma torção de 2π , ao longo do eixo da hélice têm-se o passo colestérico. Essa mesofase apresenta uma estrutura periódica e como o passo colestérico tem dimensões típicas comparáveis ao comprimento de onda da luz, ocorre reflexão seletiva. A dimensão do passo colestérico é muito sensível a variação de temperatura, o que faz com que os materiais que apresentam essa mesofase sejam utilizados na fabricação de termômetros e sensores de temperatura, inclusive na região do infra-vermelho do espectro.

- **Mesofase Esmética:** Nesta mesofase as moléculas se organizam em planos, ou seja, as moléculas formam camadas empilhadas umas sobre as outras figura(2.4). A mesofase esmética possui subdivisões. As mais conhecidas são: esmético A, as moléculas são dispostas perpendiculares as camadas esméticas, figura(2.4(a)); e esmético C, as moléculas formam um ângulo θ entre as camadas, figura(2.4(b)).

Figura 2.4: Representação de duas mesofases esméticas [1]: a) Representação da mesofase esmética A, (b) Representação da mesofase esmética C

- **Mesofase colunar Hexagonal:** Na mesofase colunar hexagonal o centro de massa das moléculas apresenta um ordenamento posicional hexagonal bidimensional, conservando a mobilidade ao longo do seu eixo de simetria.

2.1.1 Microscopia de Luz Polarizada e Caracterização das Mesofases LC

A técnica de microscopia de luz polarizada consiste na observação de uma amostra colocada entre um polarizador e um analisador com seus eixos de transmissão ortogonais entre si. Essa técnica é muito poderosa porque permite observar uma imagem de textura birrefringente, se a amostra em estudo apresenta algum grau de ordenamento. Se um feixe de luz polarizada de comprimento de onda λ incide sobre uma

(a) Representação

(b) Foto

Figura 2.5: *Fase Hexagonal: corresponde a um arranjo com o centro de massa dos cilindros formando uma rede hexagonal 2D. Nesta mesofase os cilindros apresentam mobilidade na direção paralela ao seu próprio eixo. a) Representação da Mesofase hexagonal dos fragmentos de DNA; b) Foto obtida usando microscopia de luz polarizada de uma amostra na mesofase hexagonal (DNA + água)*

amostra anisotrópica com uma direção de orientação ao longo de $\hat{n}$, figura(2.6) a onda eletromagnética de amplitude E_i divide-se em duas frentes de onda, com polarizações ortogonais entre si; paralela e perpendicular ao eixo óptico do meio. Cada frente de onda propaga-se com velocidade diferente, e portanto, ao emergir da amostra há uma diferença de fase ϕ entre as duas polarizações. A defasagem óptica entre as ondas é $\sigma = \frac{2\pi}{\lambda} m \Delta n$ onde $\Delta n = n_{//} - n_{\perp}$ é a birrefringência do meio e m é um número inteiro. Assim, há uma parte da onda incidente que é transmitida pelo analisador com amplitude E_t , figura(2.6).

Uma amostra nemática com orientação uniforme ao longo da direção $\hat{n}$ apresenta transmitância máxima quando a direção de $\hat{n}$ forma um ângulo de 45° com o polarizador ou com o analisador. Quando a direção de $\hat{n}$ é paralela ao analisador ou ao polarizador a transmitância é mínima. Na prática, se a orientação não é uniforme, observam-se defeitos na forma de filamentos ou domínios de diferentes cores, ao serem observados

Figura 2.6: $E_{//}$ e $E_{\perp}$ representam a direção do campo elétrico paralela e perpendicular à direção de orientação de um meio anisotrópico, com orientação dada pelo vetor $\hat{n}$ [2]. E_i é o campo elétrico da onda incidente sobre a amostra, E_t é o campo elétrico da onda transmitida pelo analisador e ϕ é a diferença de fase entre as duas componentes após atravessar o meio anisotrópico. Para um meio isotrópico ϕ seria igual a zero e não haveria campo elétrico transmitido pelo analisador.

por transmissão.

Nas amostras preparadas entre lâmina e lamínula da mesofase colestérica, é possível observar em microscopia de luz polarizada, regiões com orientações diferentes que podem ser: homeotrópica, planar e orientações intermediárias entre homeotrópica e planar, figura(2.9). A visualização de um padrão de “linhas claras e escuras”¹, conhecido como *fingerprints*, figura(2.7), é denominada como homeotrópica, ou seja, o eixo diretor colestérico está perpendicular ao eixo de propagação da luz.

As linhas claras, do padrão de *fingerprints*, correspondem a regiões nas quais as moléculas estão alinhadas, em média, perpendiculares ao eixo de propagação da luz e as linhas escuras correspondem à regiões nas quais as moléculas estão alinhadas, em

¹entre polarizadores cruzados

Figura 2.7: (a) Representação da mesofase colestérica na região de domínio homeotrópico. (a') Textura visualizada, entre polarizadores cruzados, na região colestérica homeotrópica (fingerprints). $P/2$ é igual a metade do passo colestérico [3].

média, paralelas ao eixo de propagação da luz. A distância entre essas linhas é igual a metade do passo da hélice colestérica, ou seja, corresponde a uma rotação de 180° das moléculas, figura(2.7). O uso da técnica de microscopia de luz polarizada permite estimar o tamanho do passo colestérico.

Se o eixo diretor colestérico está paralelo ao eixo de propagação da luz, a imagem de microscopia de luz polarizada será totalmente escura. Esse domínio da mesofase colestérica é caracterizado como planar, figura(2.8).

Por último, na mesofase hexagonal é possível visualizar uma textura colorida (entre polarizadores cruzados), com linhas formando “leques”, chamada de focal cônica, figura (2.5).

Figura 2.8: (a) Representação da mesofase colestérica na região de domínio planar. (a') Textura visualizada, entre polarizadores cruzados, na região colestérica planar [3]. C é eixo diretor colestérico e eixo de propagação da luz.

Figura 2.9: Foto obtida usando microscopia de luz polarizada de uma amostra na mesofase colestérica (fragmentos de DNA + água): H é uma região de domínio homeotrópico e P é uma região de domínio planar.

2.1.2 Caracterização do DNA Utilizado

O DNA é um biopolímero formado nas extremidades, por açúcares e fosfatos que ligam-se através de ligações fofodiéster, formando um par de base. Neste tipo de ligação sobra sempre 1 elétron e para cada par de base sobram 2 elétrons, tornando o DNA um dos elementos mais carregados da natureza. Uma característica importante para esse trabalho, é que o DNA é formado por duas longas cadeias que enrolam-se originando uma estrutura helicoidal e por isso quiral.

As forças moleculares mais importantes [42] presentes neste biopolímero são: forças eletrostáticas entre os fosfatos e pontes de hidrogênio entre as duas cadeias. O DNA utilizado apresenta um comprimento de persistência² da ordem de 50nm (150 pares de base) e será estudado *in vitro*.

As principais características do DNA são mostradas na tabela(2.1).

Tabela 2.1: *Algumas características das moléculas de DNA.*

carga	2 e/pb
distância entre pares de base	3,4 ($\text{\AA}$)
diâmetro	20 ($\text{\AA}$)
comprimento de persistência	150pb $\cong$ 500 ($\text{\AA}$)
uma volta da hélice	10pb = 3,4 ($\text{\AA}$)
densidade	1,7 (g/cm^3)
massa molecular	660 ($g/molpb$)

2.1.3 Mesofases Líquido-Cristalinas de Soluções de Fragmentos de DNA

Desde o primeiro trabalho experimental apontando que fragmentos de DNA poderiam formar mesofases liquido cristalinas, uma série de trabalhos experimentais liderados principalmente por Rill e Livolant [3, 4] foram publicados com o objetivo de

²Uma característica importante de um biopolímero é o seu grau de flexibilidade, que em geral, é proporcional a razão entre o comprimento e o raio do biopolímero. Quando essa razão atinge um valor crítico, no qual a flexibilidade é mínima, é possível dizer que o biopolímero atingiu seu *comprimento de persistência*. No caso do DNA, o comprimento crítico/persistência é de 50nm, ou o equivalente a 150pb. Neste comprimento o fragmento de DNA pode ser considerado como um cilindro rígido.

entender os mecanismos responsáveis pelas transições e procurando identificar os domínios das diferentes mesofases. Nos trabalhos de Rill foram empregados fragmentos de DNA de cerca de 150 pares de bases e ele explorou o efeito da adição de sal à solução na formação e estabilização das mesofases, por meio de técnicas de microscopia de luz polarizada, ressonância magnética e difração de luz. O efeito do tamanho dos fragmentos na topologia do diagrama de fases foi explorado por Livolant, variando o comprimento dos fragmentos entre 50nm e 2000nm. A identificação das mesofases foi feita por meio de técnicas de microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios X, em amostras contendo sal de amônia em concentrações da ordem de 0,2M. Ambos observam transições de fase que ocorrem aumentando-se a concentração de fragmentos, da fase isotrópica para a fase colestérica e em seguida para a fase colunar hexagonal, com domínios de coexistência entre essas fases, que podem ser bifásicos ou trifásicos, dependendo da concentração de sal na solução ou do tamanho dos fragmentos.

Na figura (2.10) são apresentados dois diagramas de fase adaptados de [4] para soluções com diferentes concentrações de sal; 0,01M e 0,1M de Na^+ e para fragmentos de cerca de 150 pares de bases. Observa-se que a transição da fase isotrópica para a fase colestérica, pode ocorrer com domínios de coexistência de até três fases distintas. A adição de sal, diminui as interações eletrostáticas repulsivas e diminui o domínio de coexistência. Para a solução contendo 0,1M de Na^+ , a fase isotrópica é estável até cerca 130mg/ml, e a fase colestérica apresenta um domínio unifásico para concentração a partir de aproximadamente 270mg/ml³.

A interação eletrostática repulsiva entre dois cilindros carregados é minimizada para uma configuração em que os dois cilindros têm seus eixos perpendiculares entre si. Essa configuração é possível para soluções diluídas, porém à medida que aumenta a concentração a minimização da energia eletrostática será alcançada pela introdução de uma torção. Essa torção terá como consequência um aumento local da concentração

³O presente trabalho preparou amostras de fragmentos de DNA em solução verificando as mudanças de fases com aumento da concentração de DNA na temperatura de 25°C

Figura 2.10: Diagrama de transição de mesofases (temperatura vs concentração) dos fragmentos de DNA ($\sim 150\text{pb}$) em solução de (A) 0,01M de Na^+ e (B) 0,1 M de Na^+ . Isotrópica (I); Isotrópica viscosa (I'); pré-colestérica (PC); colestérica (C); Alta ordem (AO). Adaptado de [4].

que resulta em uma separação de fases. Assim, a transição da fase isotrópica para a fase colestérica ocorre com um domínio intermediário de separação de fases. Nesse domínio de coexistência de fases pode-se encontrar uma fase isotrópica viscosa, (I'), a fase pré-colestérica (PC) que segundo Rill seriam pequenas regiões com um passo colestérico bastante longo (da ordem de 10 a 50 μm) e baixa birrefringência ou ainda pequenas gotículas de fase colestérica, que posteriormente coalescem e estabilizam a fase colestérica. Ainda segundo Rill, na fase colestérica o passo colestérico, que é da ordem de 2 μm é praticamente independente da concentração de DNA exceto, na proximidade da transição para a fase colunar (figura 2.11).

Segundo Livolant, a fase isotrópica viscosa identificada por Rill, poderia ser interpretada como uma rede densa de cilindros duplamente torcidos (figura 2.12), que são conhecidos nos cristais líquidos termotrópicos como *Blue Phases*, e correspondem a estruturas tridimensionais cúbicas ou cúbicas de face centrada, ambas osticamente isotrópicas. Para fragmentos pequenos, da ordem de 50nm, a fase *blue* correspondente a estrutura amorfa, com empacotamento mais frouxo, foi observada, mas cabe lembrar

Figura 2.11: *Evolução do passo colestérico [5] com diferentes sais e concentração de sal da solução tampão de fragmentos de DNA*

que na maioria dos cristais líquidos quirais, essa mesofase não se apresenta sozinha mas sempre com a sequência das outras estruturas [3].

2.1.4 Transições de fase em soluções de cilindros rígidos

Existem na literatura alguns modelos teóricos que procuram descrever a transição de fase que ocorre em uma solução de cilindros longos à medida que a concentração de cilindros aumenta. Originalmente, esse problema foi investigado por Onsager [33], considerando cilindros rígidos longos, e apenas a repulsão estérica. Esse modelo é válido para soluções não muito concentradas, em que a fração volumétrica de cilindros

Figura 2.12: *Cilindro de dupla hélice. (a) A orientação molecular é desenhada concêntrica a superfície do cilindro. O passo entre as moléculas ocorre ao longo do raio. (b) Os cilindros de dupla hélice estão desordenados em um líquido isotrópico em uma fase tipo BP III. (c) Cúbica simples. (d) Cúbica de corpo centrado. [3].*

$\phi = (c\pi Ld^2)/4 \ll 1$, onde L é o comprimento do cilindro, d é o diâmetro e c é o número de cilindros por unidade de volume.

Segundo o modelo de Onsager, há uma transição de fase de primeira ordem, de uma fase isotrópica para uma fase anisotrópica, onde os cilindros apresentam ordem orientacional, para uma fração volumétrica crítica $\phi_i = 3,3(d/L)$. Há um regime de coexistência da fase isotrópica com a fase anisotrópica, que se torna estável para $\phi_a = 4,5(d/L)$ e o valor do parâmetro de ordem na fase nemática, logo após a transição é igual 0,84 [33]. Isso corresponde a uma transição abrupta entre uma fase completamente desordenada para uma fase altamente ordenada. Valores experimentais do parâmetro de ordem na transição são mais baixos do que o previsto pelo modelo de Onsager. Esse modelo pode ser adaptado para cilindros carregados interagindo por meio de um potencial eletrostático repulsivo, considerando-se o diâmetro efetivo que inclui o comprimento de

Debye [8].

Neste caso o diâmetro efetivo é a soma do raio do cilindro mais o comprimento de Debye,

$$\lambda^{-1} = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon k T}{2 N_A e^2 I} \right), \quad (2.2)$$

em que ε_0 é a permissividade do vácuo, ε é a constante dielétrica, k é a constante de Boltzmann, e é a carga do elétron, T é a temperatura, N_A é o número de avogrado e I é força iônica.

O modelo estatístico de Flory considera cilindros interagentes por meio de um potencial anisotrópico, de Maier-Saupe [33, 34], $V = V(\cos^2\theta)$, ou seja um potencial proporcional ao parâmetro de ordem escalar da fase nemática. Esse modelo é mais adaptado para descrever sistemas mais concentrados, e as frações volumétricas críticas que estabelecem o limite de estabilidade da fase isotrópica e da fase anisotrópica são, $\phi_i = 8(d/L)$ e $\phi_a = 12,5(d/L)$, com um salto no parâmetro de ordem igual a 0,4, que é mais próximo de valores experimentais obtidos para cristais líquidos.

Neste trabalho, utilizamos fragmentos de DNA de cerca de 150 pares de base em solução aquosa e solução contendo 0,25M de sal de acetato de amônia, de maneira que o diagrama de fase apresentado na figura (2.10) descreve de maneira satisfatória a sequência de fases observada para as soluções e as concentrações críticas que estabelecem os domínios de cada mesofase. Para esses fragmentos o comprimento é da ordem de 50nm, e o diâmetro igual a 2nm, de maneira que o fator $L/d = 25$ e para esses valores, podemos calcular as frações volumétricas críticas ϕ_i e ϕ_a esperadas segundo os modelos de Onsager e Flory. Esses resultados estão apresentados na tabela 2.2.

