ANA MARIA CARMONA-RIBEIRO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÕES
DE ANFIFÍLICOS SINTÉTICOS**

**Tese de Doutorado apresentada junto ao
Departamento de Bioquímica do Instituto
de Química da Universidade de São Paulo**

Orientador: Hernán Chaimovich

SÃO PAULO

1982

"... O homem é sempre a presa de suas verdades. Uma vez reconhecidas, não pode libertar-se delas. Um homem que se torna consciente do absurdo fica-lhe ligado para todo o sempre...

... impotente para realizar o transcendente, incapaz de sondar a profundidade da experiência.

... não traz nada de novo. Não encontrou nada na experiência a não ser a confissão da sua impotência, sequer um pretexto para inferir qualquer princípio satisfatório...

O nosso apetite de compreender, a nossa nostalgia do absoluto só são explicáveis na medida em que, justamente podemos compreender e explicar muitas coisas. É vão negar absolutamente a razão. Ela tem sua ordem na qual é eficaz. É a da experiência humana. Por isso mesmo queremos tornar tudo claro. Se o não conseguimos, se o absurdo nasce dessa ocasião, é justamente no encontro dessa razão eficaz mas limitada, e do irracional sempre renascente. As leis da natureza podem ser válidas até certo limite, passado o qual se voltam contra si próprias, a fim de fazerem nascer o absurdo. Ou ainda podem legitimar-se no plano da descrição, sem por isso serem verdadeiras no da explicação. O homem absurdo reconhece a luta, não despreza em absoluto a razão e admite o irracional. Cobre assim com o olhar todos os dados da experiência e está pouco disposto a saltar antes de saber. Sabe somente que nessa consciência atenta já não há lugar para a esperança..."

A. Camus.

AGRADECIMENTOS

Ao Hernan, por uma irrestrita compreensão da multiplicidade,

À Lenise, pelo estimulante companheirismo e pelas discussões (científicas ou não) sempre enriquecedoras,

Ao Sérgio, por minha iniciação no laboratório e por um exemplo vivo de dedicação ao trabalho e de criatividade,

À Cuccovia, por um senso crítico aguçado e por inúmeros favores objetivos,

Ao Araújo, pela disponibilidade do laboratório, pelas osmolaridades e pelos berros entusiastas,

À Shirley, por uma loucura solar que não deixa o juízo apodrecer,

Ao sangue novo do grupo (Leo, Lúcia, Valéria, Mercedes e Cida) pela felicidade de me tornarem um pouco necessária,

À Regina, Valdir, Dino e Carlos Eduardo pela alegria dos cafêzinhos,

À Maria Helena, pela extravagância que faltava ao grupo,

À Neusa, pelo capricho com que desempenha suas funções,

À Edjane e à Benê, respectivamente, pelo fornecimento de material e pelos cafêzinhos,

Ao Dr. Sesso e ao Hlio, pelas microscopias
eletrnicas,

 Laura, pela datilografia rpida e precisa,

 FAPESP, pelos proventos,

 Ana Carolina, por uma vontade ilimitada de
aprender e por ter me escolhido como orientadora,

Ao Jos Alberto, por Ana Carolina e por "otras
cositas mas"...

Atendendo a insistentes pedidos,

agradeço EM CARICATURA

Ao Hernan, pela abertura,

À Cuccovia, pela fechadura,

Ao Araújo, pela turbulência,

À Lenise, pela coerência,

As aprendizes (Lúcia, Valéria, Mercedes e Cida) pelo
tormento,

A todos pelo alento,

À FAPESP, pelo alimento,

ÍNDICE

	Págs .
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	22
1. Preparação de vesículas pequenas de DODAC	23
2. Preparação de lipossomos grandes de DODAC por vaporização de CHCl_3	23
3. Microscopia eletrônica de lipossomos grandes de DODAC	24
4. Determinações de volume do compartimento aquo- so interno	25
5. Determinações de radioatividade em amostras aquosas	26
6. Determinações de propriedades osmóticas	26
7. Determinações de transição de fase	28
8. Efeito da temperatura sobre v % e S	28
9. Determinações de permeabilidades relativas	29
10. Determinações de permeação de prótons	30
11. Preparação de lipossomos grandes de dicetil- fosfato de Na^+ (DCP)	36
12.	
RESULTADOS	38
1. Caracterização física de dispersões de DODAC ..	38
2. Caracterização funcional de dispersões de DODAC	41

	Págs.
2.1. Impermeabilidade à sacarose, incorporação e adsorção de sacarose	41
2.2. Permeabilidades relativas ao KCl	45
2.3. Propriedades osmóticas	52
2.4. Permeação de H^+ e/ou OH^-	64
2.4.1. Mudança de fluorescência da 2 ami- nopiridina	64
2.4.2. Mudança da absorbância de uma mis- tura de corantes indicadores de pH	71
3. Obtenção de lipossomos grandes de DCP	74
4. DISCUSSÃO	78
5. RESUMO	97
6. ABSTRACT	99
7. REFERÊNCIAS	101

INTRODUÇÃO

Membranas biológicas cumprem inúmeras funções simultaneamente : organizam moléculas em diferentes compartimentos, limitam microambientes adequados para funções vitais e controlam o transporte de várias substâncias, para citar alguns exemplos. Essa multiplicidade funcional, origina, naturalmente, alguns problemas para os investigadores do transporte em membranas. Por exemplo, pouco se pode verificar experimentalmente a respeito do agente ou agentes causais da diferença de potencial transepitelial medida através de uma pele de sapo (Carmona, 1979). A pele é abordada como uma "caixa preta" em relação à eletrogênese e modelos propostos teoricamente para explicar essa diferença de potencial são de difícil verificação experimental. Generalizando, a complexidade das membranas naturais vem dificultando verificações experimentais das inúmeras teorias até hoje desenvolvidas para o tratamento de potenciais transmembrana (Lakshminarayanaiah, 1974, 1975, 1979). A correlação estrutura-função é raramente possível justamente em decorrência da simultaneidade das múltiplas funções e da diversidade das inúmeras estruturas. Duas condições são necessárias para se descer a um nível molecular de investigação : 1) a simplificação estrutural e química do sistema ; 2) o isolamento de cada um dos fenômenos simultâneos.

Em termos de transporte, isso implicaria em controle das condições exteriores à membrana, da espécie

transportada e da própria estrutura físico-química da membrana que transporta. Nesse sentido, a investigação de fenômenos isolados em modelos de membrana resulta muito promissora. Potenciais transmembrana, continuando com o exemplo, tiveram algo de sua natureza esclarecido graças a estudos com modelos de membrana (Tien, 1974; 1976; 1979; Jain, 1972; Jain e Wagner, 1980).

Desde 1956, quando Teorell apresentou um modelo de perspex para demonstrar a aplicabilidade da Físico - Química ao estudo de membranas biológicas, inúmeros sistemas-modelo de membranas vêm sendo propostos (evidentemente, Teorell sabia que seu modelo não explicava propriedades tão fundamentais das membranas biológicas como uma seletividade de Na^+/K^+ da ordem de 30:1, uma condutância dependente da voltagem, uma difusão facilitada ou um transporte ativo). Robertson, em 1959, postulou a teoria universal da membrana unitária extensiva a todas as células e organelas. Mueller et al. (1962) descreveram uma técnica de preparação de modelos de membrana à partir das próprias moléculas constituintes das mesmas. Atualmente, a composição molecular quantitativa de uma grande variedade de membranas biológicas tais como, as de eritrócitos, mitocôndria, fragmentos de bordo em escova, bastonetes de retina e certas membranas plasmáticas é conhecida (Rouser et al., 1968). Lípidos extraídos dessas membranas podem ser utilizados para a preparação de diversos sistemas-modelo de membrana que permitem reproduzir, de forma selecionada e simplificada, alguns dos fenômenos que ocorrem em membranas naturais

(Gomperts, 1977). O modelo mais elementar de membrana é um filme monomolecular de lípidos como o de Gorter e Grendel (1925). Fosfolípidos em quantidades conhecidas extraídos de eritrócitos flutuam em uma superfície aquosa sendo confinados entre três lados fixos e um quarto lado móvel, uma espécie de barra flutuante, em um recipiente de Langmuir (Langmuir, 1920). Essa barra é movida no sentido de se confinar o material superficial numa área cada vez menor até que um filme monomolecular coerente se forme na superfície da água. Pode-se, assim, medir a força necessária para se manter o filme superficial. Nessas monocamadas, o empacotamento e as forças eletrostáticas superficiais de anfifílicos podem ser investigados. Todavia, o filme monomolecular se constitui apenas em um "modelo pela metade" muito embora venha sendo intensivamente estudado há mais de 60 anos (Davies et al., 1963; Gaines, 1966; Adam, 1968).