Comparando esses valores com os valores obtidos por Rill, figura (2.10), vemos que eles são muito inferiores. No entanto, se for feita a correção para o diâmetro efetivo do DNA, equação (2.2), para a concentração de sal de 0,1M de Na^+ , os valores críticos são; $\phi_i = 0,56$ e $\phi_a = 0,59$ e são mais compatíveis com o modelo de Flory.

Tabela 2.2: Valores esperados para as concentrações críticas para a transição isotrópica - anisotrópica, segundo os modelos de Onsager e Flory, considerando fragmentos de DNA com $L=50nm$ e $d=2nm$.

Modelo	ϕ_i	ϕ_a	$C_i(\text{mg/ml})$	$C_a(\text{mg/ml})$
Onsager	0,13	0,18	34	46
Flory	0,3	0,5	76	127

2.2 DIFUSÃO

Esta seção discutirá as propriedades de difusão de partículas esféricas e partículas cilíndricas em soluções. Supondo uma solução de moléculas isométricas ou anisométricas e considerando que forças externas, tais como efeitos gravitacionais possam ser desprezados, a composição da solução quando não há separação de fases (unifásico) deve ser macroscopicamente homogênea. Porém no nível molecular existem flutuações locais de concentração e densidade. Em uma solução diluída de partículas coloidais (dimensões micrométricas ou menores), as partículas executam um movimento aleatório contínuo, em todas as direções, conhecido como movimento Browniano. Esse movimento resulta das colisões aleatórias entre as partículas de maneira que a força média resultante sobre uma determinada partícula ou molécula em um longo intervalo de tempo comparado ao intervalo de tempo entre as colisões, será nula.

Em uma solução coloidal existem três processos de difusão distintos relacionados ao movimento de translação da partícula: auto-difusão, difusão coletiva e troca ou inter-difusão entre partículas de diferentes espécies. Para polímeros ou partículas não rígidas há ainda o processo de difusão rotacional, que em geral está acoplado ao movimento de translação. O processo de auto-difusão refere-se ao movimento Browniano do centro de massa de uma determinada partícula em um mar de outras partículas idênticas com as quais colide. O processo de difusão coletiva refere-se à relaxação isotérmica de um gradiente de densidades, como o movimento coordenado de um conjunto de partículas coloidais. O processo de inter-difusão está relacionado ao comportamento dinâmico de

duas espécies em uma solução.

A compreensão dos processos de auto-difusão de partículas esféricas rígidas é bastante útil para a compreensão dos mecanismos relevantes na difusão de objetos mais complexos, tais como macromoléculas não rígidas em meios isotrópicos ou anisotrópicos. Do ponto de vista experimental, as técnicas usuais para esses estudos são o DLS e FRAP. A técnica de DLS é a mais apropriada para processos de difusão rápidos e em soluções de partículas esféricas. As técnicas de fluorescência são particularmente úteis no estudo de difusão de partículas não esféricas. Neste trabalho estamos interessados em investigar o processo de auto difusão de moléculas de DNA em soluções aquosas, em regime diluído e em regime concentrado, nos quais as partículas se auto-organizam em uma fase colestérica, com ordem orientacional em uma estrutura helicoidal. No caso de partículas esféricas, em meio isotrópico o processo de auto-difusão será discutido por meio de duas abordagens. Em primeiro lugar uma abordagem macroscópica, que leva a formulação das duas lei de Fick. Em segundo, uma abordagem microscópica, descrevendo o movimento browniano com uma estatística de passeio aleatório.

Apresentaremos a seguir uma descrição de alguns modelos existentes na literatura para descrever o processo de difusão de partículas cilíndricas e alguns resultados experimentais existentes.

2.2.1 Leis de Fick

De acordo com a segunda lei da Termodinâmica, na ausência de forças externas para uma solução coloidal em equilíbrio a entropia é máxima quando as partículas estão distribuídas em todo o espaço disponível, de maneira aleatória. Consideremos a situação representada na figura(2.13), em que duas soluções de concentrações diferentes c_1 e c_2 estão separadas por um parede hipotética de espessura Δx . Se a espessura dessa parede tende a zero; $\Delta x \rightarrow 0$, haverá a migração de soluto da região mais concentrada para a região menos concentrada, até que o equilíbrio seja restabelecido. Esse transporte

de massa é chamado de difusão. Seja ΔC a quantidade de matéria que flui através da área de seção transversal A , o fluxo de matéria é dado segundo a primeira lei de Fick [6], por;

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}. \quad (2.3)$$

$$\mathbf{J} = -D \nabla C \quad (2.4)$$

Essa equação é conhecida como primeira lei de Fick e relaciona o fluxo de matéria com o gradiente de concentração, onde a constante de proporcionalidade D é o coeficiente de difusão.

Se a quantidade de material que flui através da parede é ΔQ , em um intervalo de tempo Δt , então:

$$\Delta Q = AJ\Delta t \quad (2.5)$$

em que ΔQ é o balanço entre a matéria que entra na região de espessura Δx e a que sai, portanto deve ser proporcional ao volume onde ocorre o fluxo;

$$\Delta Q = A\Delta x\Delta C \quad (2.6)$$

Combinando as equações 2.3, 2.5 e 2.6 tem-se:

$$-D \frac{\Delta C}{\Delta x} = \Delta x \frac{\Delta C}{\Delta t}. \quad (2.7)$$

Essa equação pode ser rescrita como:

$$-D \frac{\left[\left(\frac{\Delta C}{\Delta x} \right)_{x=0} - \left(\frac{\Delta C}{\Delta x} \right)_{x=\Delta x} \right]}{\Delta x} = \frac{\Delta C}{\Delta t}. \quad (2.8)$$

Tomando-se o limite para $\Delta x \rightarrow 0$ e $\Delta t \rightarrow 0$, e que a área da seção transversal não

muda ao longo de Δx , figura (2.13), tem-se a segunda lei de Fick, equação(2.9).

Figura 2.13: Esquema do processo difussivo através de um elemento de volume de espessura Δx [6]. Em que x é a posição, C a concentração e D uma constante de proporcionalidade. J é o fluxo de material que passa num ponto x

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}. \quad (2.9)$$

A equação(2.9) é uma equação diferencial que descreve a concentração de soluto em uma dada posição em função do tempo, e cuja solução depende das condições de contorno, assim como do parâmetro D . Essa equação é a base para a determinação experimental do coeficiente de difusão e a solução deve obedecer às condições de contorno particulares de cada arranjo experimental.

A técnica de FRAP, por exemplo, permite a determinação de um parâmetro proporcional à concentração, em função do tempo para uma determinada solução. Os dados experimentais podem ser ajustados à curva de concentração e desse ajuste extraí-se o coeficiente de difusão.

A resolução da equação(2.9) é feita com uso da transformada de Fourier, Apêndice (A) e resulta na equação(2.10).

$$C(x, t) = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (2.10)$$

Já a solução da equação(2.9) para duas dimensões, com $x^2 + y^2 = r^2$, é dada pela

equação(2.11) que tem perfil Gaussiano, cuja largura á meia altura é $w^2 = 8\ln(4)Dt$.

$$C(r, t) = \frac{C_0}{4\pi Dt} e^{\frac{-r^2}{4Dt}} \quad (2.11)$$

2.2.2 Difusão de Partículas Isométricas em Solução Diluída

Movimento Browniano

A difusão [41], segundo Einstein, é o resultado do movimento térmico aleatório de moléculas causado pelas flutuações da pressão no líquido. A difusão é vista como um zig-zag de partículas micrométricas que descrevem um caminho em direções aleatórias devido a colisão com outras partículas. Em um meio isotrópico, após cada colisão, a direção de movimento da partícula não está correlacionado com a direção anterior nem com a direção de movimento após a colisão seguinte [43]. Considerando apenas uma direção, em um passeio aleatório, a probabilidade de ir para frente ou para trás é a mesma. Portanto, o deslocamento médio em uma direção é nulo, porém o deslocamento médio quadrático não. É possível mostrar que o deslocamento médio quadrático da partícula na solução é proporcional ao número de passos e ao tempo, equação (2.12) [43].

$$\langle R^2(t) \rangle = \alpha t \quad (2.12)$$

em que $\alpha = 6D$ é uma constante relacionada ao coeficiente de difusão, D .

O fato das forças que interagem com a partícula serem as mesmas em qualquer direção, permite que o deslocamento quadrático médio apresente comportamento igual em todas as três dimensões. Assume-se neste caso que forças externas não podem ser relacionadas ao movimento aleatório, porque uma força externa pode levar a um processo de sedimentação, por exemplo, que compete com a difusão. As forças durante a colisão são forças internas, isto é $\langle F_{int} \rangle = 0$. Assim, em um meio isotrópico, tem-se que $\langle x^2 \rangle = \langle y^2 \rangle = \langle z^2 \rangle$, conseqüentemente $\langle R^2 \rangle = 3 \langle x^2 \rangle$. A partir dos enunciados anteriores, é possível escrever a seguinte equação para o movimento Browniano em uma dimensão

de uma molécula esférica em solução diluída, de acordo com a equação(2.13) [43].

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -f \frac{dx}{dt} \quad (2.13)$$

em que m é a massa da partícula, f é coeficiente de arraste que depende da geometria (forma) da partícula e $f \frac{dx}{dt}$ é a força dissipativa, proporcional a velocidade da partícula.

Por meio da multiplicação da equação(2.13) por x é possível obter a equação(2.14).

$$mx \frac{d^2 x}{dt^2} = -f x \frac{dx}{dt} \quad (2.14)$$

Para simplificar a equação(2.14) pode-se usar o fato que:

$$\frac{d}{dt} \left[x \frac{dx}{dt} \right] = x \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) + \left(\frac{dx}{dt} \right)^2, \quad (2.15)$$

e a equação diferencial 2.14 pode então ser rescrita como:

$$\frac{m}{2} \frac{d^2}{dt^2} [x^2] - m \left(\frac{dx}{dt} \right)^2 = -\frac{f}{2} \frac{d}{dt} [x^2] \quad (2.16)$$

Tomando a média temporal na equação anterior, tem-se que

$$\frac{m}{2} \frac{d^2}{dt^2} \langle x^2 \rangle - m \langle v_x^2 \rangle = -\frac{f}{2} \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle \quad (2.17)$$

Fazendo $\frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \langle v_x^2 \rangle$ e usando o teorema de equipartição de energia obtem-se $\frac{1}{2} m \langle v_x^2 \rangle = \frac{1}{2} kT$, em que k é a constante de Boltzmann, e T é a temperatura.

A resolução da equação diferencial (2.17) fornece $\langle x^2 \rangle$,

$$\frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{2kT}{f} t \quad (2.18)$$

Extrapolando para o movimento Browniano em 3 dimensões em um meio isotrópico

o deslocamento quadrático médio $R^2(t) = 3 \langle x^2 \rangle$ será dado por:

$$\langle R^2 \rangle = \frac{6kT}{f} t \quad (2.19)$$

Comparando-se essa equação com a equação(2.12) pode-se identificar o coeficiente de difusão D ;

$$D = \frac{kT}{f} \quad (2.20)$$

que é conhecida como relação de Einstein. Para partículas esféricas o coeficiente de arraste é $f = 6\pi\eta R_0$, em que η é a viscosidade do meio e R_h é o raio hidrodinâmico da partícula. Nesse caso, obtém-se uma expressão para o coeficiente de difusão que é conhecida como equação de Stokes-Einstein;

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}. \quad (2.21)$$

2.2.3 Difusão de Partículas Anisométricas

Meios Isotrópicos - Soluções Diluídas

Soluções de cilindros rígidos constituem um modelo para compreensão de processos de difusão de biopolímeros, proteínas ou vírus, que exibem conformação que pode ser aproximada por cilindros. Em soluções diluídas os cilindros estão orientados aleatoriamente, porém acima de certa concentração crítica ocorre uma transição para uma fase anisotrópica com ordem orientacional de longo alcance. Para cilindros com comprimento (L) muito maior que o seu diâmetro (d) o modelo de Onsager prevê que a fração volumétrica para qual ocorre a transição é aproximadamente 13% [33]. Esse valor diminui para soluções de cilindros polidispersos ou quando o fator de forma $p = L/d$ é finito.

Modelos estatísticos e simulações com dinâmica molecular têm sido propostos para o estudo de propriedades dinâmicas dos cilindros em solução. Costuma-se distinguir três

regimes de concentração, diluído, semi-diluído e concentrado, cujos domínios em fração volumétrica são listados na tabela (2.3), na terceira coluna são apresentados os valores limites para os diferentes regimes, considerando uma solução de DNA com fragmentos de 150pb; com $p = L/d = 25$ [17]. A comparação entre as tabelas 2.2 e 2.3 permite relacionar as mudanças encontradas nas mesofases líquidos cristalinas de fragmentos de DNA com os regimes diluídos, semi-diluídos e concentrados.

Tabela 2.3: *Regime de concentração para soluções de cilindros rígidos com $p = L/d = 25$ [17].*

Regime	Concentração	ϕ
diluído	$\phi < (d/L)^2$	$\phi < 0,016$
semi-diluído	$(d/L)^2 < \phi < (d/L)$	$0,016 < \phi < 0,04$
concentrado	$\phi > (d/L)$	$\phi > 0,04$

Para o regime diluído, um cilindro executa movimento Browniano sem interagir com seus vizinhos, sofrendo apenas a ação da força dissipativa de arraste no meio. Existem dois coeficientes de difusão, paralelo e perpendicular ao eixo de simetria do cilindro, que serão chamados de $D_{0//}$ e $D_{0\perp}$, respectivamente. O coeficiente de difusão médio nesse regime é uma média orientacional entre $D_{0//}$ e $D_{0\perp}$, segundo a equação (2.22) [35].

$$D_0 = \frac{1}{3}D_{0//} + \frac{2}{3}D_{0\perp} \quad (2.22)$$

No regime diluído, as partículas não interagem e o coeficiente de difusão independe da concentração. Uma expressão para D_0 é proposta por Tirado e colaboradores [35, 44, 45], equação(2.23).

$$D_0 = \frac{kT}{4\pi\eta L} \left[\ln \left(\frac{L}{d} \right) + 0.312 + 0.564 \left(\frac{d}{L} \right) - 0.100 \left(\frac{d}{L} \right)^2 \right] \quad (2.23)$$

Em que k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade do meio.

Resultados experimentais obtidos por Nicolai e Mandel [22] para o coeficiente de difusão de fragmentos de DNA, utilizando espalhamento dinâmico de luz confirmaram

as previsões do modelo de Tirado [35]. O valor previsto pelo modelo $D = 26\mu m^2/s$ está muito próximo do valor experimental $D = 30(6)\mu m^2/s$.

À medida que a concentração de partículas aumenta, as partículas passam a interagir e o coeficiente de difusão passa a ser dependente da concentração. Alguns modelos consideram que as partículas não se movem na direção perpendicular ao seu eixo e que a difusão paralela ao eixo do cilindro permanece igual a $D_{0//}$, o que é razoável no regime semi-diluído, e alguns autores chegam a propor uma expressão para $D_{0\perp}(\phi)$ no regime diluído e semi-diluído [46] sempre assumindo que $D_{//} \cong D_{0//}$. De modo geral são feitas expansões das expressões obtidas e as previsões indicam que $\frac{D_{0\perp}(\phi)}{D_{0\perp}}$ apresenta uma dependência linear com a fração volumétrica [47].

Seguindo uma abordagem diferente, Odijk [48] considerou o deslocamento de um cilindro teste em um meio efetivo constituído de outros cilindros que se movem mais lentamente que o cilindro teste. Assim, o processo de difusão lento seria dominado pelas interações hidrodinâmicas do cilindro teste no meio efetivo. Essa abordagem permite o cálculo do fator de arraste do cilindro f , que combinado com a equação de Stokes-Einstein (2.21) permite a determinação do coeficiente de difusão. No entanto a aplicação desse modelo, para cilindros com fator de forma pequeno, está restrito a baixas concentrações.

Existem também alguns trabalhos na literatura com simulações de soluções de cilindros rígidos executando movimento Browniano. Uma expressão analítica é proposta por Lowen [17] com aproximação até primeira ordem em ϕ , segundo a equação (2.24).

$$\frac{D}{D_0} = 1 - \left[a_1 + a_2 \left(\frac{L}{d} - 1 \right) + a_3 \left(\frac{L}{d} - 1 \right)^2 + a_4 \left(\frac{L}{d} - 1 \right)^3 \right] \phi \quad (2.24)$$

Em que $a_1 = 1,94$, $a_2 = 0,310$, $a_3 = -0,0569$ e $a_4 = 0,0151$. Para cilindros carregados essa expressão pode ser corrigida tomando-se o diâmetro efetivo dos cilindros.

Do ponto de vista experimental existem na literatura medidas do coeficiente de difusão em soluções de partículas rígidas de argila [8] e em soluções de fragmentos de

Figura 2.14: Resultados do coeficiente de Difusão de fragmentos de 150pb de DNA solubilizados em diferentes concentrações e em diferentes concentrações de NaCl, obtidos por meio do uso da técnicas de Espalhamento Rayleigh (FRS) e Espalhamento quase elástico de luz (QELS) [7].

DNA no regime semi-diluído [7, 11].

A figura (2.14) [7], mostra o comportamento do coeficiente de difusão de fragmentos de DNA em soluções aquosas em íons de NaCl. Para baixas concentrações de sal, observa-se em regime em que o coeficiente de difusão permanece constante com o aumento de concentração, e a partir de certa concentração começa a diminuir. Essa dependência do coeficiente de difusão com a concentração de DNA é mais evidente para a solução com maior concentração de sal, com um coeficiente angular aproximadamente igual a -0,5.

Os resultados obtidos para a solução de partículas de argila com fator de forma $p=5,4$ são mostrados na figura (2.15), em função do parâmetro $(L/d)^2\phi$, que é proporcional ao número de cilindros em um volume L^3 . O modelo de Odijk, (linha pontilhada da figura (2.15)) é mais apropriado para descrever o comportamento dinâmico de cilindros longos e em um pequeno domínio de concentrações.

Figura 2.15: Coeficiente de difusão de cilindros de argila em solução, [8]. Os pontos experimentais (■) são ajustados segundo as simulações de Löwen (o) para cilindros com $L/D=4$. Os pontos (Δ) correspondem a simulações com para $L/D=6$. A linha pontilhada representa o modelo de Odijk, que é aplicável em um pequeno intervalo de concentrações.

Meios Anisotrópicos - Soluções Concentradas

Os pesquisadores Chu e Moroi [9] propuseram em 1975 um modelo de difusão de moléculas anisométricas em meio anisotrópico, descrevendo a difusão de cristais líquidos na fase nemática. Para tanto, os autores consideraram dois coeficientes de difusão paralelo e perpendicular ao eixo de orientação das moléculas, $D_{//}$ e $D_{\perp}$. Partindo da função de autocorrelação do momento linear de moléculas cilíndricas os autores consideraram um potencial de interação de par entre as partículas, dominado pela interação repulsiva e pela força de dispersão. Os autores obtiveram uma expressão analítica para a anisotropia de difusão que pode ser expressa em termos do parâmetro de ordem escalar, S :

$$\frac{D_{//}}{D_{\perp}} = \frac{1 - 2S(\gamma - 1) + 2\gamma}{1 + S(\gamma - 1) + 2\gamma}. \quad (2.25)$$

em que $\gamma \cong \frac{\pi d}{4L}$. O comportamento esperado para a anisotropia de difusão está ilustrado na Figura(2.16), considerando cilindros com $L/d = 25$, que é o fator de forma

para fragmentos de DNA de 150pb.

De acordo com o modelo de Flory para cilindros rígidos em solução interagindo por meio de um potencial anisotrópico [33, 34], na transição da fase isotrópica para a fase nemática o salto no parâmetro de ordem é aproximadamente 0,4. Para esse valor de S , a expressão acima fornece a anisotropia de difusão na transição $\frac{D_{//}}{D_{\perp}} = 2, 5$.

Uma outra abordagem que tem sido utilizada recentemente é a simulação de dinâmica Browniana de cilindros rígidos em um solvente [10], considerando cilindros não interagentes e também desprezando as interações hidrodinâmicas. Na simulação, parte-se de uma configuração sem superposição dos cilindros, o deslocamento de um cilindro têm componentes paralela e perpendicular ao diretor local, e considera-se que o deslocamento quadrático médio é descrito por uma função gaussiana, com valor médio zero, e que a variância, é proporcional ao coeficiente de difusão $D_{//}$ e $D_{\perp}$, nas direções paralela e perpendicular, respectivamente. Löwen e colaboradores realizaram essas simulações para concentrações de cilindros no domínio da fase nemática e esmética e o resultado está ilustrado na Figura(2.17). Observa-se que na fase nemática há um aumento monotônico da razão $\frac{D_{//}}{D_{\perp}}$ com o aumento do parâmetro de ordem escalar S e que essa razão é independente do fator de forma. A linha sólida representa um limite superior, considerando-se que os cilindros só podem se mover na direção paralela ao seu eixo, e obedece à a expressão 2.25.

Existem na literatura alguns trabalhos experimentais sobre difusão de partículas coloidais alongadas na fase nemática [8, 37, 40]. Em uma extensão de um trabalho anterior, M. P. van Bruggen e colaboradores prepararam uma solução estável de partículas coloidais de argila com $L/d=19$, e usando a técnica de FRAP conseguiram determinar o coeficiente de difusão dessas partículas nas fases isotrópica e nemática. Na fase isotrópica, os pesquisadores identificaram dois regimes, um primeiro em que o coeficiente de difusão decresce linearmente com o aumento de concentração de partículas, concordando qualitativamente com a equação 2.24, prevista por Löwen. Há ainda um

Figura 2.16: Curva da previsão teórica da razão dos coeficientes de Difusão, $\frac{D_{//}}{D_{\perp}}$ para cilindros com fator de forma $p = 25$ [9] em função do parâmetro de ordem, S .

Figura 2.17: Razão dos coeficientes de difusão de longo alcance, $\frac{D_{//}}{D_{\perp}}$ plotados como função do parâmetro de ordem nemático S . A linha sólida é o limite superior. Resultados na fase esméctica A são dados por triângulos [10].

Figura 2.18: *Comportamento do coeficiente de difusão de partículas coloidais cilíndricas com fator de forma $L/d=19$, na fase isotrópica (■) e na fase nemática em coexistência, na direção paralela aos cilindros (●) e perpendicular aos cilindros (◆). A linha pontilhada representa o comportamento do coeficiente de difusão na fase isotrópica extrapolado para todo domínio de concentração [11].*

segundo regime, mais próximo da transição para a fase nemática, onde a dependência é não linear. No domínio de coexistência de fases isotrópica e nemática, há uma drástica redução do coeficiente de difusão de um fator de aproximadamente 10, com coeficiente de difusão da fase isotrópica atingindo um valor limite da ordem $0,02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (figura 2.18). Na fase nemática, coexistindo com a fase isotrópica, novamente há uma redução de um fator 10 no valor do coeficiente em relação à fase isotrópica. Extrapolando o comportamento do coeficiente de difusão na fase isotrópica para a região de coexistência de fases (linha tracejada na figura 2.18), o valor limite do coeficiente de difusão seria de $3 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$, que concorda com os valores experimentais obtidos. A anisotropia $\frac{D_{//}}{D_{\perp}}$ de difusão é de aproximadamente 2.

Em soluções de vírus f_d o domínio nemático é mais explorado até a proximidade da transição para a fase esmética [40]. Na transição da fase isotrópica para a fase nemática, os autores observam um aumento brusco no coeficiente de difusão paralelo ($D_{//}$)

enquanto o coeficiente de difusão perpendicular aos cilindros ($D_{\perp}$) decresce monotonicamente (figura 2.19), o que concorda com previsões de simulações feitas por Löwen [10]. Esse comportamento não foi observado para a solução de partículas de argila [8]. Outra diferença entre os dois sistemas é o valor da anisotropia nos coeficientes de difusão, que é da ordem de 7,5 para a solução de vírus fd logo após a transição para a fase nemática. Na figura 2.19, os resultados experimentais são comparados com previsões teóricas, para duas abordagens diferentes, representando o comportamento do coeficiente de difusão em função do parâmetro de ordem da fase nemática.

Figura 2.19: *Evolução do coeficiente de difusão em uma solução de vírus fd , com fator de forma $\frac{L}{d} \cong 130$, na fase isotrópica e nemática. (a) $D_{\parallel}$ (■) e $D_{\perp}$ (▲); (b) Comparação da anisotropia de difusão com simulações [12].*

Recentemente, o desenvolvimento da técnica de espectroscopia de correlação de fótons de raios X (XPCS) permitiu a investigação do comportamento dinâmico de partículas alongadas de goetita ($\alpha - \text{FeOOH}$) em solução, na fase nemática [37]. Essa técnica permite obter informações sobre o coeficiente de difusão das partículas em uma escala de distância comparável a distância de separação intermolecular. Os resultados obtidos por esses pesquisadores mostram basicamente dois regimes de difusão, para pequenas distâncias, um coeficiente de difusão da ordem de $3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, que é reduzido a 1/3 desse valor para o segundo regime, para distâncias da ordem da distância interpartícula. Esse comportamento também foi observado para partículas esféricas, porém com menor

amplitude.

2.3 TÉCNICA DE FRAP

Com mais de 30 anos de existência a técnica de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) é uma técnica muito utilizada em uma série de áreas, destacando-se em pesquisas farmacêuticas em sistemas com células vivas e em sistemas biológicos e coloidais. Na maioria das vezes, o objetivo é medir propriedades dinâmicas como a difusão de moléculas em solução ou meio vivo.

Existem inúmeras formas de utilização da técnica de FRAP, mas todas elas caracterizam-se pela análise da recuperação da fluorescência de uma certa região da amostra que foi previa e fortemente irradiada com luz no comprimento de excitação de fluorescência. Sendo assim, a técnica é empregada em amostras que, quando excitadas por um feixe de luz laser, fluorescem. Este tipo de amostra é irradiada em uma pequena região por um pulso de luz laser muito intenso que provoca a perda irreversível da fluorescência nessa região. Esse processo de irradiação, por meio de um pulso de luz é conhecido como *photobleaching* ou ainda como *bleach*. Após o *bleach* a evolução da recuperação de fluorescência é acompanhada com a finalidade de estimar o coeficiente de difusão das moléculas.

Uma sequência de passos necessários para realização de FRAP é descrita nos itens seguintes:

1. Antes do *photobleaching/bleach*: é realizada a observação da fluorescência das partículas da amostra, através da excitação das moléculas fluorescentes com um feixe de luz laser, no comprimento de excitação.
2. Durante o *photobleaching/bleach*: Uma determinada região da amostra fluorescente recebe a radiação de um pulso de luz muito intenso —intenso o suficiente para “destruir” somente a fluorescência nesta região. A partir desse momento,

existe uma região da amostra que é fluorescente e uma outra região, irradiada, que perdeu a fluorescência.

3. Após o *photobleaching/bleach*: deste momento em diante, será analisada a recuperação da fluorescência da região irradiada (que sofreu o *bleach* e ficou “escura”), enquanto as moléculas fluorescentes (que estão ao redor da região “queimada”) são excitadas com o feixe de luz laser, no comprimento de excitação. Na região de *bleach* houve uma diminuição da população de espécies fluorescentes, porém devido a difusão, a concentração de espécies fluorescentes nessa região irá se equilibrar, até que a concentração dessas espécies seja uniforme. Isso é visível com a recuperação da fluorescência na região de *bleach*, figura(2.20).

Figura 2.20: *Após o photobleaching: Imagens retiradas por meio do uso de microscopia fluorescente, de amostras de fragmentos de 150pb de DNA, 200(mg/ml), marcados com YOYO*

Em um artigo de 1999 Meyvis e colaboradores [49] mostram com detalhes algumas aplicações da técnica de FRAP realizando uma revisão do uso da técnica, tanto do ponto de vista teórico como experimental. Neste trabalho os autores discutem quatro procedimentos usuais para realizar o emprego de FRAP [15, 49]:

1. A recuperação da fluorescência é resultado da difusão em duas dimensões;
2. O feixe de luz que provoca o photobleaching deve ter um perfil gaussiano;
3. O *photobleaching* é um processo irreversível;
4. A duração do pulso de luz que irradia a prova fluorescente deve ser muito pequena, cerca de 1/15 do tempo de recuperação da fluorescência (tempo característico de difusão).

Para obter o coeficiente de difusão das espécies fluorescentes faz-se uma análise das imagens na região da mancha de bleach. Passando uma reta pelo centro da mancha, obtém-se o perfil de intensidade de luz, que para um feixe gaussiano com simetria circular, deve ter um perfil gaussiano.

O tempo característico de difusão é dado segundo a equação(2.26) [49]:

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{8\ln(4)D} \quad (2.26)$$

em que D é o coeficiente de difusão e ω é a largura à meia altura da Gaussiana.

2.3.1 Moléculas Fluorescentes

Para o estudo de difusão dos fragmentos de DNA em solução é utilizada uma molécula fluorescente YOYO, que se intercala entre as bases nitrogenadas por meio de ligações covalentes. Essa prova é usada na proporção de uma molécula de YOYO para cada 4000pb. A grande vantagem no uso desse marcador está no fato de que a molécula

sozinha em solução não é fluorescente, porém quando ligada covalentemente apresenta forte fluorescência.

Basicamente, a molécula de YOYO é um dímero de moléculas YO, figura(2.21) que apresenta um espectro de excitação e emissão conforme a figura(2.22). É uma molécula planar [13] e quando ligado ao DNA, o seu eixo longitudinal orienta-se paralelamente ao eixo do par de base do fragmento de DNA⁴ [50]. Uma característica importante é que a molécula de YOYO possui anisotropia de fluorescência, neste caso essa anisotropia é dependente de como está orientado o DNA em relação ao feixe de luz laser que excita a amostra.

O processo de *photobleaching* consiste então em “matar” foto-quimicamente a fluorescência em uma região desta amostra de DNA marcado com YOYO. Esse processo acontece porque ao absorver fótons, os elétrons dos átomos das moléculas de YOYO excitam e no instante seguinte (menor que $10\mu s$) decaem a um nível energético menor emitindo outro fóton aumentando a probabilidade de formar novas espécies não fluorescentes.

Figura 2.21: Estrutura química das moléculas de YO e YOYO [13].

⁴Essa orientação é obtida também pela molécula de YOYO [50]

Figura 2.22: Absorção(-), excitação fluorescente (...) e emissão (- -) de YO em glicerol. O espectro de emissão excita no comprimento de onda de 488nm e o espectro de excitação emite no comprimento de onda de 550nm [13].