Do ponto de vista estrutural, uma solução mais adequada ao problema de "modelar" uma membrana plasmática é representada pelas bicamadas planas. Pincelando uma solução de fosfolípidos em solvente orgânico sobre um orifício de, aproximadamente, 1mm produz-se um filme fosfolipídico observável através de uma lupa (Mueller et al., 1962a; Mueller et al., 1962b; Mueller et al., 1963; Mueller et al., 1964). O filme afina espontaneamente à medida que o solvente difunde para as soluções aquosas nas quais foi parcialmente submerso até que se obtém a camada bimolecular que se caracteriza por um padrão de interferência destrutiva para a luz refletida, ou seja, pela cor preta. O arranjo físico

dessas bicamadas torna possível medir parâmetros elétricos das mesmas como : capacitância, condutividade, voltagem, potenciais de membrana e ainda, voltagens de ruptura, a qual ocorre tipicamente em torno de 200 mV (Haydon, 1968; Henn e Thompson, 1969). Transporte seletivo de íons ou moléculas neutras também pode ser convenientemente estudado nas BLM ("black lipid membranes") com o auxílio de marcadores radioativos. A velocidade de permeação de não-eletrólitos polares através das BLM mostrou ser apreciavelmente menor que a da água (Jain, 1972; Tien, 1974). Em flagrante contraste com as membranas biológicas, permeabilidades iônicas resultaram acentuadamente baixas (Jain, 1972), resistências elétricas extremamente altas, diferenças de potencial lineares com a corrente aplicada e seletividade entre cátions praticamente nula (Mueller et al., 1962b; Mueller et al., 1964; Mueller e Rudin, 1969; Cole, 1968). A razão para essa disparidade de comportamento em relação às membranas biológicas parece ser a ausência de vias moleculares paralelas à barreira resistiva como os poros (canais preenchidos por água) ou os ionóforos, capazes de regularem fluxo de íons. Outro problema do modelo é o solvente orgânico alterando capacitância e espessura da bicamada. Ao se utilizar uma série homóloga de hidrocarbonetos parafínicos como solventes de lecitina, a capacitância aumenta e a espessura diminui à medida que o número de carbonos do solvente aumenta (Fettiplace et al., 1971). Com o aumento do número de carbonos, aumenta a retenção do solvente na bicamada com o conseqüente aumento da capacitância e diminuição da espessura. Haja visto que

a bicamada plana pode ser pensada como um capacitor plano infinito cuja capacitância é função inversa da distância entre as placas, ou seja, da espessura da bicamada e função direta da constante dielétrica do meio entre as placas (Tien, 1974) .

O problema representado pelo solvente na bicamada foi solucionado com a formação de bicamadas planas em ausência de solvente e pela simples aposição de duas monocamadas (Montal e Mueller, 1972) . Essa bicamada é idêntica à membrana celular quanto a parâmetros como espessura e capacitância mas ainda bastante divergente quanto a parâmetros como resistência e condutância. Permite, todavia, uma possibilidade nova e ainda bastante inexplorada : a formação de bicamadas com proteínas inseridas, o que representa um passo bastante significativo no caminho da reconstituição de características isoladas de membranas naturais em sistemas artificiais.

Lipossomos provavelmente aproximam-se mais das estruturas prébióticas primitivas que, pela primeira vez, permitiram a compartimentalização (Goldacre, 1958) . Lipossomos são compostos por múltiplas lamelas fechadas e concêntricas de fosfolípidos (Luzzati e Husson, 1962; Stoeckenius, 1962; Bangham e Horne, 1964; Bangham et al., 1965; Bangham, 1968) . Podem ser formados por vários métodos. Preparações obtidas por agitação de um filme lipídico fino (Bangham et al., 1965; Kinsky, 1974), originalmente introduzidas por Bangham et al. (1965), têm sido utilizados para se medir parâmetros de permeabilidade de vários íons e moléculas (Bang

ham, 1968). Preparações obtidas por dispersão ultrasônica do lípide seguida de filtração em gel têm permitido a obtenção de populações uniformes compostas de apenas uma bicamada lipídica fechada (Huang, 1969). O método de agitação de Bangham é simples mas produz estruturas multilamelares de uma grande variedade de tamanhos. Como a maior parte do lípide está presente na forma multilamelar, o volume sequestrado por mol de lípide (eficiência de incorporação) é relativamente baixo. O método de sonicação seguido de filtração em gel (Huang, 1969) produz vesículas uniformes e compostas de bicamadas únicas mas muito menores -250 Å de diâmetro - que a maioria das estruturas biológicas. O método de injeção de solução etanólica do fosfolípide em solução aquosa (Batzri e Korn, 1973; Kremer et al., 1977) produz vesículas similares em tamanho às preparações obtidas por ultrassom mas possui uma desvantagem : a presença do álcool na preparação. Métodos mais recentes envolvendo a extrusão de lipossomos através de membranas de policarbonato (Olson et al., 1979; Szoka et al., 1980) ou a introdução de um tampão aquoso em uma solução de lípide em éter (Szoka e Papahadjopoulos, 1978; Schieren et al., 1978) produzem lipossomos de tamanho mais definido que os de Bangham et al. (1965) mas requerem equipamento especial. Métodos mais elaborados de produzir vesículas unilamelares pequenas (150-500 Å de diâmetro) como a diluição de micelas constituídas por detergente e fosfolípide por filtração em gel ou diálise (Razin, 1972; Brunner et al., 1976; Rhoden e Goldin, 1979; Zumbuehl e Weder, 1981) ou a injeção de uma dispersão lipídica atra

vés de um pequeno orifício de uma prensa "French press" (Barenholz et al., 1977, 1979; Hamilton et al., 1980), apesar de evitarem a degradação que pode ocorrer durante a dispersão por ultrassom (Huang, 1969) ou introduzem detergentes no sistema ou também requerem equipamento especial.

Um método ideal de produzir lipossomos deveria resultar em vesículas de tamanho uniforme, seria aplicável à maioria das misturas de lípidos e incorporaria eficientemente íons, metabólitos e moléculas de elevado peso molecular. O diâmetro das vesículas deveria estar na faixa de 0,1 a 1,0 micra para se assemelhar às membranas plasmáticas e resultar em elevada eficiência de incorporação. Lipossomos predominantemente unilamelares do tamanho de microsossomos (0,1-1,0 micra de diâmetro) foram obtidos por vários métodos : injeção de solução etérea dos lípidos em soluções aquosas aquecidas acima da temperatura de ebulição do éter (Deamer e Bangham, 1976; Deamer, 1978; Shieren et al., 1978), inchamento lento de um filme lipídico (Reeves e Dowben, 1969, 1970), inchamento lento de proteína contendo filme lipídico (Darszon et al., 1980) e a remoção da fase orgânica sob pressão reduzida em microemulsões "água em óleo" de lípidos e tampão : evaporação de fase reversa (Szoka e Papahadjopoulos, 1978). Esses métodos permitem a incorporação de macromoléculas nos lipossomos mas apresentam também desvantagens como a dificuldade de se controlar a velocidade de injeção ou de hidratação ou a exposição do material a ser encapsulado a solventes orgânicos.

Quanto ao princípio geral que orienta a forma-

ção dos lipossomos e a associação das moléculas lipídicas, Tanford (1980) aponta a predominância das interações hidrofóbicas entre as cadeias hidrocarbônicas dos lipídeos sobre a repulsão eletrostática e/ou estérica entre as cabeças polares como o fator principal.

Modelos estruturais adequados para os lipossomos devem considerar interações cauda-cauda, cabeça - cabeça e cabeça-cauda. O modelo de Marcelja (Marcelja, 1974a;1974b) leva em conta todas as forças físicas atuantes entre as moléculas que constituem a bicamada lipossomal : a energia intramolecular da cadeia, as atrações intermoleculares de van der Waal's entre as cadeias vizinhas e ainda, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e estéricas. A partir desse modelo, parâmetros de ordem para cada segmento carbônico da cadeia alquila podem ser calculados (Schindler e Seelig, 1975) e comparados com os parâmetros de ordem determinados por ressonância magnética nuclear de deutério em lípides deuterados seletivamente (Seelig e Seelig, 1974). As coincidências entre os parâmetros calculados e os determinados experimentalmente sugerem que o modelo de Marcelja é adequado para descrever as estruturas dos lipossomos. Topologia e dinâmica de lípides em membranas foram recentemente revistas na literatura (van Deenen, 1981; Israelachvili et al., 1980; Buldt e Wohlgemuth, 1981; Seelig e Seelig, 1980).

Com base em argumentos geométricos, a formação de lipossomos parecia requerer moléculas contendo duas cadeias alquila sendo que moléculas com apenas uma cadeia alquila associavam-se somente na forma micelar (Israelachvili

et al., 1976). Todavia, vesículas estáveis constituídas por anfifílicos de cadeia única já foram obtidas (Hargreaves e Deamer, 1978; Okahata e Kunitake, 1980). Assim, a formação de uma bicamada estável é um fenômeno complexo ainda pouco compreendido.

Um aspecto comum a todos os fosfolípides de membrana é a existência de uma transição reversível dependente de temperatura em que as cadeias hidrocarbônicas do fosfolípide passam de um estado ordenado, cristalino para um estado mais fluído e desordenado (Sturtevant, 1974; Lee, 1977a, 1977b). A temperatura em torno da qual essa transição ocorre é a chamada temperatura de transição de fase (T_c). Abaixo da T_c , os lípides encontram-se em um estado altamente ordenado, com as cadeias alquila em conformação "trans". Acima da T_c , passam ao estado líquido-cristal consequente de rotações "gauche" e da formação de "kinks" e caracterizado por uma fluidez bem maior que a do estado gel (Lee, 1977a). A transição da fase gel para a líquido-cristal tem sido observada através de diversos métodos como ressonância magnética nuclear, ressonância magnética eletrônica, espectroscopia Raman, difração de raios X, calorimetria diferencial, determinação de viscosidade, espalhamento de luz e medição de índices de refração (Lee, 1977a; 1977b).