2.3.2 Recuperação de Fluorescência

Existem diferentes maneiras de observar a recuperação da fluorescência após o photobleaching. A observação pode ou não depender do arranjo experimental em uso. Uma das mais conhecidas, é realizada por meio de um feixe de luz laser dividido em dois. Neste arranjo, enquanto um dos feixes dividido é utilizado para excitar a amostra e irradiá-la (formar o *bleach*), o outro feixe dividido é usado como referência. Uma outra maneira, também muito conhecida, de utilização da técnica de FRAP, é através do uso de microscopia convencional ou confocal. Neste outro emprego de FRAP, existem duas desvantagens principais [51]: o tempo de recuperação da fluorescência pode levar horas e a geometria do *photobleaching* deve ser bem conhecida.

Difusão isotrópica

No presente trabalho, optou-se pela utilização de FRAP através de microscopia e por isso o conhecimento da geometria do *photobleaching* é fundamental. Essa escolha foi

adotada porque as condições instrumentais já eram disponíveis e porque proporcionou a utilização de um método de análise já desenvolvido, por Seiffert e Oppermann em 2008 [15, 16].

A metodologia de Seiffert e Oppermann é baseada na difusão isotrópica de moléculas fluorescentes em um meio também isotrópico. Na abordagem dos dois pesquisadores, a análise dos resultados obtidos com uso de FRAP, baseia-se no ajuste das intensidades I das imagens do perfil da mancha de *photobleaching*, segundo a equação (2.27), obtida da solução da segunda lei de Fick (equação (2.10)), com condições de contorno configuradas experimentalmente [15].

$$I(r, t) = I_0 - \frac{M}{(4\pi Dt)^{d/2}} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} \quad (2.27)$$

em que M é o total de espécies difusivas por unidade de área e d é a dimensão.

Experimentalmente tem-se acesso ao perfil de intensidade de luz na região de *bleach* para diferentes instantes. Para cada instante ajusta-se a função de intensidade $I(r)$ de acordo com a equação (2.27), que corresponde a uma gaussiana. Construindo-se um gráfico da variância em função de t , obtem-se uma reta, figura (2.23), cujo coeficiente angular é proporcional a difusão, D , e M é ajustável.

Difusão Anisotrópica

Nesta seção apresentaremos um método de análise das imagens desenvolvido por Dobrindt e colaboradores [52] para análise de experimentos de FRAP em um meio anisotrópico. Em particular, neste trabalho esse método será aplicado para o estudo do processo de difusão dos fragmentos de DNA na fase colestérica, em domínios planares. Na fase colestérica, os fragmentos de DNA encontram-se localmente organizados como em um nemático no plano x - y , porém a direção de orientação sofre uma torção na direção z . Nesses experimentos os domínios planares correspondem a regiões onde o eixo da hélice está paralelo a direção de polarização da luz e observa-se uma textura

Figura 2.23: (a) *Evolução da intensidade de luz na região da mancha de photobleaching. Para cada instante t_i o perfil é ajustado à uma gaussiana.* (b) *O coeficiente de difusão D é obtido a partir da evolução das variâncias das gaussianas no tempo. O coeficiente angular da reta é $4D$.*

completamente escura, e sem mudança na intensidade de luz transmitida quando a amostra é girada entre polarizadores cruzados.

Em um meio anisotrópico como, por exemplo, em uma fase nemática, a mancha de *bleach* não evolui com simetria circular. Nesse caso, o coeficiente de difusão não é mais uma grandeza escalar, mas pode ser expressa com um tensor. Consideremos primeiramente uma região da amostra, em um ponto z , arbitrário, onde e a direção local de alinhamento dos cilindros está na direção x . Vamos analisar a difusão no plano x - y , com a luz atravessando o meio na direção z , figura(2.24). Para um sistema de coordenadas apropriado, em que o tensor é diagonal, a equação de Fick passa a ser escrita como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \left(D_1 \frac{\partial^2}{\partial x^2} + D_2 \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) C, \quad (2.28)$$

em que D_1 e D_2 são os coeficientes de difusão paralelo e perpendicular a direção de orientação dos cilindros. É razoável supor que a difusão nas direções paralela e perpendicular a direção de alinhamento dos cilindros são independentes e nesse caso a solução

da equação diferencial pode ser escrita como o produto de duas soluções unidimensionais;

$$C(x, t) = C_1(x, t) \cdot C_2(y, t) \quad (2.29)$$

Para cada uma das direções a solução da equação diferencial é análoga a equação (2.27). Assumindo um perfil de concentração fortemente localizado, inicialmente ao longo do eixo de simetria, a concentração de cromóforos pode ser escrita como:

$$C(x, y, z, t) = \frac{c_0(z)}{4\pi\sqrt{D_1 D_2}t} \exp\left[\frac{-(x)^2}{4D_1 t}\right] \exp\left[\frac{-(y)^2}{4D_2 t}\right] \quad (2.30)$$

No sistema de referência local, é mais conveniente trabalhar com coordenadas polares, (r, φ) , assumindo $\varphi = 0$ correspondente a direção do alinhamento local;

$$C(r, \varphi, z, t) = \frac{c_0(z)}{4\pi\sqrt{D_1 D_2}t} \exp\left[\frac{-(r\cos\varphi)^2}{4D_1 t}\right] \exp\left[\frac{-(r\sin\varphi)^2}{4D_2 t}\right] \quad (2.31)$$

Passando para o sistema de referência do laboratório, as coordenadas polares serão dadas por (r, θ) , e para levar em conta a torção do alinhamento na direção z , $\theta = \varphi + 2\pi zp^{-1}$, em que p é o passo da hélice colestérica. A intensidade de fluorescência $F_0(r, t)$ nessa região é proporcional à concentração de cromóforos, integrada ao longo da espessura da amostra; desde $-d/2$ até $d/2$;

$$F_0 = \int_{-\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} \frac{c_0(z)}{4\pi\sqrt{D_1 D_2}t} \exp\left[\frac{-(r\cos(\theta - 2\pi zp^{-1}))^2}{4D_1 t}\right] \exp\left[\frac{-(r\sin(\theta - 2\pi zp^{-1}))^2}{4D_2 t}\right] dz \quad (2.32)$$

A equação (2.32) pode ser simplificada assumindo que a variação da concentração de cromóforos ao longo do eixo z , $c_0(z)$ ocorre em uma escala muito maior do que a dimensão do passo colestérico e portanto pode ser considerada constante em cada camada correspondente a um passo. Assim, a integral no termo em $c_0(z)$ pode ser convertida em uma somatória discreta para o número de passos colestéricos presentes

na amostra;

$$F_0 = \sum_{n=-N}^N \int_{-\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} \frac{c_0(z)}{4\pi\sqrt{D_1 D_2}t} \exp\left[\frac{-(r\cos(\theta - 2\pi zp^{-1}))^2}{4D_1 t}\right] \exp\left[\frac{-(r\sin(\theta - 2\pi zp^{-1}))^2}{4D_2 t}\right] dz \quad (2.33)$$

em que onde d_n é média em z , sobre a n -ésima camada de espessura p , ao longo do volume que sofreu o *bleach*, e o número de termos na soma é $2N+1$, e é dado pela razão d/p . Assim, a somatória sobre todas as camadas pode ser reduzida a um fator $F_0(t)$:

$$F_0(t) = \sum_{n=-N}^N c_0(d_n) \frac{p}{4\pi\sqrt{D_1 D_2}t} \quad (2.34)$$

que passa a ser um fator de normalização.

Para fins de ajuste aos dados experimentais, a expressão (2.33) pode ser reescrita como:

$$F_0 = F_0(t) \exp\left[\frac{-r^2}{4} \left(\frac{1}{D_1 t} + \frac{1}{D_2 t}\right)\right] I_0\left[\frac{r^2}{4} \left(\frac{1}{D_1 t} - \frac{1}{D_2 t}\right)\right] \quad (2.35)$$

onde I_0 é a função de Bessel modificada do primeiro tipo e de ordem 0.

Como foi feita uma média sobre as orientações que mudam ao longo do eixo coles-térico, a intensidade de fluorescência, na equação (2.35), passa a não ser depender mais da coordenada azimutal no plano. No entanto, a coordenada r carrega a informação relativa a anisotropia no coeficiente de difusão que resulta em uma forma não gaussiana na função $F(r,t)$. Essa equação será usada para ajustar curvas experimentais que descrevem o perfil de intensidade de luz ao longo da mancha de *bleach*, tendo como parâmetros ajustáveis os valores de D_1 e D_2 , e o fator de normalização.

Em cada camada com orientação local ao longo de uma direção x , arbitrária, a mancha de *photobleaching* corresponderia a uma elipse, porém a média ao longo do eixo resulta em uma superposição dessas elipses e uma mancha que embora tenha simetria circular, não apresenta perfil gaussiano, figura (2.24).

Figura 2.24: Esquema do emprego da técnica de FRAP em uma mesofase colestérica no domínio planar. A esquerda o modelo espacial da integração das elipses formadas após o photobleaching em cada uma das “camadas” nemáticas locais, neste caso o ajuste realizado é a Bessel modificada de ordem zero I_0 .

Capítulo 3

METODOLOGIA

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas no presente trabalho, são soluções aquosas de fragmentos de DNA de cerca de 150pb ($\sim 50\text{nm}$, comprimento de persistência), marcados com uma prova fluorescente na proporção de uma molécula de YOYO para cada 4000pb.

O DNA (*Deoxyribonucleic acid sodium salt*) utilizado neste trabalho foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l e é extraído de timus de boi. Com o objetivo de trabalhar com fragmentos de DNA de 150pb, a estudante Nelly Cazalas da Universidade de Bordeaux e colaboradores do CRPP desenvolveram um protocolo [53] de retirada de sal e sonicação do DNA comprado, por meio de um ultra-som. O processo de retirada do sal, presente nas amostras compradas de DNA, foi realizado da seguinte maneira:

1. Uma amostra de 100mg de DNA foi dissolvida em 10ml de água deionizada, (10mg/ml), e colocada num tubo de 50ml para ser centrifugada. Em seguida a amostra foi agitada durante 1 ou 2 horas em um vórtex.
2. No passo seguinte foi feita a adição de um décimo do volume inicial (1ml) de acetato de sódio 3M, pH 5,2 (Sigma-Aldrich. Ref. S7899-500ml) e 2,5 vezes o mesmo volume (25 ml) de etanol ultra-puro, 100%. Neste momento o DNA precipitou, “como um algodão”, e foi congelado (-20°C) durante uma noite.

3. No dia seguinte, o tubo foi centrifugado a 5.200 rpm (que corresponde a 3500g) por 15 min a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o DNA recebeu novamente 10ml de solução de etanol 70%. O tubo foi agitado manualmente e deixado à temperatura ambiente por uma hora para em seguida, recomeçar novamente esse mesmo passo. Este passo é repetido três vezes.
4. Após a terceira repetição do passo anterior, o sobrenadante foi descartado e em seguida, a amostra de DNA foi “secada” em um evaporador rotativo durante vinte minutos (à temperatura abaixo de 40°C para não degradar o DNA e à baixa pressão), para remover todos os vestígios de etanol.

O processo de “quebra” do DNA para obter 150pb (50nm) pode ser realizado de inúmeras maneiras. O presente trabalho, destaca apenas as três diferentes técnicas utilizadas. Duas das maneiras de “quebrar” o DNA seguem os seguintes passos:

1. Uma amostra de 150mg de DNA é dissolvida em 7ml de água deionizada e colocada num recipiente apropriado (tubo de 50ml).
2. A amostra preparada é colocada para sonicar na potência de 82W. A ponteira de sonicador é mergulhada com a ponta na metade da solução preparada, e o recipiente da amostra fica parcialmente mergulhado em uma mistura de água e gelo.
3. O processo de sonicação pode ser realizado de duas maneiras: no primeiro, o sonicador é programado para trabalhar 1s e aguardar 1s, em vários ciclos totalizando 2 horas; no segundo, o sonicador é programado para trabalhar 10s e aguardar 30s, em vários ciclos totalizando 2 horas.
4. Após o último passo a amostra está contaminada com fragmentos de Titânio, liberados pela ponteira do sonicador, e é necessário filtrar a solução/amostra em filtros específicos, ou centrifugar a amostra para separar o titânio do DNA.

Uma terceira maneira de “quebrar” o DNA é deixando-o durante 30 horas em um ultra-som com água e gelo, na potência de 100W.

Por último a verificação do tamanho do DNA é realizado por meio do uso da técnica de eletroforese. Nesta técnica, uma pequena quantidade de DNA da amostra é retirada, marcada com Brometo e colocada em uma solução de Agarose e água sobre um gel também de Agarose. Após cerca de 50min sofrendo a interação de um campo elétrico (solução e gel de Agarose), é realizada a digitalização do gel de Agarose com o objetivo de verificar e comparar (com uma solução de fragmentos de tamanhos conhecidos) a distância percorrida pelos fragmentos de DNA. Quanto maior a distância percorrida menor é o fragmento de DNA.

Se o DNA estiver no tamanho adequado, basta “marcá-lo” com a prova fluorescente (YOYO).

As amostras de DNA com 150pb e marcadas com YOYO são pesadas e dissolvidas em água deionizada ou alguma solução tampão, conforme a concentração desejada. No presente trabalho foram preparadas amostras de fragmentos de DNA com diferentes concentrações na fase isotrópica, na mesofase colestérica e na região de coexistência de mesofases.

Renata Bicev e colaboradores [54] realizaram medidas de SAXS e verificaram que entre as concentrações de 100 mg/ml e 350 mg/ml o número de fragmentos de DNA em meio passo de uma hélice colestérica varia entre 200 e 450 fragmentos para um passo colestérico,p, de cerca de 2,5 μ m respectivamente; esse resultado foi obtido com uso de técnicas de raios X.

$$\frac{\frac{1}{2}p}{d} = \langle \text{numero de fragmentos} \rangle \quad (3.1)$$

Em que d é a distância de repetição.

3.2 IMPLEMENTAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FRAP

A técnica de FRAP é frequentemente utilizada por meio do uso de microscopia confocal porque esta última apresenta uma ótima resolução espacial, figura(3.1). Neste tipo de microscopia a iluminação da amostra é feita com uma fonte de luz laser que é focalizada sobre um *pinhole*, que controla a área iluminada na amostra. A objetiva apresenta uma profundidade de campo, de maneira que diferentes profundidades da amostras são vistas pelo observador ao mesmo tempo, o que produz um borramento da imagem. Utilizando um segundo *pinhole*, pode-se selecionar a imagem de praticamente um plano sobre a amostra. No microscópio confocal a amostra é montada sobre um motor *piezo* elétrico de modo que pode-se fazer uma varredura ao longo da direção z, e por meio de software a reconstrução 3D da amostra. A imagem de uma região da amostra com área maior que a área do *pinhole* é obtida pela varredura do feixe no plano x-y.

A imagem final é obtida a partir da luz recolhida na fotomultiplicadora, e os sinais são tratados por "software" específico. Uma das grandes vantagens do uso de um microscópio confocal, além da confocalidade, é a quantidade de experimentos que ele permite realizar já que pode-se usar mais de uma fotomultiplicadora funcionando ao mesmo tempo que permite captar sinais diferentes. O microscópio confocal também permite realizar *photobleachs* em regiões e formas diferentes dependendo da configuração do microscópio, em todos os casos com uma ótima resolução espacial.

A microscopia convencional, adaptada para a microscopia de luz fluorescente, também pode ser usada para a realização da técnica de FRAP. Com o objetivo de realizar essa técnica no GFCx, a fonte de luz de um microscópio óptico Diastar foi retirada e o aparelho adaptado em um mesa óptica. A fonte de luz do microscópio foi substituída por um laser, desviado por um conjunto de lentes, figura(3.2 e 3.3). Além disso foi feita

a instalação de um filtro dicróico no microscópio permitindo a visualização de amostras que emitem luz nos comprimentos de onda entre $\lambda = 500 - 600\text{nm}$, tornando possível a visualização das amostras. A adaptação também permite o uso de microscopia de luz polarizada, por meio do uso da própria fonte do microscópio e polarizadores também adaptados. A instalação de uma câmera CCD acoplada a um microcomputador, permite visualizar e acompanhar, de modo automático, a evolução da mancha de *photobleaching* de amostras fluorescentes no microscópio. Por meio da adaptação realizada no microscópio Diastar, foi possível realizar uma série de medidas para validação da técnica de FRAP.

O presente trabalho realizou as medidas utilizando o microscópio confocal Leica presente no Centre de Recherche Paul Pascal na Universidade de Bordeaux.

Figura 3.1: *Esquema microscopia confocal: confocalidade [14].*

3.3 MÉTODO DE ANÁLISE DAS IMAGENS DE FRAP

A mancha de *photobleaching* é produzida focalizando-se o feixe laser bastante intenso sobre a amostra durante um intervalo de tempo suficiente para produzir o desaparecimento local da fluorescência. A visualização da recuperação de fluorescência, após o *photobleaching* em uma amostra, pode ser realizada por meio da análise de um conjunto de imagens retiradas antes e após o *photobleaching*. As imagens devem ser retiradas

Figura 3.2: Representação esquemática do Arranjo Experimental desenvolvido no GFCx. (a) Representação do arranjo para realização do *photobleaching*; (b) Representação do arranjo para realização da observação usando *FRAP*.

antes do *photobleaching* para servirem de *background* para as imagens retiradas após o *photobleaching* e permitir a avaliação da recuperação total da fluorescência, da amostra irradiada. A análise de imagens adquiridas em diferentes intervalos de tempo permite obter o coeficiente de difusão.

A análise das imagens de FRAP é baseada principalmente na evolução da forma da mancha de *photobleaching* e no perfil da mancha. Nos experimentos realizados a mancha de *photobleaching* possui simetria circular, que é a simetria do feixe laser que atravessa o *pinhole* e está focalizado sobre a amostra. Em um meio isotrópico, o processo de difusão é o mesmo em todas as direções e a mancha de *photobleaching* deve evoluir conservando essa simetria. Nesse caso o perfil de intensidade de luz ao longo de uma direção deve ser descrito por uma gaussiana, equação(2.27).

A seguir será discutido como as imagens adquiridas nos experimentos serão analisadas para que seja possível identificar um processo de difusão isotrópico ou um processo de difusão anisotrópico.

(a) Foto Frontal 1

(b) Foto Lateral

(c) Foto Frontal 2

(d) Foto Diastar

Figura 3.3: Fotos do Arranjo Experimental desenvolvido no GFCx.

3.3.1 Análise das Imagens de FRAP

Os pesquisadores Seiffert e Oppermann [15,16] desenvolveram *softwares* para extrair o coeficiente de Difusão da análise de imagens de FRAP. Os *softwares* são baseados na difusão de moléculas em um meio isotrópico, ou seja, a evolução da mancha de *photobleaching* circular que evolui conservando sua simetria inicial. Nestes *softwares*, os pesquisadores propõem a análise e simulação de imagens retiradas com uso de FRAP

por meio dos procedimentos de análise descritos na figura (3.4). Posteriormente esse *software* foi modificado por Dobrindt, que introduziu a possibilidade de análise das imagens usando o método descrito no item 2.3.2 para um processo de difusão anisotrópico.

De acordo com o método proposto por Dobrindt e colaboradores, o processo de difusão em um meio anisotrópico, como em uma fase nemática será descrito por uma superposição de dois processos de difusão com coeficientes D_1 e D_2 . Nesse caso a mancha de *photobleaching* seria elíptica ao invés de circular. Em uma fase colestérica, devido à torção da orientação molecular ao longo da hélice colestérica o perfil da mancha de *photobleaching* seria descrito por um função de Bessel modificada.

Os procedimentos realizados durante a análise são discutidos a seguir e ilustrados na figura (3.4).

Figura 3.4: Fluxograma do algoritmo desenvolvido por Seiffert e Oppermann [15, 16] para realizar análise de imagens de FRAP, imagens de amostras fluorescentes e ilustrações dos ajustes dos dados

1. É feita a normalização da intensidade de fundo (*background*) da imagem. Para isso, uma imagem ou algumas imagens são adquiridas antes do *photobleaching* e por meio dela(s) têm-se o valor médio da intensidade de fundo.
2. Para cada imagem extrai-se a intensidade de luz de fundo e em seguida aplica-se um algoritmo para localização do centro da mancha de *photobleaching*. Esse algoritmo é aplicável para manchas com simetria circular.
3. Para cada imagem são extraídos 180 perfis da intensidade de luz ao longo de linhas cruzando o centro da mancha. Para cada ponto (pixel da imagem), o desvio quadrático médio da intensidade é considerado como incerteza da medida.
4. Cada perfil médio, das imagens de evolução da mancha de *photobleaching*, é ajustado segundo a equação(2.27), ou equação de Bessel modificada, equação (2.35).
5. A variâncias é extraída do ajuste do perfil médio, equação(2.27), e um ajuste linear da evolução das variâncias em função do tempo é realizado para extrair o coeficiente de Difusão da amostra, figura(3.4).

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS EXPERIMENTAIS E DE ANÁLISE DOS DADOS

4.1.1 Simulação das Imagens de FRAP

Seiffert e Oppermann, desenvolveram em seus trabalhos [15, 16], um software que realiza a simulação de imagens de FRAP. O software, basicamente, simula imagens realizadas por meio de FRAP com valores de ruído, em cada pixel da imagem, e coeficiente de difusão controlados pelo usuário. Para testar o programa foram simulados três conjuntos diferentes de imagens de FRAP, com o mesmo coeficiente de difusão, $D = 1\mu\text{m}^2/\text{s}$ mas com diferentes valores de ruídos, 10%, 20% e 40%. A partir das imagens simuladas, os programas de análise desenvolvidos (item 3.3) foram testados, usando o ajuste Gaussiano, equação(2.27), e o ajuste da Bessel modificada, equação(2.35).

As simulações realizadas são de conjuntos de imagens de FRAP, de *photobleaching* com forma inicialmente circular, que evolui mantendo sua forma circular. O perfil da mancha de *photobleach* é baseada na equação(2.27), característica de amostras em soluções isotrópicas. Se a análise das imagens simuladas é realizada com o ajuste Gaussiano, equação(2.27), espera-se obter como resultado o coeficiente de difusão igual a $D = 1\mu\text{m}^2/\text{s}$. Da mesma forma, se a análise é realizada com a função de Bessel modifi-

cada, equação(2.35), o resultado deve ser um coeficiente de difusão igual a $D = 1\mu\text{m}^2/\text{s}$, já que neste caso as variâncias da função de Bessel modificada são iguais, $\omega_1 = \omega_2$, e a função de Bessel Modificada deve ser aproximada por uma Gaussiana, $\omega_1 = \omega_2 = \omega$, equação(2.27)¹.

Os resultados encontrados com as imagens simuladas estão organizadas na tabela(4.1) e nas figuras(4.1 a 4.4). Segundo os resultados obtidos, tabela(4.1), é possível concluir que a análise com uso do ajuste Gaussiano (imagens com ruído de até 20%) apresenta valores compatíveis aos valores simulados/previstos. A análise das imagens realizada com o ajuste da Bessel modificada, embora não resulte em somente um coeficiente de difusão (como esperado, $\omega_1 = \omega_2 = \omega$), para o ajuste de um perfil Gaussiano, acaba apresentando em todos os casos (ruído menor que 20%) dois coeficientes de difusão muito próximos. Neste caso, as retas obtidas por meio do ajuste linear, de cada coeficiente de difusão, são paralelas e evidenciam coeficientes de difusão idênticos. Esse último resultado evidencia que o ajuste da Bessel modificada, quando aplicada a imagens de FRAP com perfil Gaussiano (amostras isotrópicas), apresenta dois coeficientes de difusão similares, como esperado.

Para as imagens simuladas com ruído de 40% os ajustes são muito ruins e já não é possível determinar o coeficiente de difusão figura (4.4).

Também foram feitas simulações em que a mancha de *photobleaching* ocupa uma área muito grande da imagem, figura (4.2). Este teste é importante porque na região de transição da mancha para a região fluorescente, poderia haver uma suavização da curva devido à resolução espacial da fotomultiplicadora. Mesmo nessas condições foi possível realizar o ajuste e os resultados obtidos são similares aos já reportados acima.

¹ O software que ajusta a Bessel Modificada não apresenta um algoritmo que realiza a aproximação do ajuste da Bessel Modificada em um ajuste Gaussiano; por consequência o ajuste linear do conjunto de imagens/variâncias pelo tempo (dos perfis Gaussianos das imagens) apresenta dois coeficientes de difusão similares.

Tabela 4.1: *Comparação dos resultados obtidos por meio de imagens simuladas e dois tipos diferentes de análise das mesmas imagens.*

ruído	10%	10% ²	20%	40%
$D(\mu\text{m}^2/\text{s})$ (Simulado)	1,0	1,0	1,0	1,0
$D(\mu\text{m}^2/\text{s})$ (Gauss)	1,07(11)	1,045(17)	0,93(23)	-
$D_1(\mu\text{m}^2/\text{s})$ (Bessel)	1,19(26)	0,97(10)	0,65(18)	-
$D_2(\mu\text{m}^2/\text{s})$ (Bessel)	1,29(26)	1,190(74)	1,64(51)	-
figuras	figura(4.1)	figura(4.2)	figura(4.3)	figura(4.4)

4.1.2 Calibração do Arranjo Experimental Desenvolvido no GFCx

O desenvolvimento do arranjo experimental, descrito no item (3.2), abriu uma nova perspectiva experimental no GFCx. Para garantir que o instrumental desenvolvido permitisse o uso adequado da técnica de FRAP, uma série de procedimentos foram realizados.

A calibração do arranjo experimental foi realizada com amostras de esferas de látex, 0,03% em volume, de diâmetro de 100 nm e marcadas com látex fluorescente. As esferas de látex foram dissolvidas a baixa concentração em água deionizada ou glicerina (50%). A escolha das esferas de látex foi feita porque o modelo teórico sobre difusão de partículas esféricas em meios isotrópicos, item (2.2.2), é bem fundamentado na literatura. Além disso, do ponto de vista experimental, as esferas de látex são funcionalizadas com sondas de látex fluorescente, o que permite o uso de FRAP para obter o coeficiente de difusão experimentalmente e a comparação com a previsão teórica usando a equação(2.21) de Stokes-Einstein.

O valor esperado do coeficiente de difusão para esferas de látex, segundo o modelo de Stokes-Einstein, equação (2.21) [55], é $D = 4,28\mu\text{m}^2/\text{s}$ (esferas de látex em solução aquosa) e $D = 1,13\mu\text{m}^2/\text{s}$ (esferas de látex em glicerina). Os experimentos de FRAP utilizando o arranjo instrumental (item 3.2) com amostras de látex em soluções diluídas de água e glicerina, apresentaram os seguintes valores para o coeficiente de difusão:

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Figura 4.1: Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 10% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana (b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).

Figura 4.2: Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 10% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0\mu\text{m}^2/\text{s}$, a mancha de bleach ocupa uma área da imagem muito maior do que na figura (4.1). (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).

$D = 2,25(30)\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D = 0,64(24)\mu\text{m}^2/\text{s}$. Esses valores encontrados são duas vezes menores que os valores previstos pelo modelo de Stokes-Einstein.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Figura 4.3: Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 20% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana (b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Figura 4.4: Resultados obtidos pela análise das imagens simuladas com 40% de ruído e com coeficiente de difusão igual a $D = 1,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana (b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).

Motivados pela possibilidade de agregação das esferas de látex durante o armazenamento das mesmas, foi feita a hipótese de que as moléculas esféricas teriam formado dímeros, similares a um cilindro, com mesmo raio, mas com comprimento de dois diâmetros. Utilizando a equação (2.23) proposta por Tirado e colaboradores foi calculado o coeficiente de difusão esperado tomando como fator de forma $p=2$. Os resultados obtidos, foram $D = 2,25\mu\text{m}^2/\text{s}$ para partículas de látex em solução aquosa e $D = 0,53\mu\text{m}^2/\text{s}$ as partículas de látex em glicerina. Comparando com os valores experimentais vemos que há um bom acordo.

Essa hipótese de agregação das partículas formando dímeros foi posteriormente confirmada por Emerson R. T. da Silva, em um experimento de microscopia eletrônica de transmissão em uma amostra da solução que sofreu criofratura. O histograma das distribuições de tamanho dos agregados é mostrado na figura (4.5). Um exemplo de resultado obtido com a calibração pode ser visualizado na figura(4.6).

4.2 DIFUSÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

4.2.1 Fase Isotrópica

Como foi mencionado no item (2.1.3) soluções de fragmentos de DNA podem apresentar fases isotrópicas de dois tipos. Utilizando a mesma denominação de Rill e colaboradores [56], essas fases são chamadas de isotrópica e isotrópica viscosa, figura(2.10). Durante a preparação das amostras, foi possível constatar esta diferença de viscosidade entre as fases isotrópica e isotrópica viscosa, de modo qualitativo. As amostras de fragmentos de DNA em solução aquosa, com concentração abaixo de cerca de 100-120(mg/ml), apresentam uma viscosidade baixa, observada quando a mesma é retirada de um “ependorf” utilizando uma pipeta. Acima dessas concentrações só é possível retirar a amostra de um ependorf com auxílio de uma espátula, devido a alta viscosidade da mesma.

Figura 4.5: Distribuição de tamanho das partículas de látex. Figura gentilmente cedida pelo estudante Emerson Rodrigo Teixeira da Silva.

Na concentração limite entre as fases isotrópica e isotrópica viscosa o emprego de FRAP foi realizado por meio de microscopia confocal. A análise das imagens de FRAP foi realizada com uso do perfil Gaussiano, equação(2.27), e permitiu determinar o coeficiente de difusão de fragmentos de DNA em solução aquosa e solução aquosa de acetato de amônia ($C_2H_7NO_2$).

Neste trabalho a maioria dos ensaios de FRAP foram realizados em amostras com sal (acetato de amônia, 0,25M), mas foram feitos também alguns ensaios anteriores em amostras sem sal e os resultados serão apresentados nesta seção. Para as amostras sem sal o domínio de concentrações para o qual existem fases em coexistência é muito extenso, figura (2.10), o que torna muito difícil a obtenção de domínios monofásicos, mesmo para concentrações altas. A adição de sal permite a preparação de amostras com domínios monofásicos tanto isotrópico, como colestérico.