Lecitinas hidratadas sintéticas (dimiristoil e dipalmitoil-lecitina) passam por duas transições térmicas : uma pré-transição numa faixa de temperatura relativamente larga e de baixa entalpia seguida de uma transição abrupta e de entalpia bem maior (Chapman, 1975). Embora a mudança

de estrutura associada à transição principal seja relativamente conhecida (Chapman, 1967, 1976; Luzzati, 1968a, 1968b; Ladbrooke e Chapman, 1969; Sheetz e Chan, 1972; Suurkuusk et al., 1976), a natureza da pré-transição ainda é controversa.

Janiak et al. (1976, 1979) investigaram sistematicamente o comportamento de lecitinas sintéticas em função da temperatura através de difração de raios X e de calorimetria diferencial com o objetivo de caracterizar as estruturas associadas à pré-transição. Propuseram que, abaixo da pré-transição, as cadeias hidrocarbônicas estariam completamente estendidas e inclinadas em relação ao plano da bicamada. Com o aumento da temperatura haveria uma diminuição desse ângulo de inclinação até uma inclinação mínima correspondente à temperatura de pré-transição, estando a bicamada distorcida por ondulações periódicas. Outros autores mostram, através de ressonância magnética nuclear de deutério ou de prótons, que a cabeça polar pode se rearranjar na pré-transição (Salsbury et al., 1971; Oldfield et al., 1971; Sheetz e Chan, 1972). Dados mais recentes, todavia, indicam que a cabeça polar não se rearranja durante a pré-transição (Gally et al., 1975). Estudos de fluorescência (Jacobson e Papahadjopoulos, 1975) mostram que a pré-transição altera significativamente o arranjo das cadeias alquila. Recentemente, Takemoto et al. (1981) obtêm pré-transição em lipossomos multilamelares mas não a obtêm em unilamelares sugerindo que a pré-transição estaria relacionada às interações entre as bicamadas concêntricas de cada lipossomo (multilamelares).

Assim, alterações de estrutura lipossomal decorrentes de variação de temperatura estão apenas parcialmente definidas. Alterações funcionais de lipossomos por efeito de temperatura serão discutidas após a apresentação das propriedades funcionais dos lipossomos a dada temperatura.

Do ponto de vista funcional, lipossomos permitem a obtenção de cinéticas de transporte de várias substâncias, medindo-se a taxa de aparecimento de um marcador radioativo no meio externo (Bangham et al., 1965; Papahadjopoulos et al., 1971). Podem ser formados em uma solução aquosa contendo o marcador radioativo e, em seguida, centrifugados, filtrados em gel ou dializados para separação entre marcador livre e marcador incorporado.

A base de um outro método de medição de permeabilidades relativas de lipossomos a vários solventes é o inchamento ou encolhimento lipossomal em decorrência de gradientes osmóticos previamente estabelecidos (Bangham et al., 1967; Katchalsky e Curran, 1967; Sogor e Zull, 1975). Alterações na absorbância devidas a alterações nas propriedades de espalhamento de luz de suspensões de fosfolípides em água são inversamente proporcionais ao volume englobado pelos lipossomos (Rendi, 1965, 1967; Bangham et al., 1967). Através desse método, permeabilidades relativas de lipossomos constituídos por lecitina e ácido fosfatídico (96:4) puderam ser estimadas (Bangham et al., 1967) para várias substâncias neutras ou iônicas. Em relação ao movimento de não eletrólitos (glicose, sacarose, eritritol, malonamida, uréia,

propionamida, glicerol, etc.) a ordem de permeabilidades foi semelhante à de eritrócitos, o que pode ser encarado como a primeira indicação de que lipossomos de fosfolípides podiam mimetizar uma membrana biológica em um aspecto funcional importante. Entretanto, quanto ao movimento de eletrólitos, preparações de lipossomos não resultaram mimetizadoras tão adequadas, uma vez que se mostraram impermeantes a vários sais (NaCl, KCl, NaAc)!. Fluxos de $^{42}\text{K}^+$, por exemplo, são muitas ordens de magnitude inferiores aos que ocorrem através da maioria das membranas celulares (Bangham et al., 1965; Papahadjopoulos e Watkins, 1967). Além disso, uma das maiores limitações dos lipossomos como modelos é a impossibilidade de serem feitas medidas elétricas diretas (Waggoner, 1976; Kornberg et al., 1972; Cafiso e Hubbell, 1978; Lelkes, 1979) como as que são possíveis em bicamadas planas (Tien, 1974, 1976, 1979; Jain, 1972; Jain e Wagner, 1980). Resultam, todavia, bem adaptados para o estudo de interações entre lamelas de fosfolípides e proteínas em sistemas aquosos (Litman e Thompson, 1967) e mimetizam fenômenos celulares importantes como a adesão célula-célula e a fusão. Para citar um exemplo, recentemente foi descrito em nosso laboratório um modelo eficiente de fusão constituído por vesículas de lecitina e albumina a pH 3,5 (Schenkman et al., 1981a, 1981b; Schenkman, 1981).

Um íon particularmente importante cuja permeação vem sendo estudada através de vários sistemas modelos de membrana é o H^+ . Gradientes de prótons ocorrendo através de membranas biológicas desempenham papel intermediário em

grande número de processos celulares como síntese de ATP, controle da divisão celular, manutenção de compartimentos ácidos essenciais para atividade proteolítica de enzimas lisossomais e armazenamento de catecolaminas em vesículas de secreção (Gerson, 1978; Gillies e Deamer, 1979; Racker, 1972; Burton, 1975; Gerson e Burton, 1977; Gillies e Deamer, 1979; Mitchell, 1966; Jagendorf, 1975; Pick et al., 1974; Henning, 1975; Johnson e Scarpa, 1976; Toll e Howard, 1978).

Em organelas isoladas como mitocôndrias e cloroplastos esses gradientes são quantificáveis através de marcadores apresentando alguma propriedade mensurável variante com o pH como emissão de fluorescência ou absorção de um dado comprimento de onda (Rottenberg, 1979). Todavia, o maior problema metodológico que existe na utilização de marcadores é a interação marcador-membrana que varia com as condições experimentais. Além disso, dificilmente pode-se aplicar essas técnicas a sistemas reconstituídos nos quais o volume do compartimento aquoso interno é geralmente muito menor que o volume interno típico de organelas (Watts et al. 1978).

Recentemente, alguns autores mediram permeabilidades a H^+/OH^- em vesículas unilamelares grandes de fosfolípidos (Nozaki e Tanford, 1981; Nichols et al., 1980; Nichols e Deamer, 1980) obtidas por injeção de solução de fosfolípide em éter (Deamer e Bangham, 1976) ou por remoção de detergente em soluções micelares mistas de fosfolípide e octilglicosídeo (Mimms et al., 1981). Chegaram, entretanto, a conclusões bastante divergentes. Nozaki e Tanford (1981)

obtiveram permeabilidades cinco ordens de magnitude abaixo da obtida por Nichols e Deamer (1980), ou seja, permeabilidades a H^+/OH^- comparáveis às obtidas para outros cátions e ânions pequenos. Concordando com Nichols e Deamer (1980), Clement e Gould (1981) obtiveram permeabilidades elevadas a H^+ em vários tipos de vesículas fosfolipídicas (vesículas sonicadas de fosfatidilcolina, lipossomos multilamelares de asolectina e vesículas de asolecitina preparadas por diluição de detergente (Racker, 1973; Racker e Hinckle, 1974)). Por outro lado, Gutknecht e Walter (1981) chegaram a conclusões bastante similares às de Nozaki e Tanford (1980) à partir de estudos com bicamadas fosfolipídicas planas contendo decano. Uma vez que a própria ordem de grandeza da permeação de H^+ em bicamadas fosfolipídicas é ainda bastante controversa, a grande multiplicidade de mecanismos propostos na literatura para essa permeação é compreensível. Clement e Gould (1980) demonstraram uma cinética bifásica para a acidificação do compartimento aquoso interno após uma rápida queda do pH externo e interpretaram a etapa rápida como devida a um influxo rápido de H^+ eletricamente não compensado e a etapa lenta como devida a um influxo de H^+ eletricamente compensado por saída de um cátion, supostamente o K^+ . Nichols et al. (1980), com base na elevada permeabilidade de bicamadas fosfolipídicas à água (Bangham et al., 1967; Hanai e Haydon, 1966; Cass e Finkelstein, 1967) e na presença de água na bicamada (Schatzberg, 1965; Black et al., 1948; Bonner e Choi, 1975; Menger et al., 1978), propuseram transferência de H^+/OH^- ao

longo de séries de moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio através de rearranjo dessas pontes. Prótons ou hidroxilas ou ambos interagiriam com aglomerados dessas moléculas ligadas de água na bicamada lipídica de forma a serem transferidas através da bicamada por rearranjos de pontes de hidrogênio, analogamente ao transporte de H^+/OH^- em água e no gelo. Nozaki e Tanford (1981) sugerem que a permeabilidade aparente medida através de efluxo de H^+ em vesículas unilamelares grandes de fosfolípides seria a soma das contribuições do movimento de H^+ e da espécie não carregada (HCl ou HNO_3) em equilíbrio com o ânion da solução. A contribuição dominante seria a devida à espécie não carregada e o coeficiente de permeabilidade ao H^+ per se não seria maior que o usualmente obtido para outros cátions pequenos. Assim, o transporte resultante de prótons se daria principalmente por moléculas neutras de ácido (e.g., HCl) através da membrana e não, por difusão de H^+ per se. Todavia, outros autores (Clement e Gould, 1981), utilizando ácidos de ânions impermeantes como o H_2SO_4 , mostraram que alterações do pH intravesicular totalmente análogas às decorrentes de alteração do pH externo com ácidos de ânions permeantes (HCl, por exemplo) eram obtidas demonstrando que a permeação de prótons não poderia ser atribuída principalmente a fluxos eletroneutros de HCl. Assim, em meio a toda essa controversia em torno da permeação de H^+ , sistemas sintéticos artificiais como o constituído por moléculas de DODAC (Cloreto de dioctadecildimetilamonio), por exemplo, seriam particularmente promissores, visto que permitiriam estudar implica-

ções de carga superficial e de estrutura química sobre a permeação.

Efeitos de temperatura sobre as propriedades de barreira de lipossomos vêm sendo verificados principalmente através de determinações de permeação de substâncias neutras ou iônicas. Em torno da T_c , as características de barreira das membranas lipídicas são profundamente alteradas (Ladbrooke e Chapman, 1969; Vaughan e Keough, 1974; Steim et al., 1969; Martonosi, 1974; Verkleij et al., 1974). Estudos com lecitinas saturadas sintéticas mostraram que bicamadas de dimiristoilfosfatidilcolina são excelentes barreiras tanto acima quanto abaixo da transição de fase tornando-se, entretanto, altamente permeantes a íons em torno da T_c (Haest et al., 1972; Blok et al., 1976). Um máximo de permeabilidade ao Na^+ foi observado por Papahadjapoulos, et al. (1973) no ponto médio da transição de fase. Van Dijck et al. (1975) observaram um máximo de vazamento de K^+ em lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina coincidente com o único do pico de absorção de calor correspondente à transição de fase registrado por calorimetria diferencial. Blok et al. (1976) mostram um drástico aumento da velocidade de permeação de água e de glicose em torno da T_c . Todos esses autores interpretam as alterações de permeabilidade como decorrentes da coexistência de duas fases durante a transição, o que levaria à formação de poros estatísticos ou de regiões de desordem nos limites entre os domínios sólidos e líquidos por onde a permeação seria facilitada.

O fato de se procurar mimetizar funções de mem

brana em sistemas artificiais conduziu não apenas a uma melhor compreensão dessas funções como também a sistemas novos que se prestaram a estudos em várias outras áreas como fotoquímica, transdução de energia e catálise de reações químicas. Vesículas formadas a partir de detergentes sintéticos são passíveis de serem investigadas sob vários aspectos. Bicamadas fechadas foram obtidas por Gebicki e Hicks (1973, 1976) por agitação de filmes finos de ácido oleico e linoleico em tampões aquosos; resultaram, todavia, instáveis a pH's fora da faixa 6-8, não se concentraram por centrifugação e não retiveram substratos. Hargreaves e Deamer (1978) reportaram a formação de vesículas a partir de anfifílicos de cadeia única com 8 a 18 carbonos que se mostraram estáveis em uma faixa ampla de pH's, comportaram-se como osmômetros ideais e encapsularam solutos. Haletos de dialquildimetilamonio (Kunitake et al., 1977; Kunitake e Okahata, 1977a; Deguchi e Mino, 1978; Kunitake e Okahata, 1977b; Kunitake e Sakamoto, 1978; Nagamura et al., 1978; Kajiyama et al., 1979; Henglein et al., 1978; Czarniecki, 1979; Cuccovia et al., 1979), dialquifosfato de sódio (Mortara et al., 1978), sulfonato, carboxilato (Kunitake e Okahata, 1978) e ainda detergentes zwitteriônicos (Kunitake e Yamada, 1978) também formam estruturas vesiculares.

A formação de vesículas e não, de estruturas lamelares, parece depender tanto da natureza do detergente quanto do comprimento da cadeia alquila. Brometos de didodecildialquilamonio, didodecil e dioctadecilsulfonatos, decil e didodecilmfosfatos formam vesículas ao passo que seus

homólogos de cadeia mais longa formam estruturas lamelares (Kunitake et al., 1977; Kunitake e Okahata, 1978).

O método mais comumente utilizado para a formação de vesículas de detergente consiste na dispersão ultrassônica do mesmo (Kunitake et al., 1977; Kunitake e Okahata, 1977; Deguchi e Mino, 1978; Mortara et al., 1977; Kunitake e Okahata, 1978; Okahata e Kunitake, 1979; Kunitake et al., 1979; Czarniecki e Breslow, 1979; Sudhölter et al., 1980; Kunitake e Okahata, 1980; Okahata e Kunitake, 1980; Murahami et al., 1980; Baumgartner e Fuhrhop, 1980; Regen et al., 1980; Hub et al., 1980; Tundo et al., 1981; a, b, c, d; Akimoto et al., 1981; O'Brien et al., 1981; Bader et al., 1981; Regen et al., 1981; Kunitake et al., 1980a, b; Nagamura et al., 1981). Assim, em decorrência do método de formação, a maior parte das vesículas obtidas são vesículas pequenas (250-300 Å de diâmetro). Curiosamente, ainda não foram testados outros métodos disponíveis que resultassem na formação de vesículas grandes de detergente. Além disso, talvez em decorrência da inexistência desse tipo de sistema-modelo (vesículas grandes de detergente), a caracterização do sistema modelo existente (vesículas pequenas) em termos de propriedades funcionais de membrana como transporte de íons e substâncias neutras, incorporação de vários substratos, manutenção de gradientes eletroquímicos de várias substâncias e outras ou em termos de propriedades físicas como transição de fase, forma, dimensões, homogeneidade ou heterogeneidade da população, estabilidade frente a pH e a sais e outros, ainda é completamente deficiente. As caracterizações

de vesículas de detergente existentes na literatura são extremamente pobres quando comparadas às existentes para vesículas de fosfolipídeos. Basta mencionar que a maioria dos trabalhos de caracterização de vesículas de detergente apresenta apenas uma micrografia eletrônica dos mesmos (Kunitake et al., 1977; Kunitake e Okahata, 1977; Deguchi e Mino, 1978; Okahata e Kunitake, 1979; Kunitake et al., 1979; Sudhölter et al., 1980; Okahata e Kunitake, 1980; Murakami et al., 1980; Baumgartner e Fuhrhop, 1980; Regen et al., 1980; Hub et al., 1980; Akimoto et al., 1980; O'Brien et al., 1981; Kunitake et al., 1980a, b) sendo que uma minoria inclui também dados de resposta osmótica (Gebicki e Hicks, 1976), de incorporação de substrato (Gebicki e Hicks, 1976; Mortara et al., 1978; Tundo et al., 1981a, b, c, d; Regen et al., 1981), de calorimetria diferencial (Kunitake e Okahata, 1980) e de filtração em gel (Mortara et al., 1978; Tundo et al., 1981a, b, c, d).

O sistema-modelo constituído por vesículas pequenas de detergente que, aparentemente, é o sistema mais investigado e melhor caracterizado é o sistema composto pelo cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC) (Fendler, 1980). Essas vesículas obtidas por dispersão ultrasônica apresentariam as seguintes propriedades : 1) seriam maiores que as vesículas de fosfatidilcolina obtidas por ultrasom e teriam $300 \text{ \AA}$ de diâmetro (Deguchi e Mino, 1978; Herrmann e Fendler, 1979); 2) apresentariam uma pré-transição a 30°C e uma transição a 36°C (Kano et al., 1979); 3) seriam osmoticamente ativas mas instáveis em presença de KCl a partir de $0,1\text{M}$

(Kano et al., 1979); 4) reteriam aminoácidos zwitteriônicos em seu interior com um mínimo de vazamento (Tran et al., 1978); 5) seriam estáveis em ampla faixa de pH's (2,0-12,0) (Fendler, 1980). Partindo dessas características, vesículas de DODAC obtidas por ultrassom seriam mimetizadores de membranas relativamente adequados. Todavia, a caracterização detalhada das propriedades funcionais e dinâmicas do sistema, ou seja, a determinação de permeabilidades do sistema a várias substâncias neutras ou iônicas seria ainda de importância fundamental para se poder decidir sobre a validade do modelo como mimetizador de membrana.

Desde 1978, nosso grupo vem se preocupando com vesículas de DODAC, principalmente sob o ponto de vista catalítico (Cuccovia et al., 1979, 1982). Várias incongruências com a literatura vêm, desde então, sendo observadas. Politi, por exemplo, verificou pronunciada instabilidade dessas vesículas frente a pH's básicos (dados não publicados). Cuccovia, observou precipitação das mesmas em faixas de concentração de KCl muito inferiores à reportada por Fendler (0,1M). Finalmente, neste trabalho, mostramos que vesículas de DODAC obtidas por ultrassom são osmoticamente não responsivas a gradientes de sacarose e que a presença de sal em concentrações tão baixas quanto 10-15 mM é crítica para a estabilidade do sistema.