(a)

(b)

(c)

Figura 4.6: *Imagens adquiridas por meio do arranjo experimental desenvolvido no GFCx e resultados das análises para amostra de esferas (diâmetro de 100nm) de látex 0,03% em volume em solução de 50% de glicerina. (a) Imagem da mancha de photobleach. (b) Perfil das imagens de FRAP, e ajuste de um perfil Gaussiano. (c) Evolução da largura da mancha de photobleach*

Alguns dos resultados apresentados nesta seção referem-se aos ensaios realizados utilizando a montagem experimental desenvolvida no Grupo de Fluidos Complexos, mas a grande maioria foi obtida utilizando um microscópio confocal, no Laboratoire de Recherche Paul Pascal (CNRS), na França, durante um estágio de dois meses. Para os experimentos de FRAP as amostras foram preparadas entre lâmina e lamínula de vidro de acordo como descrito no item(3.1) para concentrações entre 80 mg/ml e 350 mg/ml.

FRAP em Microscopia Confocal, soluções aquosas e com acetato de amônia

Os resultados aqui apresentados referem-se a soluções de fragmentos de DNA que sofreram previamente o processo de retirada do sal, foram sonicados em ultra-som (item 3.1) e solubilizados em água deionizada e em água deionizada com adição de 0,25M de acetato de amônia. A técnica de FRAP foi empregada com microscopia confocal, logo após a preparação de amostras ultra finas e cisalhadas mecanicamente. As concentrações das solução eram de aproximadamente 80(mg/ml), para as soluções de fragmentos de DNA em solução aquosa, a concentração de 80(mg/ml), encontra-se no limite entre a fase isotrópica e isotrópica viscosa.

Para testar os métodos de análise das imagens, apresentaremos o resultado da análise empregando os dois métodos descritos no item 3.3. O perfil de intensidade de luz foi ajustado tanto por uma função gaussiana como pela função de Bessel modificada.

Um exemplo de um conjunto de imagens de uma amostra isotrópica, obtidas por meio de FRAP, com os perfis resultantes e os respectivos ajustes lineares são apresentados na figura(4.7). Nesta figura, é possível visualizar uma boa qualidade de ajuste dos perfis Gaussiano e Bessel modificada obtidos nas imagens de FRAP, figuras 4.7(b), 4.7(c). A figura(4.8) comprova que ambos os ajuste utilizados apresentam a mesma qualidade já que tanto o perfil Gaussiano como o perfil da Bessel modificada apresentam, praticamente, os mesmos valores de χ^2 . Por meio do ajuste Gaussiano é possível construir o gráfico da evolução das variâncias (largura da mancha de *photobleach*) de cada perfil em função do tempo, figura(4.7(d)), e obter seguinte coeficiente de difusão dessa amostra isotrópica, $D = 31,5(2,0)\mu\text{m}^2/\text{s}$.

A repetição da análise do mesmo conjunto de dados, por meio do ajuste de uma Bessel modificada, figura(4.7(e)), mostra praticamente o mesmo coeficiente de difusão $D_1 = 23,3(8,6)\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D_2 = 29,9(3,6)\mu\text{m}^2/\text{s}$.

As simulações (item 4.1.1) e o modelo teórico apontam que o ajuste de uma função de Bessel modificada em uma amostra isotrópica deve recair em um perfil gaussiano

com variâncias iguais $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma$ e portanto apresentar dois coeficientes de difusão iguais. Este fato, concretiza-se nesta análise e é comprovado por meio das imagens da figura(4.7) e nas amostras isotrópicas em geral, nas quais o ruído das imagens não é muito grande.

Nas imagens e perfis apresentados na figura (4.7), é possível visualizar que o valor do ruído é grande porque a varredura da imagem foi rápida. Isso é necessário para processos de difusão rápidos, onde ocorre uma evolução rápida da mancha de *photobleaching*. Para aumentar a taxa de aquisição é necessário diminuir o tempo de varredura. Nesse caso, não seria possível distinguir entre um ajuste ou outro, e não se justifica o uso do ajuste com a função de Bessel modificada.

O procedimento de análise com uso do perfil gaussiano, exposto nos parágrafos anteriores, foi realizado para amostras de DNA em solução aquosa e DNA em solução aquosa de $C_2H_7NO_2$. A tabela(4.2) mostra os resultados obtidos e compara-os com os existentes na literatura.

Discussão Geral para as Amostras Isotrópicas

Nicolai/ Mandel [22] e Wang e colaboradores [7] encontraram experimentalmente, com uso de DLS, FRS e QELS, valores do coeficiente de difusão de fragmentos de DNA em diferentes concentrações dos fragmentos diluídos em diferentes concentrações de sal monovalente, figura(2.14). O trabalho de Wang [7] verifica que em baixas concentrações de sal, os fragmentos de DNA apresentam coeficientes de difusão, menores do que os dissolvidos em soluções com maior concentração de sal. Além disso Wang [7] verificou também que os valores do coeficiente de difusão, diminuem sensivelmente com o aumento da concentração dos fragmentos. A tabela(4.2) mostra uma comparação dos valores de coeficiente de difusão, das maiores concentrações de fragmentos, retirados da curva de Wang, figura(2.14), com os valores obtidos neste trabalho. Nesta tabela, é possível visualizar que os valores do coeficiente de difusão, para fragmentos de DNA, ob-

Figura 4.7: Imagens adquiridas no microscópio confocal e resultados das análises para amostra de 81(2)(mg/ml)(DNA+água deionizada) de fragmentos de DNA nas fases isotrópica e isotrópica viscosa. (a) textura na região de photobleaching. Ajuste do perfil de intensidade de luz com função gaussiana(b) e (c) e função Bessel modificada (d) e (e).

Figura 4.8: *Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 81(2)(mg/ml)(DNA em solução aquosa) de fragmentos de DNA na mesofase isotrópica.*

tidos neste trabalho estão próximos (somando os valores de incertezas), entre $10\mu m^2/s$ e $30\mu m^2/s$, dos valores encontrados com DLS no regime diluído [22]. Os resultados de Wang [7] mostram que o aumento da concentração de sal nas soluções de fragmentos de DNA corresponde a um aumento no coeficiente de difusão dos fragmentos já que a interação eletrostática entre os fragmentos é reduzida.

Neste trabalho os valores obtidos para o coeficiente de difusão dos fragmentos de DNA concordam com os valores disponíveis nas literatura e com o valor previsto por Tirado [35]. Não foi explorado o efeito do sal no comportamento dinâmicos dos fragmentos pois, nos experimentos realizados neste trabalho, foi empregado apenas uma concentração de sal. Para um estudo mais sistemático seria interessante preparar soluções variando a concentração de sal em um largo intervalo.

Foi verificado que o perfil de intensidade de luz na mancha de *photobleaching* é descrito de maneira mais apropriada pelo perfil gaussiano e que o ajuste com o perfil de uma função de Bessel modificada resulta em dois coeficientes de difusão similares.

Portanto, o método de análise indica um processo de difusão isotrópico, como de fato se espera para essas soluções.

Tabela 4.2: Valores dos coeficientes de Difusão, de fragmentos de DNA, obtidos neste trabalho e valores encontrados na literatura. DLS: Espalhamento de luz dinâmico; QELS: Espalhamento de luz quase-elástico; FRS: Espalhamento forçado Rayleigh.

$C_{DNA}(\text{mg/ml})$	$D(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$C_{sal}(\text{M})$	técnicas
solução diluída	26 [35]	-	Teórico
solução diluída	30(6) [22]	0,1 e 0,5	DLS
~ 7	$\sim 3,2$ [7]	0,001 NaCl	FRS e QELS
~ 7	$\sim 2,3$ [7]	0,2 NaCl	FRS e QELS
81(2)	27(8)	0	confocal-FRAP
82(2)	22(12)	0,25 $C_2H_7NO_2$	confocal-FRAP

4.2.2 Mesofase Colestérica, Domínio Planar

A identificação de amostras na mesofase colestérica no domínio planar, foi realizada pela visualização da textura escura em microscopia luz polarizada. Uma das maneiras de se certificar de que a textura escura é de domínio planar é visualizar a textura de *fingerprints* ao lado da textura escura.

Os experimentos para determinação do coeficiente de difusão dos fragmentos de DNA na mesofase colestérica foram realizados com uma solução de 353(3)(mg/ml). A solução foi preparada a partir de fragmentos de DNA, que sofreram previamente o processo de remoção do sal, e depois acrescentou-se acetato de amônia à solução.

A análise das imagens para determinação dos coeficientes de difusão foi feita utilizando os dois métodos discutidos no item 3.3. Para que se possa distinguir um perfil de intensidade de luz gaussiano de um não gaussiano é essencial que as imagens tenham boa qualidade, isto é, boa resolução espacial. Outro fator importante é a escolha de um domínio planar, figura(2.24), de maneira que a direção do eixo colestérico seja paralelo à direção de propagação da luz, como ilustrado na figura (4.9). Assim, os experimentos

de FRAP no domínio planar da mesofase colestérica permitem verificar a aplicabilidade do método proposto por Dobrindt para determinação dos coeficientes de difusão paralelo e perpendicular à direção local de alinhamento das moléculas.

Os resultados e a validação do modelo da Bessel modificada podem ser vistos na figura(4.10). Nesta figura, com o auxílio da figura(4.11), é possível observar que o ajuste Gaussiano não ajusta os dados com a mesma qualidade que o ajuste da Bessel modificada, já que o valor de χ^2 é razoavelmente menor nos ajustes de perfil da função Bessel modificada, diferentemente das amostras isotrópicas nas quais os valores de χ^2 eram praticamente iguais em ambos os ajustes.

A ótima qualidade do ajuste dos dados, do perfil da macha de *photobleaching*, com uso da Bessel modificada em comparação com o ajuste Gaussiano pode ser uma evidência da anisotropia do meio no qual foi realizado o *photobleaching*.

A figura(4.11) mostra a evolução da qualidade dos ajustes, χ^2 , de perfil Gaussiano e Bessel. Por meio dessa figura é possível visualizar que com o passar do tempo (após *photobleaching*), a qualidade do ajuste gaussiano apresenta uma melhora enquanto o ajuste da Bessel modificada permanece praticamente estável como nos ajustes iniciais. Isso deve-se à diminuição do contraste entre a mancha e o fundo e, conseqüentemente, a redução da razão entre intensidade da mancha e o ruído.

Os resultados para essa mesofase colestérica foram obtidos a partir de imagens de FRAP, em uma amostra para várias regiões diferentes da mesma amostra. Os resultados obtidos do coeficiente de difusão foram analisados por meio do ajuste da Bessel modificada. A partir de vários experimentos, a média dos diversos valores de difusão foi encontrada e a incerteza do valor do coeficiente médio de difusão foi calculada por meio da equação: $\sigma^2 = \sigma_d^2 + \sigma_i^2$, em que σ_d^2 é a dispersão dos valores da média e σ_i^2 é a média dos valores das incertezas, calculadas para cada coeficiente de difusão. Os resultados obtidos foram: $D_1 = 5,4(3,2)10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D_2 = 0,44(25)10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{s}$. Esses coeficientes de difusão D_1 e D_2 referem-se aos coeficientes de difusão paralelo e perpendicular ao

eixo de orientação das moléculas.

Os resultados obtidos mostram que na análise das imagens de FRAP na mesofase colestérica é possível distinguir os dois perfis de intensidade de luz (gaussiano e Bessel modificada) na região da mancha de *photobleaching* e que o perfil mais adequado é dado pela função de Bessel modificada.

A partir do ajuste do perfil de intensidade de luz com a função de Bessel modificada foi possível obter dois coeficientes de difusão, paralelo e perpendicular à direção de orientação das moléculas de DNA. A razão entre $D_{//}$ e $D_{\perp}$ é de aproximadamente 12, o que é maior do seria previsto pelos modelos teóricos discutidos no item 2.2.3.

4.2.3 Coexistência de Mesofases

De acordo com o diagrama de fases apresentado na figura (2.10), soluções de DNA apresentam uma transição da fase isotrópica para a fase anisotrópica com uma região intermediária de coexistência de fases. Nesse domínio de concentrações pode-se encontrar coexistência de duas ou até três mesofases, dependendo da concentração de sal na solução. A identificação das mesofases em coexistência por meio de microscopia de luz polarizada é uma tarefa difícil. Para certas concentrações pode haver coexistência de duas mesofases com estruturas microscópicas diferentes, porém oticamente isotrópicas. Esse é o caso do domínio de coexistência isotrópico e isotrópico viscoso. A mesofase pré-colestérica apresenta birrefringência muito fraca, e nas preparações utilizadas nos experimentos com a solução entre lâmina e lamínula é muito difícil identificar domínios da mesofase pré-colestérica coexistindo com uma mesofase oticamente isotrópica.

Nesta seção serão apresentados os resultados dos experimentos de FRAP realizados com amostras com concentração no domínio intermediário entre a fase isotrópica e a fase anisotrópica. As amostras utilizadas nesses experimentos possuíam concentração de DNA entre 150(mg/ml) e 160(mg/ml), com e sem acetato de amônia. Para realizar os experimentos de FRAP foram selecionados regiões na lâmina que se apresentavam completamente escuras na observação entre polarizadores cruzados, não apresentavam

Figura 4.9: *Imagens adquiridas no microscópio confocal pra solução de fragmentos de DNA na mesofase colestérica. Imagens de baixo aumento: (a) fluorescência da amostra, (b) textura de microscopia em luz polarizada: domínio planar (P) e domínio homeotrópico (H). (c) Mancha de photobleaching (d) textura correspondente à região planar onde foi realizado o photobleaching.*

variação na intensidade da luz transmitida, figura (4.12).

Na análise das imagens de FRAP serão aplicados os dois métodos já discutidos anteriormente, com ajuste gaussiano e Bessel modificada para o perfil de intensidade da luz na zona de *photobleaching*. A qualidade dos ajustes é usada como critério para decidir

Figura 4.10: Análise das imagens adquiridas no microscópio confocal para solução na fase colestérica. (a) e (b) perfil gaussiano ajustado e (c) e (d) ajuste com perfil de função de Bessel modificada.

sobre qual método é mais adequado para descrever o processo de difusão.

Nas figuras(4.13(a) e 4.13(b)) são mostrados os perfis de intensidade de luz ajustados a mancha de *photobleaching* para uma amostra com concentração de 165(2)(mg/ml) com acetato de amônia em solução. Nas figuras(4.13(c) e 4.13(d)) é possível ver que, com o ajuste gaussiano o coeficiente de difusão obtido é igual a $D = 0,123(11)\mu\text{m}^2/\text{s}$ e que o ajuste com a Bessel modificada resulta em dois coeficiente de difusão, $D_1 =$

Figura 4.11: *Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo.*

$0,130(12)\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D_2 = 0,128(11)\mu\text{m}^2/\text{s}$, próximos ao valor obtido com o ajuste gaussiano. A qualidade dos ajustes pode ser comparada na figura(4.14), e é possível ver que os dois métodos apresentam a mesma qualidade do ajuste. Neste caso, a Bessel modificada pode ser reduzida a uma função Gaussiana em que $\omega_1 = \omega_2 = \omega$ e é possível afirmar que o perfil da mancha *photobleaching* é dado pelo perfil gaussiano e dessa forma a difusão dos fragmentos de DNA é considerada isotrópica.

Para essa mesma lâmina foram realizados outros ensaios, escolhendo-se sempre regiões com textura correspondente a fase isotrópica, em microscopia de luz polarizada. Na figura(4.15) são apresentados os resultados das análises das imagens com ajuste de perfil gaussiano e Bessel modificada, onde observa-se que o ajuste com a função Bessel modificada fornece dois coeficientes de difusão distintos $D_1 = 0,443(48)\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D_2 = 0,0811(90)\mu\text{m}^2/\text{s}$. O coeficiente de difusão obtido com ajuste de perfil gaussiano fornece $D_1 = 0,1554(64)\mu\text{m}^2/\text{s}$. Neste caso pode-se deduzir que trata-se de uma difusão anisotrópica, embora não seja possível obter essa informação a partir apenas da observação em luz polarizada.