Este trabalho, que tinha inicialmente o objetivo de estudar transporte e permeação de substâncias neutras ou iônicas em vesículas de DODAC obtidas por ultrassom, terminou por demonstrar a inadequação dessas últimas para tal

tipo de estudo e por propor um novo sistema-modelo no qual propriedades funcionais podem ser convenientemente estudadas : o sistema constituído por vesículas grandes de DODAC. Essas vesículas possuem $0,51\mu$ de diâmetro externo médio, são capazes de incorporar $9,7 \pm 1,3$ l/mol, comportam-se como osmômetros em várias condições e possuem uma transição de fase gel para líquido-cristal extremamente nítida. Em contraste com o sistema constituído por vesículas sonicadas, vesículas grandes de DODAC são propostas como um modelo sintético adequado de membrana. Adicionalmente, extendendo-se o método de obtenção de vesículas grandes de DODAC por injeção de solução clorofórmica desse detergente em água, foram obtidas vesículas grandes de dicetilfosfato de Na^+ . Dessa forma, abrem-se perspectivas de estudos de transporte de vários substratos em sistemas sintéticos adequados (aqueles apresentando eficiências elevadas de incorporação) e torna-se possível aplicar métodos disponíveis para fosfolípidos em sistemas modelo constituídos por anfifílicos sintéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

A purificação e análise (Cuccovia et al., 1979) do Herquat 2HT-75 (Herga Indústrias Químicas do Brasil) resultou em uma mistura de sais de amônio quaternário com a seguinte composição com relação ao comprimento das cadeias alquila : 85% n-Cl₈, 15% n-Cl₆ e traços de n-Cl₄. Assim, vamos nos referir a essa mistura como DODAC (cloreto de dioctadecildimetilamonio) dado o elevado percentual deste componente na mesma.

Sephadex G-25 (fine) foi proveniente da Sigma (St. Louis, Mo.).

(¹⁴C)-sacarose (Schwarz-Mann, Orangeburg, N.Y., atividade específica de 480 mC/mM) teve sua pureza radioquímica controlada através de cromatografias em papel Whatmann nº 1 utilizando-se n-butanol/etanol/água (52 : 32 : 16) como fase móvel. R_fs obtidos corresponderam ao valor fornecido pela Schwarz-Mann : 0,19.

Todos os outros reagentes utilizados possuíam grau analítico de pureza. Água deionizada, destilada duas vezes em vidro foi usada em todos os experimentos.

Concentrações de DODAC foram determinados por microtitulações de Cl⁻ de acordo com o processo descrito por Schales e Schales (1949).

1. PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS PEQUENAS DE DODAC.

Vesículas pequenas de DODAC foram preparadas por sonicação, a temperaturas entre 60-80°C, de 60mg de DODAC em 10 ml de solução aquosa usando-se a sonda de um Cell Disrupter Virsonic - Model 150 operado a 90W nominais durante 10 minutos. A dispersão assim obtida foi centrifugada (50 min.; 10000g; 22°C) para se precipitar partículas de titânio liberadas pela sonda durante a sonicação. O sobrenadante corresponderá à preparação referida como vesículas sonicadas de DODAC.

2. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMOS GRANDES DE DODAC POR VAPORIZAÇÃO DE CHCl₃.

O método de vaporização de éter descrito por Deamer e Bangham (1976) para obtenção de vesículas unilamelares grandes de fosfolipídeos foi adaptado para o DODAC. 1,0 ml de uma solução 0,02M de DODAC em clorofórmio foi injetado a uma velocidade aproximada de 0,2ml/min. em 4,0ml de uma solução aquosa termostatizada a 70,0 ± 0,5°C e borbulhada com argônio para se facilitar a vaporização do clorofórmio. A montagem experimental é mostrada na Figura 1. Alíquotas (1ml) da dispersão assim obtida foram filtradas através de uma coluna de Sephadex G-25 (1,8 X 14,0cm) previamente saturada com essa mesma dispersão de DODAC. Apenas recuperações de DODAC superiores a 90% foram consideradas. Frações eluídas juntamente com o volume vazio dessas colunas serão referidas como

lipossomos grandes de DODAC. A análise quantitativa de clorofórmio nos lipossomos grandes de DODAC (Snell e Snell, 1937) revelou porcentagens de CHCl_3 inferiores a 0,5 mol % ($100 \times \frac{n^\circ \text{ de moles de } \text{CHCl}_3}{n^\circ \text{ de moles de } \text{CHCl}_3 + n^\circ \text{ de moles de DODAC}}$).

FIGURA 1 - Montagem experimental para preparação de lipossomos grandes de DODAC. A injeção da solução clorofórmica é feita através de uma agulha hipodérmica fina. A solução aquosa é mantida aquecida e agitada durante e logo após a injeção.

3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE LIPOSSOMOS GRANDES DE DODAC.

Volumes iguais de molibdato de amônio 2% ou acetato de uranila 1% e lipossomos grandes de DODAC foram colocados sobre telas de cobre recobertas com um filme de parلودio. Com auxílio de uma lupa e de um papel de filtro, 30 segundos após a mistura dos lipossomos com o corante eletrôni-

co, o excesso de líquido sobre a tela foi retirado. Uma vez evaporada toda a água, a tela foi observada ao microscópio eletrônico (Zeiss - EM 952, operado a 60 kV) em diversos aumentos e fotografada.

4. DETERMINAÇÕES DE VOLUME DO COMPARTIMENTO AQUOSO INTERNO (V).

Dispersões de DODAC (vesículas sonicadas ou lipossomos grandes) foram preparadas em água contendo (¹⁴C)-sacarose. Aliquotas dessas preparações (V_A ml de uma dispersão contendo n milimoles de DODAC) foram filtradas através de uma coluna de Sephadex G-25 (1,8 X 14,0cm). A partir dos perfis de eluição (ver Fig. 11A em "Resultados", para um exemplo) pôde ser calculada uma porcentagem de incorporação (% inc.) igual a

$$\% \text{ inc.} = \frac{\text{CPM (Vo)}}{\text{CPM (Vi)}} \times 100 \quad (1)$$

onde CPM (Vo) é a radioatividade eluída em torno do volume vazio Vo e CPM (Vi) é a radioatividade eluída em torno do volume interno Vi da coluna. Assim, se 100ml de dispersão incorporam % inc. então V_A ml irão incorporar $\frac{V_A \times \% \text{ inc.}}{100}$

em n milimoles de DODAC. Portanto, o volume incorporado por mol de DODAC será :

$$V = \frac{V_A \times \% \text{ inc.}}{100} \times \frac{1}{n} \quad (2)$$

Introduzindo (1) em (2), temos :

$$V = \frac{V_A}{n} \times \frac{\text{CPM (Vo)}}{\text{CPM (Vi)}} \quad (3)$$

Como n/V_A é a concentração de DODAC na amostra colocada no topo da coluna, o volume do compartimento aquoso interno V , em l/mol, pode ser tomado como :

$$V = \frac{\text{CPM } (V_o)}{\text{CPM } (V_i)} \times \frac{1}{(\text{DODAC})} \quad (4)$$

onde (DODAC) é a concentração de DODAC na amostra colocada no topo da coluna (em M) .

Controles de adsorção externa da (^{14}C)-sacarose à bicamada de DODAC foram feitos adicionando-se (^{14}C)-sacarose a vesículas de DODAC já formadas e procedendo-se então à determinação de (DODAC) e de % inc. para o cálculo de V conforme explicitado acima.

5. DETERMINAÇÕES DE RADIOATIVIDADE EM AMOSTRAS AQUOSAS.

Amostras contendo marcadores radioativos (0,1 a 0,5ml) foram misturadas com 5ml de líquido de cintilação constituído por 2,5-difeniloxazol (4g), 2,2'-p-fenilembis (5-feniloxazol) (0,1g), tolueno (1 l) e Triton X-100 (0,5 l), determinando-se a radioatividade das amostras em um espectrocintilômetro Beckman LS-250.

6. DETERMINAÇÕES DE PROPRIEDADES OSMÓTICAS.

Dispersões de DODAC foram adicionadas a soluções aquosas de KCl ou de sacarose (ou soluções de KCl ou de sacarose foram adicionadas a dispersões de DODAC) em cubeta de quartzo de 1ml. Alterações de absorbância decorren

tes de mudanças no espalhamento da dispersão foram registrados em função do tempo utilizando-se um espectrofotômetro Cary-14 com o comprimento de onda fixo em 400nm (para a dispersão obtida por injeção de solução clorofôrmica de DODAC em água) ou em 280nm (para a dispersão obtida por sonicação). Os registros foram iniciados rotineiramente entre 6-10 segundos após a mistura (efetuada com agitador manual). A partir desses registros, foram calculados parâmetros como : 1) velocidade inicial de encolhimento ($v\%$) = $\frac{1}{A_0} \frac{\Delta A}{\Delta t} \times 100$; 2) recíproco da alteração total de absorbância ($\frac{1}{\Delta A}$) = $\frac{1}{A_f - A_0}$; 3) extensão total de encolhimento (S) = $(\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A_f}) \times A_0 \times 100$ onde $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ representa o coeficiente angular inicial da reta tangente à curva absorbância versus tempo; A_0 , a absorbância inicial; A_f , a absorbância final.

Valores médios para esses parâmetros foram obtidos a partir de, pelo menos, duas cinéticas independentes e barras de erro (desvio quadrático médio) foram calculadas para cada valor médio.

A reversibilidade do efeito de alteração da absorbância com o tempo decorrente de gradientes osmóticos impostos aos lipossomos de DODAC foi testada. Aliquotas de lipossomos encolhidos com várias concentrações de KCl foram misturadas com água e rapidamente homogeneizadas em cubeta de quartzo de 1ml. Alterações de absorbância a 400nm com o tempo foram então registrados em espectrofotômetro Cary-14. Tomando-se A_0 como absorbância inicial dos lipossomos imediatamente após serem submetidos ao encolhimento, A_f como

absorbância final dos lipossomos encolhidos, A'_{o} como absorância inicial dos lipossomos encolhidos imediatamente após serem misturados com água e A'_{f} como absorbância final dos lipossomos após a reversão do encolhimento, podemos considerear que a diluição dos lipossomos encolhidos é igual a

$$\text{DILUIÇÃO} = \frac{A_f}{A'_{o}} \quad (5)$$

O critério utilizado para se averiguar a reversibilidade do encolhimento foi comparar a absorbância final dos lipossomos encolhidos (A'_{f}) corrigida para a diluição com a absorbância inicial dos lipossomos imediatamente após serem submetidos ao encolhimento (A_{o}).

7. DETERMINAÇÕES DE TRANSIÇÃO DE FASE.

Absorbâncias (derivadas do espalhamento) de vesículas sonicadas ou lipossomos grandes de DODAC foram registradas em função da temperatura em um espectrofotômetro Cary-14 equipado com um porta cubetas termostatizável (acoplado a um banho circulante Haake E-12). A velocidade de aquecimento ou de resfriamento esteve, geralmente, entre 1-2^oC/min.. Temperaturas foram medidas dentro da cubeta através de um termopar cobre-constantan conectado a um milivoltímetro. A resposta desse sistema medidor de temperatura é linear entre 0-100^oC com um erro relativo inferior a 0,01%.

8. EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE v % e S .

0,2ml de lipossomos grandes de DODAC 4,96mM fou

ram adicionados a 0,8ml de KCl 0,0304M em cubeta de quartzo de 1,0ml. Alterações de absorbância a 400nm com o tempo foram então registradas em espectrofotômetro Cary-14 a várias temperaturas. A partir desses registros foram calculados $v\%$ e S . Tanto os lipossomos quanto a solução de KCl foram pré-incubados à temperatura desejada antes de serem misturados para a obtenção dos registros de absorbância em função do tempo. A temperatura dentro da cubeta foi medida com o termopar cobre-constantan ao longo de cada registro de absorbância com o tempo apresentando variações sempre inferiores a $0,5^{\circ}\text{C}$. $v\%$ (velocidade inicial de encolhimento) foi tomada como correspondente à temperatura medida com o termopar imediatamente após a mistura dos lipossomos com a solução de KCl. Já o parâmetro S (extensão total de encolhimento) foi tomado como correspondente à média das temperaturas medidas ao longo do registro de alteração da absorbância com o tempo.

9. DETERMINAÇÕES DE PERMEABILIDADES RELATIVAS.

0,5ml de lipossomos grandes de DODAC preparados em KCl 19,5mM foram adicionados a 0,5ml de soluções 19,5 mM de NaCl ou KCl ou HCl ou sacarose. Alterações de absorbância com o tempo após uma rápida homogeneização da mistura foram, então, registradas em um espectrofotômetro Cary-14.

10. DETERMINAÇÕES DE PERMEAÇÃO DE PRÓTONS.

Dois métodos foram utilizados, ambos empregando marcadores do compartimento aquoso intralipossomal que mudassem uma propriedade mensurável de acordo com o pH : 1) mudança de fluorescência da 2 aminopiridina (2 AP) (Aldrich, Milwaukee, USA); 2) mudança de cor de mistura de corantes indicadores de pH : azul de bromotimol (AB) e verde de bromocresol (VB) (E. Merck, Darmstadt). Soluções 10^{-4} M de 2AP em cubetas de fluorescência com tampa tiveram seus pH's ajustados para valores dentro da faixa de 2-12. Foram borbulhadas ininterruptamente com N_2 e mantidas em atmosfera desse gás para se evitar quedas de pH decorrentes de solubilização de CO_2 do ar. Espectros de excitação e de emissão de fluorescência dessas soluções de 2 AP foram obtidos em um fluorímetro Perkin-Elmer MPF-4 a cada pH (Fig. 2).

A dependência da emissão máxima da fluorescência da 2 AP com o pH está na Fig. 3. Dessa Figura, um pK aparente de 6,85 pôde ser calculado, em excelente acordo com o valor de 6,86 reportado na literatura (Weistuch e Testa, 1968; Babiak e Testa, 1973). Observa-se uma queda de cerca de 50% na intensidade de fluorescência relativa ao se passar de pH's inferiores para pH's superiores ao valor do pK aparente (Ver Fig. 3).

FIGURA 2 - Espectros da emissão (---) e de excitação (—) da 2 aminopiridina ($10^{-4}M$) em água a pH 5,7 (ajustado com HCl) com comprimento de onda de excitação e de emissão fixos em, respectivamente, 300 e 362nm. Modo "ratio". Fendas : 2nm, emissão ; 4nm, excitação. Sensibilidade 10/8.

FIGURA 3 - Efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência relativa da 2 aminopiridina $10^{-4}M$. Comprimentos de onda de emissão e de excitação variáveis com o pH e selecionados de forma a se obter intensidade máxima de fluorescência relativa.

A forma protonada da 2 AP possui frequências de emissão e de excitação diferentes da forma neutra. Ao se passar de valores de pH inferiores ao do pK aparente para valores de pH superiores ao do pK aparente, λ excitação passa de 303 para 299nm e λ emissão passa de 362 para 353nm. Ver Figura 4.

FIGURA 4 - Efeito do pH sobre os espectros de emissão e de excitação de fluorescência relativa da 2 aminopiridina $10^{-4}M$. λ_{exc} e λ_{em} : comprimentos de onda de excitação e de emissão correspondentes aos máximos de intensidade de fluorescência relativa.

Vesículas sonicadas ou lipossomos grandes de DODAC foram preparados em solução de HCl $10^{-2}M$ e de 2 AP, $10^{-2}M$ e eluídas em Sephadex G-25 (1,8 X 15,0cm) com HCl $10^{-2}M$. Para minimizar efeitos de espalhamento pela vesículas que poderiam interferir com as medidas de fluorescência, alíquotas de 0,5ml de cada fração coletada contendo vesículas foram levadas a 5ml com HCl $10^{-2}M$ obtendo-se concentrações finais de DODAC na cubeta entre 10 e $100\mu M$. 4ml dessas frações diluídas contendo vesículas foram colocadas em cuba

tas de fluorescência, adicionadas de pequenas alíquotas de NaOH concentrado e rapidamente homogeneizadas para registro de alterações de fluorescência com o tempo em um fluorímetro Perkin-Elmer MPF-4 (excitação em 300nm e emissão em 362 nm). Porcentagens de incorporação de 2 AP foram determinadas pela relação entre a intensidade de fluorescência total coletada nas frações vesiculares e a intensidade de fluorescência total coletada em torno do volume interno da coluna.

Espectros de absorção de uma mistura de corantes indicadores de pH (AB 0,1mg/ml e VB 0,1mg/ml) apresentam dois máximos : um, a 410nm (amarelo) e outro, a 610nm (azul) sendo que o máximo do amarelo diminui e o do azul cresce com o aumento do pH (Fig. 5). O pK aparente do VB é 7,0 enquanto que o pK aparente do AB é 4,7 (Merck Index). Absorbâncias a 610nm ou a 410nm da mistura de corantes em tampão fosfato em função do pH são mostradas na Figura 6.

Lipossomos grandes de DODAC contendo esses corantes indicadores de pH (AB 0,1mg/ml e VB 0,1mg/ml) foram obtidos injetando-se a solução clorofórmica usual de DODAC em 4ml da solução aquosa de corantes. Usando-se como branco uma cubeta de vidro contendo lipossomos grandes de DODAC preparados em água e como amostra, uma outra cubeta de vidro contendo lipossomos grandes de DODAC, de mesma concentração, preparados em solução da mistura de corantes, monitorou-se alterações de absorbância em espectrofotômetro Beckman-25 (23°C) ao longo do tempo decorrentes da adição de ácido ou base a ambas as cubetas. O pH inicial dos lipossomos contendo a mistura de corantes lido em pH metro foi

FIGURA 5 - Espectros de absorção de uma mistura de azul de bromotimol e verde de bromocresol, 0,1mg/ml de cada corante, em tampão fosfato 10mM, em função do comprimento de onda. Diferentes espectros cor respondem a diferentes pH's.

FIGURA 6 - Absorbâncias a 610 e a 410nm (correspondentes aos comprimentos de onda onde a absorbância era máxima, na Fig. 5) da mesma mistura de corantes da Fig. 5 em função do pH.

igual a 4,5 (devido à dissociação dos grupos sulfônicos).

11. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMOS GRANDES DE DICETILFOSFATO DE Na^+ (DCP).

1,0ml de uma solução 0,002M de DCP em clorofórmio mantida a temperaturas entre 30-40°C por um jato de ar quente (para solubilização do DCP no clorofórmio) foi injetada a uma velocidade aproximada de 0,2ml/min. em 4,0ml de uma solução aquosa ajustada a pH 8,2 com TRIS (trishidroximetilaminometano) 2M termostatzada a $70,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e borbulhada

com argônio para se facilitar a vaporização do clorofórmio. Alíquotas (1ml) da dispersão assim obtida foram filtradas a través de uma coluna de Sephadex G-25 (1,8 X 14,cm) previamente saturada com essa mesma dispersão de DCP. Conteúdo de DCP em amostras ou em frações eluídas da coluna foi analisa do como fosfato inorgânico pelo método de Bottchen et al. (1961).