Comparando-se a qualidade do ajuste para os perfis gaussianos e Bessel modificada, figura(4.16), é possível ver que a função Bessel modificada é o ajuste que melhor descreve o perfil da mancha de *photobleaching*. Neste caso, pode-se deduzir que trata-se de uma difusão anisotrópica, embora não seja possível obter essa informação apenas a partir da observação em microscopia de luz polarizada. Essa região da amostra poderia corresponder a uma mesofase pré-colestérica, que Rill denomina de colestérica de passo longo.

Resultado similar foi obtido para amostras de DNA na concentração de 160(1)(mg/ml), sem adição de acetato de amônia e sem o processo de retirada prévia do sal presente na amostra adquirida. Neste caso a técnica de FRAP foi empregada com uso do arranjo experimental desenvolvido no GFCx. Para essa amostra também foi escolhida uma região óticamente isotrópica para a realização de *photobleaching*. O resultado da análise dessa amostra é mostrado na figura(4.17). Nessa figura é possível observar que o melhor ajuste da mancha de *photobleaching* é obtido com a função de Bessel modificada, figura(4.18); com $D_1 = 2,49(70)\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $D_2 = 0,10(2)\mu\text{m}^2/\text{s}$. O coeficiente de difusão D_1 corresponde ao processo de difusão mais rápido; paralelo ao eixo de orientação molecular local. É possível ver que a anisotropia de difusão, que é da ordem de 25 é bastante grande quando comparada a previsões de simulações [10].

A média dos resultados obtidos para os coeficientes de difusão em amostras com concentrações nesse domínio de coexistência é apresentado na tabela (4.3). Os resultados dos experimentos em amostras com composição no domínio de coexistência mostram que a partir dos ajustes de perfil da mancha de *photobleaching* podemos obter informações sobre o ordenamento molecular local. Mesmo em regiões, óticamente isotrópicas, notamos que o processo de difusão pode ser anisotrópico, refletindo o ordenamento molecular.

4.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na tabela(4.4) são apresentados os valores médios obtidos para o coeficiente de difusão para soluções de DNA com diferentes concentrações. Nota-se que para as soluções

Tabela 4.3: Valores médios dos coeficientes de Difusão de fragmentos de DNA, em regiões de coexistência de mesofases nas contrações de fragmentos de DNA próximas de 160(mg/ml). * valor de apenas uma medida.

C_{DNA} (mg/ml)	$D_1(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$D_2(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$C_{C_2H_7NO_2}$ (M)	técnicas/ajustes
160(1)	0,107(2)	-	0	GFCx-Gauss
146(2)	3,3(1,8)	-	0	confocal-Gauss
165(2)	0,17(7)	-	0,25	confocal-Gauss
160(1)	2,49(70)	0,099(22)	0	GFCx-Bessel*
146(2)	2,8(1,0)	1,0(4)	0	confocal-Bessel*
165(2)	0,43(16)	0,074(31)	0,25	confocal-Bessel

Tabela 4.4: Síntese geral dos valores dos coeficientes de Difusão, de fragmentos de DNA, obtidos neste trabalho com uso de FRAP. Primeiro bloco amostras isotrópicas, segundo bloco amostras com coexistência de mesofases e terceiro bloco amostra colestérica. técnicas: X^C - microscopia confocal; X^F - microscopia convencional; GFCx * valor de apenas uma medida.

C_{DNA} (mg/ml)	$D_1(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$D_2(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$C_{C_2H_7NO_2}$ (M)	ajuste
81(2) ^C	27(8)	-	0	Gauss
82(2) ^C	22(12)	-	0,25	Gauss
146(2) ^C	3,3(1,8)	-	0	Gauss
146(2) ^C	2,8(1,0)	1,0(4)	0	Bessel*
160(1) ^F	0,107(2)	-	0	Gauss
160(1) ^F	2,49(70)	0,099(22)	0	Bessel*
165(2) ^C	0,17(7)	-	0,25	Gauss
165(2) ^C	0,43(16)	0,074(31)	0,25	Bessel
353(3) ^C	0,054(32)	0,0044(25)	0,25	Bessel

com concentrações no domínio da fase isotrópica o perfil da mancha de *photobleaching* foi melhor ajustado por uma gaussiana, o que corresponde a um processo de difusão isotrópico. Os valores obtidos encontram-se no intervalo entre 20 a 30 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Para a amostra na fase colestérica, o melhor ajuste para o perfil de intensidade de luz na região de *photobleaching* é obtido com a função de Bessel modificada, e o critério para a escolha do melhor ajuste baseia-se na comparação dos valores de χ^2 para os dois perfis. Os valores do coeficiente de difusão (D_1 e D_2) estão em torno de $10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{s}$, o

que mostra uma grande redução na mobilidade das moléculas. Foi visto também que a anisotropia de difusão é superior ao que seria esperado a partir de simulações por dinâmica Browniana de cilindros. Anisotropia de difusão da ordem de 20 foi observada para a solução de vírus f_d , na fase nemática, na orientação na vizinhança da transição a fase esmética [12].

Para amostras com concentração na região de coexistência de mesofases, verifica-se que ambos os perfis, gaussiano ou Bessel modificada, são possíveis, dependendo da região da amostra escolhida para o *photobleaching*. Para essas amostras pode-se identificar basicamente dois conjuntos de valores, para o coeficiente de difusão. Um conjunto de dados com D entre 2 e 3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ e outro entre 0,5 e 0,1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Como nessa região pode-se encontrar a coexistência de até 3 mesofases, é razoável que os valores obtidos para o coeficiente de difusão possam ser agrupados dessa maneira.

Para as amostras em coexistência de fase foram realizadas medidas de difusão usando um microscópio confocal (CRPP) e o instrumental desenvolvido no GFCx, de modo que os valores na tabela (4.4) mostram que é possível discriminar processos de difusão isotrópicos e anisotrópicos empregando tanto o confocal como o instrumental do GFCx. A diferença entre o emprego da técnica de FRAP no confocal e no GFCx dá-se na dispersão dos valores de difusão encontrados, que são maiores com uso do instrumental do GFCx. De modo geral, comparando-se os resultados obtidos na montagem desenvolvida no Grupo de Fluidos Complexos, os valores encontrados para os coeficientes de difusão estão de bom acordo com os valores obtidos utilizando o microscópio confocal. Como a resolução espacial nessa montagem é inferior a que se obtém em um microscópio confocal, a dificuldade na utilização dessa montagem é que ela requer domínios homogêneos bem orientados, enquanto no microscópio confocal é possível trabalhar com domínios menores.

A visualização da variação dos valores obtidos pode ser melhor visualizada na figura(4.19), onde percebe-se um grupo de valores entre 20 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ e 30 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, que atri-

buímos ao coeficiente de difusão na fase isotrópica. Nota-se ainda um outro grupo, com D entre 2 e 3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ e um terceiro com valores ainda menores. A identificação mais clara do comportamento do coeficiente de difusão em função da concentração requer um estudo mais sistemático, combinando ainda outras técnicas que permitam também a determinação da estrutura microscópica. Na mesma figura, é possível acompanhar a evolução do comportamento do coeficiente de difusão para as amostras estudadas. Na região de coexistência de fases vemos que ocorre uma redução acentuada do coeficiente de difusão, para a fase isotrópica coexistindo com outras fases mais ordenadas.

É possível observar nessa figura, que a fase anisotrópica apresenta dois coeficientes de difusão e que a anisotropia de difusão aumenta com o aumento de concentração. Esse comportamento é bastante semelhante ao observado para fragmentos de vírus [12] na mesofase nemática.

(a)

(b)

(c)

Figura 4.12: *Imagens adquiridas no microscópio confocal da amostra de 165(2)(mg/ml) ($DNA + C_2H_7NO_2$) de fragmentos de DNA. Imagens de baixo aumento: (a) fluorescência da amostra, (b) textura de microscopia em luz polarizada: opticamente isotrópica. (c) Imagens, de fluorescência da amostra, com aumento na região de photobleaching:*

Figura 4.13: Análise das imagens adquiridas no microscópio confocal para solução na de $165(2)(\text{mg/ml})(\text{DNA}+\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2)$. (a) e (b) perfil gaussiano ajustado e (c) e (d) ajuste com perfil de função de Bessel modificada.

Figura 4.14: *Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂) de fragmentos de DNA em uma região de coexistência de mesofases.*

Figura 4.15: *Imagens adquiridas no microscópio confocal e resultados das análises para amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂). (a) e (b) perfil gaussiano ajustado e (c) e (d) ajuste com perfil de função de Bessel modificada.*

Figura 4.16: *Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 165(2)(mg/ml) (DNA+C₂H₇NO₂) de fragmentos de DNA em uma região de coexistência de mesofases.*

Figura 4.17: Imagens adquiridas com o arranjo desenvolvido no GFCx e resultados das análises para amostra de $160(1)(\text{mg/ml})(\text{DNA} + \text{água deionizada})$ de fragmentos de DNA. (a) Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado (Gaussiano ou Bessel) em cada imagem. (b) Perfil retirado, das imagens de FRAP, e ajuste de um perfil Gaussiano. (c) Evolução da largura da mancha de photobleach (ajuste de perfil Gaussiano), em função do tempo. (d) Perfil retirado, das imagens de FRAP, e ajuste de um perfil Bessel Modificado. (f) Evolução da largura da mancha de photobleach (ajuste de perfil Bessel modificada), em função do tempo.

Figura 4.18: Evolução dos valores de χ^2 para o perfil ajustado, Gaussiano e Bessel, em função do tempo. Amostra de 160(1)(mg/ml)(DNA+água deionizada) de fragmentos de DNA em uma região de coexistência de mesofases.

Figura 4.19: Evolução dos valores dos coeficientes de difusão para amostras nas mesofases isotrópica, colestérica e com coexistência de mesofases. I corresponde ao domínio da fase isotrópica e N* à mesofase colestérica. Na região entre as duas fases há coexistência de duas ou até três mesofases.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

Este trabalho investigou as propriedades dinâmicas de fragmentos de DNA de 150pb em soluções aquosas com concentrações, nas fases isotrópica e anisotrópica. Para isso foi empregada a técnica de FRAP utilizando uma montagem desenvolvida no laboratório de Fluídos Complexos e também um microscópio confocal.

Em uma primeira etapa houve a preocupação de validar a montagem experimental e os métodos de análises das imagens de FRAP e para isso foram feitos experimentos para a determinação do coeficiente de difusão de esferas de látex, de diâmetro conhecido em soluções de água e glicerina. Também foram feitos vários ensaios variando-se os parâmetros experimentais, tais como tempo de *photobleaching*, potência do feixe de iluminação durante a aquisição das imagens, tempo de aquisição, etc, que permitiram estabelecer procedimentos confiáveis para a realização do experimento.

Para a análise das imagens de FRAP foram testadas duas possibilidades para descrever processos de difusão isotrópico e anisotrópico. No caso de um processo de difusão isotrópico, o perfil de intensidade de luz na região de *photobleaching* é descrito por uma função gaussiana, e no caso da difusão anisotrópica por uma função de Bessel modificada. As imagens obtidas nos experimentos de FRAP foram analisadas segundo os dois perfis possíveis e a qualidade do ajuste foi comparada.

Utilizando um software já disponível [15], foram feitas simulações de imagens de

photobleaching, para um processo de difusão isotrópico com diferentes níveis de ruído. A análise dessas imagens mostrou que, com nível de ruído de até 20%, o perfil de intensidade de luz é bem descrito por uma função gaussiana. O ajuste do perfil com uma função de Bessel modificada fornece valores de coeficiente de difusão iguais, isto é, sem anisotropia, e o valor é próximo do valor esperado, porém a qualidade do ajuste é muito inferior ao obtido com o perfil gaussiano.

Para a determinação do coeficiente de difusão do DNA na fase isotrópica e colestéricas foram preparadas soluções com concentrações de aproximadamente 80 mg/ml e 350 mg/ml, respectivamente. Em ambos os casos, foi acrescentado acetato de amônia a solução, na concentração de 0,2M. Nessas composições as amostras apresentam-se homogêneas e monofásicas. Os dois perfis para a mancha de *photobleaching*, gaussiano e Bessel modificada, foram empregados para a análise das imagens. Na fase isotrópica, o melhor ajuste é obtido com o perfil gaussiano, enquanto na fase colestérica o melhor ajuste é obtido com o perfil Bessel modificado, que fornece dois coeficiente diferentes.

Na fase isotrópica a função gaussiana é a que melhor descreve o perfil de intensidade de luz da mancha de *photobleaching* e o valor obtido para o coeficiente de difusão está em torno de $20\mu\text{m}^2/\text{s}$, que é um valor compatível com os valores encontrados na literatura para soluções de DNA com fragmentos de mesma dimensão na fase isotrópica. Na fase colestérica, o *photobleaching* foi realizado no domínio planar, que corresponde ao heixo da hélice colestérica paralelo à direção de propagação da luz. A análise das imagens de FRAP mostrou que o perfil da intensidade de luz é melhor ajustado por uma função de Bessel modificada. O experimento de FRAP na fase colestérica com essa geometria dá acesso experimental à determinação de dois coeficientes de difusão D_1 e D_2 , que correspondem aos coeficientes de difusão paralelo e perpendicular à direção de orientação molecular, respectivamente. Os valores obtidos para o coeficiente de difusão estão entre $10^{-1}\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{s}$, com uma anisotropia da ordem de 12.

Também foram feitas medidas para amostras com composição que se situam na re-

gião intermediária entre a fase isotrópica e a fase anisotrópica e que podem apresentar duas ou até três fases em coexistência. Em observações de microscopia de polarização essas amostras apresentavam textura homogênea e sem birrefringência e foram feitos ensaios de *photobleaching* em diferentes regiões de uma mesma amostra. A análise das imagens, seguindo o mesmo procedimento discutido acima, revelou que em algumas regiões o perfil da mancha de *photobleaching* é bem ajustado por uma função gaussiana, e em outras regiões da mesma amostra, o perfil é mais bem ajustado por uma função de Bessel modificada.

Nesse domínio de concentração, de fato, pode existir uma fase isotrópica viscosa, e há um conjunto de dados experimentais que correspondem a um processo de difusão isotrópico com um coeficiente de difusão que está entre $2\mu\text{m}^2/\text{s}$ e $3\mu\text{m}^2/\text{s}$. Também há um segundo conjunto de resultados que corresponde a um processo de difusão anisotrópico com valores da ordem de $10^{-1}\mu\text{m}^2/\text{s}$. A existência desses domínios anisotrópicos em coexistência com uma fase isotrópica é compatível com observações relatadas na literatura. Observou-se ainda que a anisotropia de difusão para as amostras no domínio de coexistência de fases é da ordem de 5, ou seja, menor que na fase colestérica.

Em resumo, as principais contribuições deste trabalho são:

- Desenvolvimento e validação de uma montagem experimental no GFCx que permite a realização de experimentos de FRAP.
- Desenvolvimento de um procedimento de análise das imagens de FRAP que permite discriminar um processo de difusão isotrópico de um processo de difusão anisotrópico.
- Determinação do coeficiente de difusão de fragmentos de DNA em soluções em fases isotrópicas e anisotrópicas.