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA.

Dispersões de DODAC, obtidas por vaporização de CHCl_3 , eluíram junto com o volume vazio ao serem filtradas em Sephadex G-25 (Fig. 7a). A absorbância (400nm) das frações que continham cloreto aumenta linearmente com (DODAC) (0-1,5mM) (Fig. 7b). A absorptividade aparente (derivado do espalhamento) foi $300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

FIGURA 7 - Perfis de eluição de lipossomos grandes de DODAC 6mM em coluna de Sephadex G-25 (1,8 X 14,0cm) ; frações coletadas de 2,2ml. (A) Absorbância a 400nm de lipossomos grandes de DODAC em função da concentração de DODAC (B).

As frações eluídas junto com o volume vazio da coluna de Sephadex G-25 (Fig. 7a) foram examinadas ao microscópio eletrônico tanto por coloração negativa quanto positiva revelando estruturas vesiculares fechadas com um diâmetro externo médio de $0,5\mu$ (Fig. 8) e uma distribuição de diâmetros na faixa de $0,2 - 1,0\mu$ (Fig. 9).

FIGURA 8 - Micrografias eletrônicas de lipossomos grandes de DODAC corados positivamente com molibdato de amônio 2%. Aumentos de 7800 X (A); 28500 X (B).

FIGURA 9 - Distribuição de uma população de lipossomos grandes de DODAC (108 lipossomos) segundo faixas de diâmetro. Diâmetros foram medidos em micrografia eletrônica de lipossomos corados positivamente com molibdato de amônio 2% sob um aumento de 7800 X.

As temperaturas de transição de fase gel para a líquido-cristal foram determinadas para as vesículas sonicadas de DODAC e para os lipossomos grandes de DODAC medindo-se absorvância em função da temperatura. Os pontos médios da transição de fase dos lipossomos grandes de DODAC corresponderam às temperaturas (T_c) de $38,6^{\circ}\text{C}$ para o aquecimento e $34,8^{\circ}\text{C}$ para o resfriamento. Para as vesículas sonicadas de DODAC, essas temperaturas foram, respectivamente, $37,5$ e $34,4^{\circ}\text{C}$. A faixa de temperaturas na qual houve a transição foi mais larga para as vesículas sonicadas do que para os lipossomos grandes de DODAC (Fig. 10 e Tab. I).

FIGURA 10 - Absorbância de dispersões de DODAC (4,96mM) em função da temperatura. Flechas indicam o sentido da variação de temperatura. Em (A), lipossomos grandes de DODAC. Em (B), vesículas sonicadas de DODAC.

2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL.

2.1. Impermeabilidade à sacarose, incorporação e adsorção de sacarose.

Volume do compartimento aquoso interno por mol

PREPARAÇÃO	TEMPERATURAS DE TRANSIÇÃO (°C)	
	Aquecimento	Resfriamento
SONICADAS	37.5	34.4
INJETADAS	38.6	34.8

TABELA I - Temperaturas de transição de dispersões de DODAC obtidas por sonicação ou por injeção de solução clorofórmica de DODAC em água.

de DODAC (V em l/mol) (vide "Material e Métodos) de vesículas sonicadas de DODAC foi determinado utilizando-se (^{14}C)-sacarose como marcador hidrossolúvel do compartimento aquoso intravesicular. O valor médio obtido para o volume interno aparente $\underline{V}$ (4 experimentos) foi $0,33 \pm 0,20$ l/mol (Fig. 11A). A retenção de (^{14}C)-sacarose pelas vesículas sonicadas de DODAC foi verificada pela obtenção de um único pico de radioatividade, coincidente com o pico de Cl^- , em torno do volume vazio, ao longo de um período de até 24 horas (Fig. 11B,C).

FIGURA 11 - Perfil de eluição através de Sephadex G-25 (1,8 X 14,0cm) de 2ml de vesículas sonicadas de DODAC (10mM) preparadas em água contendo (^{14}C)-sacarose. Frações coletadas de 2,2ml (A). Perfis de eluição através de Sephadex G-25 (0,9 X 21,0cm) de alíquotas de 0,2ml da fração 6 em (A), 2 horas (B) e 24 horas (C) após início da eluição de vesículas sonicadas de DODAC em (A). Frações coletadas de 0,48ml, em (B) e (C).

Quando (^{14}C)-sacarose foi adicionada a vesículas sonicadas de DODAC preparadas apenas em água, o valor médio calculado para V foi $0,20 \pm 0,08$ l/mol ($n = 6$) sendo que V manteve-se constante ao longo do tempo (Fig. 12A,B,C). Já no instante zero, que correspondia a um controle de adsorção de (^{14}C)-sacarose à bicamada, o valor de V foi igual aos obtidos posteriormente (2 e 24 horas).

FIGURA 12 - Filtrações através de Sephadex G-25 (0,9 X 21,0cm) de 0,2ml de vesículas sonicadas de DODAC (12,4mM), preparadas em água, 0 h (A), 1 h (B) e 24 h (C) após a adição de (^{14}C)-sacarose. Frações coletadas de 0,48ml.

Para lipossomos grandes de DODAC, V foi $9,66 \pm 1,30$ l/mol ($n = 3$). Análogamente, aos resultados obtidos para as vesículas sonicadas de DODAC, não se detectou vazamento de (^{14}C)-sacarose incorporada ou preenchimento dos lipossomos com a mesma ao longo do tempo. Experimentos em câ

mara de diálise de equilíbrio demonstraram que a velocidade de vazamento de (^{14}C)-sacarose incorporada a lipossomos grandes de DODAC é desprezível em relação à velocidade com que é atingido o equilíbrio no sistema (Fig. 13A). A adição de (^{14}C)-sacarose a lipossomos grandes de DODAC preparados em água, seguida de filtrações em gel em vários instantes após a adição, resultou na obtenção de valores praticamente constantes de V e iguais a $0,6 \pm 0,3$ l/mol ($n = 4$) (Fig. 13B).

A Tabela II resume dados de V para vesículas sonicadas e lipossomos grandes de DODAC calculados adicionando-se (^{14}C)-sacarose antes ou depois da formação das dispersões. O compartimento aquoso interno dos lipossomos grandes é cerca de 30 vezes maior que o das vesículas sonicadas. A adsorção, praticamente desprezível em relação à incorporação no caso dos lipossomos grandes, resulta da mesma ordem de grandeza que a incorporação nas vesículas sonicadas.

2.2. Permeabilidades relativas ao KCl.

Bicamadas constituídas por fosfolípides naturais são pouco permeáveis a íons e altamente permeáveis à água (Bangham et al., 1976). Assim, com a finalidade de se comparar o comportamento dos lipossomos grandes de DODAC com o comportamento dos lipossomos de lecitina testou-se o efeito osmótico de alguns solutos iônicos e não-iônicos. O espalhamento de luz pelos lipossomos é dependente do diâmetro médio da dispersão (Van Holde, 1975). Esse diâmetro é

FIGURA 13 - Radioatividade em diferentes instantes nos dois lados de uma câmara de diálise de equilíbrio (—) para lipossomos grandes de DODAC contendo (^{14}C) -sacarose em um lado (a) e água no outro (b). Controle (---) com água contendo (^{14}C) -sacarose em um lado (a') e água no outro (b') (A). Volumes internos aparentes (V) em diferentes instantes calculados a partir de filtrações através de Sephadex G-25 (1,8 X 14,0cm) de lipossomos grandes de DODAC 9mM não-marcados, após adição de (^{14}C) -sacarose (—). Volume interno aparente médio para lipossomos grandes de DODAC preparados em água contendo (^{14}C) -sacarose (---) (B).

PREPARAÇÃO	V _A (ml)	C (mM)	n (mol)	% inc.	V _i (l)	V (l/mol)	$\bar{V}$ (l/mol)
Sonicação	4	10	40	0.55	22	0.55	0.33±.20
em	2	10	20	0.44	8.8	0.44	(n = 4)
(água+sac.*)	2	11.9	23.9	0.148	3.0	0.13	
	2	11.9	23.8	0.237	4.7	0.20	
Sonicação	4(0)	10	40	0.37	14.8	0.37	0.20±.08
em água e	.2(0)	12.4	2.5	0.195	.39	0.16	(n = 6)
adição sac*.	.2(1)	12.4	2.5	0.234	.468	0.19	
	.2(34)	12.4	2.5	0.201	.402	0.16	
	2(0)	10	20	0.22	4.4	0.22	
	2(6)	10	20	0.19	2.8	0.19	
Injeção em	1	6.6	6.6	6.83	68.3	10.35	9.66±1.3
(água+sac*.)	1	7.4	7.4	7.73	77.3	10.45	(n = 3)
	1	6.0	6.0	4.91	49.1	8.18	
Injeção em	1(0)	5.0	5.0	.033	.33	.07	0.64±.30
água e adi	.5(2)	5.0	2.5	.17	.85	.343	(n = 1)
ção sac*.	.5(15)	5.0	2.5	.26	1.30	.524	
	.5(18)	5.0	2.5	.22	1.10	.444	
	.5(44)	5.0	2.5	.34	1.70	.685	
	.5(169)	5.0	2.5	.30	1.50	.605	
	1(0)	9.4	9.4	.50	5.00	.532	
	.5(2)	9.4	4.7	.81	4.05	.862	
	.5(3)	9.4	4.7	.47	2.35	.500	
	.5(9)	9.4	4.7	.51	2.55	.543	
	.5(24)	9.4	4.7	.63	3.15	.670	
	.5(33)	9.4	4.7	.72	3.60	.766	
	.5(48)	9.4	4.7	1.10	5.50	1.170	
	.5(74)	9.4	4.7	1.12	5.60	1.191	

OBS. : Entre parenteses, encontram-se os intervalos de tempo (hrs) decorridos entre a adição de sacarose marcada e o início da cromatografia.