Esse trabalho abre a perspectiva de se investigar de maneira sistemática o comportamento do coeficiente de difusão ao longo das transições da fase isotrópica para o domínio

de coexistência de fases e em seguida a transição para a fase colestérica. Os resultados apresentados indicam que a anisotropia de difusão muda ao longo desses domínios e esse é outro aspecto que merece investigação.

Finalmente, a disponibilidade dos métodos experimentais e de análise permite que essa abordagem possa ser aplicada para o estudo de propriedades dinâmicas de outras biomoléculas em soluções, ou em sistemas mais complexos.

Apêndice A

Solução da Segunda lei de Fick

Com o objetivo de resolver a segunda lei de Fick, em uma dimensão, que é uma equação diferencial (A.1), as seguintes condições de contorno serão assumidas: a concentração de substância C é infinita em $x = 0$ e 0 em todo resto. Em uma dimensão pode-se expressar essas condições como um função delta $C(x) = M\delta(x)$ que tem como resultado:

$$\int_{-\infty}^{\infty} C(x)dx = C_0,$$

em que $t = 0$ e C_0 é o total de substância que difunde. Por meio dessas condições de contorno é possível resolver a equação diferencial (A.1) com uso de transformada de Fourier (TF). Assumindo que ν é a variável frequência usada na transformada de Fourier e C_ν é a transformada de Fourier de C , tem-se como solução da equação (A.1) a equação (A.2).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \rightarrow \quad \text{TF} \quad \rightarrow \quad \frac{\partial C_\nu}{\partial t} = D\nu^2 C_\nu(\nu, t) \quad (\text{A.1})$$

$$C_\nu(\nu, t) = C_\nu(\nu, 0)e^{-D\nu^2 t} \quad (\text{A.2})$$

Em que $C_\nu(\nu, 0)$ é a transformada de fourier da condição inicial.

$$C_\nu(\nu, 0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} C_0 \delta(x) e^{i\nu x} dx = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi}} \quad (\text{A.3})$$

Para encontrar a C basta aplicar a transformada inversa de fourier e tem-se:

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-D\nu^2 t} e^{i\nu x} d\nu. \quad (\text{A.4})$$

Sabendo que

$$\int_{-\infty}^{\infty} e^{-ax^2 - bx} dx = e^{-b^2/4a} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-au^2} du = e^{-b^2/4a} \sqrt{\frac{\pi}{a}}, \quad (\text{A.5})$$

tem-se

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2\pi} e^{-x^2/(4Dt)} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-D\nu^2 t + i\nu x + \frac{x^2}{4Dt}} d\nu \quad (\text{A.6})$$

e

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2\pi} e^{\frac{-x^2}{4Dt}} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-\left(\nu\sqrt{Dt} - \frac{ix}{2\sqrt{Dt}}\right)^2} d\nu. \quad (\text{A.7})$$

de modo que a solução final da segunda lei de Fick é igual a

$$C(x, t) = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{\frac{-x^2}{4Dt}} \quad (\text{A.8})$$

Apêndice B

Software de Análise

O método descrito neste trabalho, para determinar o coeficiente de difusão em meios isotrópicos e anisotrópicos, baseia-se no ajuste de perfis, de intensidades de luz de imagens de FRAP, com uma gaussiana ou uma função de Bessel modificada. Primeiramente Seiffert e Oppermann [15] elaboraram um software para determinar o coeficiente de difusão de moléculas em uma fase isotrópica por meio do ajuste gaussiano, equação (2.27), de valores de intensidades de luz de imagens de FRAP. Dobrint e colaboradores [52] reescreveram e introduziram algumas modificações no software de Seiffert e Oppermann [15], afim de poder ajustar os valores de intensidades de luz, dos perfis retirados da mancha de *photobleaching* de imagens de FRAP, com uso de uma gaussiana ou uma função de Bessel modificada, equação (2.35), sendo esta última mais adequada para processos de difusão anisotrópicos.

O software foi então novamente modificado e testado, com simulações de imagens de FRAP, por Andreas Schöppach, Cássio Alves e Emerson R. T. da Silva de modo que atualmente também possui uma interface gráfica de fácil manuseio. O ajuste dos dados experimentais usando a equação (2.27) ou a equação (2.35) é realizada pelo método dos mínimos quadrados buscando a minimização do funcional,

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{\left(y_i^{\text{exp}}(t) - y^{\text{teo}}(t) \right)^2}{\sigma_i^2}, \quad (\text{B.1})$$

em que $y_i^{\text{exp}}(t)$ é o valor médio experimental em cada pixel, $y^{\text{teo}}(t)$ é a curva média ajustada e σ_i^2 é a incerteza em cada pixel.

A versão do software de análise rescrita por Dobrint realizava os ajuste dos perfis de intensidade das manchas de *photobleaching* sem levar em consideração os erros estatísticos, σ_i^2 . Para levar em consideração os erros estatísticos o prof. Dr. Cristiano L. P. de Oliveira realizou uma nova versão do software levando em conta a propagação desses erros, de forma que na atual versão do software a minimização do funcional, equação (B.1), leva em consideração a incerteza em cada pixel. Nesta última versão, para cada perfil médio das imagens da mancha de *photobleaching* é possível obter o ajuste gaussiano, equação(2.27), ou da função Bessel modificada, equação (2.35) e neste último caso é utilizada a biblioteca Numerical Recipes [57].

Os processos de análise realizados na versão final do software são descritos na figura (B.1).

Figura B.1: Fluxograma de funcionamento do software de Análise. Em que N é o total de imagens e i é a i -ésima imagem.

Referências Bibliográficas

- [1] Xin-Jiu Wang and Qi-Feng Zhou. *LIQUID CRYSTALLINE POLYMERS*. World Scientific, 2004.
- [2] <http://micro.magnet.fsu.edu/index.html>, 06 2010.
- [3] F. Livolant and A. Leforestier. *Prog. Polym. Sci.*, 21:1115–1164, 1996.
- [4] T. E. Strzelecka and R. L. Rill. Phase transitions in concentrated dna solutions: Ionic strength dependence. *Macromolecules*, 24:5124–5133, 1991.
- [5] D. H. V. Winkle, M. W. DAVIDSON, W. Chen, and R. L. Rill. Cholesteric helical pitch of near persistence length dna. *Macromolecules*, 23:4140–4148, 1990.
- [6] P. C. Hiemenz and R. Rajagopalan. *Prnciples of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, New York, 3 edition, 1997.
- [7] L. Wang, M. M. Garner, and Hyuk Yu. Self-diffusion and cooperative diffusion of a rodlike dna fragment. *Macromolecules*, 24:2368–2376, 1991.
- [8] M. P. B. van Bruggen, H. N. W. Lekkerkerker, and J. K. G. Dhont. Long-time translational self-diffusion in isotropic dispersions of colloidal rods. *Physical Review E*, 56(4):4394–4403, 1997.
- [9] K.-S Chu and D. S. Moroi. Self-diffion in nematic liquid crystals. *Journal de Physique*, 36:C1–99–101, 1975.
- [10] H. Löwen. Anisotropic self-diffusion in colloidal nematic phases. *Physical Review E*, 59(2):1989–1995, 1999.
- [11] M. P. van Bruggen, H. N. W. Lekkerkerker, G. Maret, and J. K. G. Dhont. Long-time translational self-diffusion in isotropic and nematic dispersions of colloidal rods. *Physical Review E*, 58:7668, 1998.
- [12] M. P. Lettinga, E. Barry, and Z. Dogic. Self-diffusion of rod-like viruses in the nematic phase. *EUROPHYSICS LETTERS*, 71(4):692–698, 2005.
- [13] C. Carlsson, A. Larsson, M. Jonsson, Bo Albinsson, and B. NordCn. Optical and photophysical properties of the oxazole yellow dna probes yo and yoyo. *J. Phys. Chem*, 98:10313–10321, 1994.

- [14] S. Wilhelm, B. Grobler, M. Gluch, and H. Heinz. *Confocal Laser Scanning Microscopy - Principles*, carl zeiss edition.
- [15] S. Seiffert and W. Oppermann. Systematic evaluation of frap experiments performed in a blackwell publishing, ltd. confocal laser scanning microscope. *Journal of Microscopy*, 220:20–30, 2005.
- [16] S. Seiffert and W. Oppermann. Systematic evaluation of frap experiments performed in a confocal laser scanning microscope – part ii: Multiple diffusion processes. *Journal of Microscopy*, 230:353–362, 2008.
- [17] H. Löwen. Brownian dynamics of hard spherocylinders. *Physical Review E*, 50(2):1232–1243, 1994.
- [18] M. L. Sipski and T. E. Wagner. Probing dna quaternary ordering with circular dichroism spectroscopy: Studies of equine sperm chromosomal fibers. *Biopolymers*, 16(3):573–582, 1977.
- [19] Lukacs et al. Size-dependent dna mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.*, (275), 2000.
- [20] E. Dauty and A. S. Verkman. Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent dna mobility in cytoplasm a new barrier for non-viral gene delivery*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 280(4):7823–7828, 2005.
- [21] B. A. Scalettar, J. E. Hearst, and M. P. Klein. Frap and fcs studies of self-diffusion and mutual diffusion in entangled dna solutions. *Macromolecules*, 22:4550–4559, 1989.
- [22] T. Nicolai and M. Mandel. Dynamic light scattering by aqueous solutions of low molar mass dna fragments in the presence of nacl. *Macromolecules*, 22(1989):2348–2356.
- [23] S. A. Tatarkova and Berk D. A. Probing single dna mobility with fluorescence correlation microscopy. *Physical Review E*, 71(041913), 2005.
- [24] R. M. Jendrejack, D. C. Schwartz, M. D. Graham, and Pablo J. J. de. Effect of confinement on dna dynamics in microfluidic devices. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, 119(2):1165–1173, 2003.
- [25] B. Maier and J. O. Radler. Dna on fluid membranes: A model polymer in two dimensions. *Macromolecules*, 33:7185–7194, 2000.
- [26] F. Shen, R. R. Pompano, J. C. Kastrup, and Ismagilov R. F. Confinement regulates complex biochemical networks: Initiation of blood clotting by “diffusion acting”. *Biophysical Journal*, 97:2137–2145, 2009.
- [27] S. Mangenot, S. Keller, and J. Radler. Transport of nucleosome core particles in semidilute dna solutions. *Biophysical Journal*, 85:1817–1825, 2003.

- [28] Y. Han, A. M. Alsayed, M. Nobili, J. Zhang, T. C. Lubensky, and A. G. Yodh. Brownian motion of an ellipsoid. *Science*, 314:626–630, 2006.
- [29] P. Moreau, D Van Effenterre, L. Navailles, F. Nallet, and D. Roux. Confined diffusion of hydrophilic probes inserted in lyotropic lamellar phases. *The European Physical Journal E*, 26:225–234, 2008.
- [30] Y. Gambin, M Reffay, E Sierrecki, F. Hombl, R. S. Hodges, Nir S. Gov, Taulier N., and W. Urbach. Variation of the lateral mobility of transmembrane peptides with hydrophobic mismatch. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114:3559–3566, 2010.
- [31] A. S. Poulos, D. Constantin, P. Davidson, M. Imperor, P. Judeinstein, and B. Pansu. A pgse-nmr study of molecular self-diffusion in lamellar phases doped with polyoxometalates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010(114):220–227, 2010.
- [32] J. Mathéa, J-M Di Meglio, and B. Tinland. Diffusion of latex and dna chains in 2d confined media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322(1):315–320, 2010.
- [33] P. G. De Gennes and J. Prost. *The physics of Liquid Crystals.* ., Oxford, 2 edition, 1993.
- [34] E. Priestly. *Introduction to Liquid Crystals.* Springer, 1976.
- [35] Tirado M. M., C. L Martínez, and J. G. Torre. Comparison of theories for translational and rotational diffusion of rod-like macromolecules. application to short dna fragments. *J. Chem. Phys.*, 81:2047–2052, 1984.
- [36] S. Hess, D. Frenkel, and M. P. Allen. On the anisotropic of diffusion in nematic liquid crystals: test of a modified affine transformation model via molecular dynamics. *Molecular Physics*, 74(4):776–774, 1991.
- [37] A. S. Poulos, D. Constantin, P. Davidson, B. Pansu, E. Freyssingeas, A. Madsen, and C. Chanéac. Communications: Short-range dynamics of a nematic liquid-crystalline phase. *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, 132(091101), 2010.
- [38] C. K. Yun and A. G Fredricksen. Ii. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 12:73, 1970.
- [39] J. A. Janick and J.M. Janick. Ii. *Phys. Rev. Lett* 38a, 335, 1972.
- [40] M. P. Lettinga and E. Grelet. Self-diffusion of rodlike viruses through smectic layers. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, 99(197802), 2007.
- [41] S. F. Sun. *Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues* /. John Wiley Sons, New Jersey, 2004.
- [42] M. B. Jackson. *Molecular and Cellular Biophysics.* Cambridge, New York, 2006.

- [43] R. A. L. Jones. *Soft Condensed Matter*. Oxford University, 2002.
- [44] M. M. Tirado and J. G. Torre. Translational friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. application to circular cylinders. *J. Chern. Phys.*, 71(6), 1979.
- [45] Tirado M. M. and J. G. Torre. Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. application to circular cylinders. *J. Chern. Phys.*, 73(4), 1980.
- [46] T. Sato and A. Teramoto. Dynamics of stiff-chain polymers in isotropic solution: Zero-shear viscosity of rodlike polymers. *Macromolecules*, 24:193–196, 1991.
- [47] I. Teraoka and R. Hayakawa. Theory of dynamics of entangled rod-like polymers by use of a mean-field green function formulation. i. transverse diffusion. *Journal Chemical Physics*, 89(11):6989–6995, 1988.
- [48] T. Odijk. Translational friction coefficient of hydrodynamically screened rodlike macromolecules. *Macromolecules*, 19:2073–2074, 1986.
- [49] T. K. L. Meyvis, S. C. De Smedt, P. V. Oostveldt, and J. Demeester. Fluorescence recovery after photobleaching: A versatile toll for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharmaceutical Research*, 16(8):1153–1162, 1999.
- [50] A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsso, and Bo Albinsson. Characterization of the binding of the fluorescent dyes yo and yoyo to dna by polarized light spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:8459–8465, 1994.
- [51] Paul Heitjans and Jörg Kärger. *Diffusion in Condensed Matter. Methods, Materials, Models*. Springer-Verlag, Berlin, 2005.
- [52] J. Dobrindt and L. Navailles. Dna diffusion in concentrated aqueous solution and confined between lipid bilayers. Master’s thesis, University Bordeaux, 2006.
- [53] N. Cazalas, L. Navailles, and A. Fevrier. Formulation de systèmes complexes biologiques adn-phospholipides en milieux aqueux. Technical report, CRPP/ Université de Bordeaux, fevereiro 2010.
- [54] R. N. Bicev, Gerbelli B. B., and Oliveira E. A. Phase transitions in solutions of dna fragments. In *XXXIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada*, 2010.
- [55] C. Alves, E. R. T. Silva, and E. A. Oliveira. Diffusing measurements using a standard optical microscope. *ENFMC Conference Proceedings*, 2009.
- [56] T. E. Strzelecka and R. L. Rill. Phase transitions of concentrated dna solutions in low concentrations of 1:1 supporting electrolyte. *Biopolymers*, 30:57–71, 1990.
- [57] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery. *Numerical Recipes in Fortran 77*, volume 2. Cambridge, 1992.