TABELA II - Volumes internos aparentes (V) calculados para vesículas sonificadas e lipossomos grandes de DODAC.

V_A : volume de amostra colocado no topo da coluna (ml);
C : concentração de DODAC na amostra colocada no topo da coluna (mM);
n : nº de moles de DODAC colocados no topo da coluna (moles);
%inc.: relação entre total das cpm coletadas em torno do volume vazio e cpm coletadas em torno do volume interno(x100);
V_i : volume incorporado pelas dispersões no volume de amostra colocado no topo da coluna (ul);
V : $\frac{V_i}{n}$;
 $\bar{V}$: $\frac{V_1 + V_2 + \dots + V_n}{n}$ = valor médio do volume interno aparente.

reduzido (ou aumentado) de acordo com o gradiente osmótico imposto através da membrana lipossomal. Portanto, o efeito osmótico dos solutos foi avaliado medindo-se a absorbância derivada do espalhamento em função do tempo após a imposição do gradiente osmótico. Para soluções de solutos de índices de refração similares como a de NaCl e a de KCl, foram obtidas curvas coincidentes de absorbância a 400nm em função do tempo. Já no caso dos gradientes osmóticos gerados com soluções de sacarose misturadas aos lipossomos, as curvas de absorbância em função do tempo ocorreram dentro de uma faixa de absorbâncias inferior às faixas das curvas correspondentes ao KCl e ao NaCl, mas apresentaram forma e dimensões comparáveis às dessas últimas (Fig. 14). Como a absorbância varia diretamente com o espalhamento e como o espalhamento aumenta com a diferença de índice de refração entre a partícula e solução (Van Holde, 1975), o fato de se ter obtido uma faixa de absorbâncias por adição de soluções de sacarose menor que as faixas correspondentes às soluções de NaCl e de KCl significaria que a diferença de índice de refração entre as partículas (n) e a solução de sacarose (n_s) seria menor que a diferença de índice entre as partículas (n) e a solução de KCl (n_k) : $n - n_s < n - n_k$, ou seja, $n_s > n_k$. De fato, é sabido que $n_s > n_k$, o que torna os resultados obtidos (Fig. 14) perfeitamente compreensíveis e permite supor que o efeito osmótico induzido pela sacarose não difere do efeito osmótico induzido pelo KCl ou NaCl. Por outro lado, soluções isoosmolares de HCl pro-

moveram alterações de absorbância com o tempo nítidamente diferentes das anteriores (Fig. 14). HCl resultou menos efetivo que o NaCl, KCl ou sacarose para induzir efeito osmótico, uma vez que $1/\Delta A$, um parâmetro que reflete o volume lipossomal final após o encolhimento, resultou maior que $1/\Delta A$ calculado para os outros solutos, ou seja, os lipossomos encolheram menos devido aos gradientes osmóticos de HCl do que devido aos gradientes osmóticos dos outros três solutos testados (Tabela III).

FIGURA 14 - Efeito comparado da adição de 0,5ml de soluções de NaCl (A), KCl (A), HCl (C) e sacarose (B) de mesma osmolaridade (200 miliosmóis) sobre a absorbância de lipossomos grandes de DODAC(3,0mM; 0,5ml) previamente preparados em água.

SOLUTO	C (M)	ΔC (M)	$1/\Delta C$ (M ⁻¹)	A _o	A _f	1/ ΔA	$\frac{1}{\Delta A}$	% v (5 ⁻¹)	$\bar{v}$ % (5 ⁻¹)
KCL	0.100	0.050	20.0	.300	.497	5.1	5.4+0.3	.150	.15+0.02
				.305	.486	5.5		.140	
				.295	.484	5.3		.170	
				.300	.473	5.8		.130	
NaCl	0.103	0.051	19.5	.295	.480	5.4	5.6+0.1	.170	.15+0.06
				.295	.473	5.6		.140	
				.308	.479	5.8		.120	
				.298	.478	5.6		.170	
HCL	0.099	0.050	20.0	.282	.391	9.2	9.1+1.5	.064	.064+0.005
				.296	.398	9.8		.057	
				.296	.398	9.8		.063	
				.293	.390	10.3		.065	
				.280	.435	6.5		.067	
SACARO- SE	0.200	0.100	10.0	.280	.414	7.5	7.1+0.3	.110	.11+0.01
				.246	.390	6.9		.100	
				.256	.399	7.0		.120	

TABELA III - Parâmetros osmométricos calculados para cinéticas de encolhimento de lipossomos grandes de DODAC em soluções isoosmolares de vários solutos.

A Fig. 15 sumariza um experimento no qual lipossomos grandes de DODAC foram preparados em KCl 19,5mM sendo então adicionados de soluções isotônicas de alguns solutos (NaCl, KCl, HCl e sacarose). Dessa forma, a penetração de soluto e o conseqüente inchamento lipossomal poderiam ser detectados como alterações de absorbância com o tempo; a velocidade de penetração do soluto sendo proporcional à taxa de alteração de absorbância com o tempo. Como a absorbância a 400nm resultou constante com o tempo para o NaCl, o KCl e a sacarose deduz-se que NaCl e sacarose são tão impermeantes quanto o KCl. Já o KCl induziu um ligeiro inchamento lipossomal, o que confirma que este soluto é ligeiramente mais permeante que o KCl (vide supra).

FIGURA 15 - Alterações de absorbância (400nm) dependentes do tempo para 0,5ml de lipossomos grandes de DODAC 1,7mM preparados em KCl 19,5mM e adicionados de 0,5ml de NaCl 19,5mM (a); 19,5mM KCl (b); 19,5mM HCl (c); 39mM sacarose (d).

2.3. Propriedades osmóticas.

A instabilidade de vesículas sonicadas de DODAC frente a sais é um fenômeno que pode ser observado a olho nũ como formação de grumos após mistura de volumes iguais da dispersão sonicada em água e de solução de sal. Concentração final de sal da ordem de 20mM já é suficiente para induzir o fenômeno. Assim, sais como o NaCl e o KCl não seriam convenientes como solutos geradores de efeito osmótico em vesículas sonicadas de DODAC. Na Fig. 16, apresentam-se alterações de absorbância com o tempo induzidas em lipossomos grandes de DODAC (Fig. 16A) ou em vesículas sonicadas de DODAC (Fig. 16B) por dois solutos diferentes: KCl e sacarose. O uso de KCl como soluto gerador de efeito

FIGURA 16 - Alterações de absorbância com o tempo após adição de 0,25ml de vesículas sonicadas 10mM de DODAC a 2,0ml de KCl 0,1M (—) ou sacarose 0,17 M (---) (A); 0,5ml de KCl 0,1M (—) ou sacarose 0,2M (---) a 0,5ml de lipossomos grandes de DODAC 3,0mM (B).

osmótico pode conduzir a interpretações errôneas das alterações de absorvância com o tempo, principalmente, no caso das vesículas sonicadas. Quando KCl é usado como soluto, obtém-se dependência linear de $v\%$ com ΔC_{KCl} ou de $1/\Delta A$ com $1/\Delta C_{KCl}$ apenas para os lipossomos grandes de DODAC (Fig. 17 A,B) e na faixa de 0-50mM KCl (Fig. 17C,D). Isso mostra que no caso dos lipossomos grandes de DODAC, KCl pode ser utilizado como gerador de efeito osmótico.

FIGURA 17 - Testes de comportamento de osmômetro em relação ao KCl para lipossomos grandes de DODAC (o) e vesículas sonicadas de DODAC (●) a 400nm. 0,1ml de vesículas sonicadas de DODAC 4,96mM ou lipossomos grandes de DODAC 4,96mM preparados em água foram adicionados a 0,9ml de soluções de KCl : (A) e (B); 0,2ml de lipossomos grandes de DODAC 3mM preparados em água foram adicionados a 0,8ml de soluções de KCl : (C) e (D). A inserção em (D) contém um gráfico amplificado de $v\%$ contra ΔC para a menor faixa de concentrações de KCl utilizada.

A intensidade de radiação espalhada deve crescer com o inverso da quarta potência do comprimento de onda λ (Van Hold, p. 142, 1975). O espalhamento por sonicações de DODAC cai com λ^4 e, portanto, a absorbância derivada do espalhamento deve cair com λ^4 (Fig. 18); medições de absorbância de vesículas sonicadas de DODAC sendo mais sensíveis a 280nm que a 400nm.

FIGURA 18 - Absorbância de vesículas sonicadas de DODAC 5mM em função do comprimento de onda.

Para se confirmar o comportamento das vesículas sonicadas de DODAC a 400nm (Fig. 18), alterações de absorbância com o tempo induzidas por KCl foram obtidas a 280 nm (Fig. 19). O resultado foi análogo ao observado a 400nm.

FIGURA 19 - Testes de comportamento de osmômetro em relação ao KCl para vesículas sonicadas de DODAC 4,96mM a 280nm. 0,1ml de vesículas sonicadas de DODAC foram adicionadas a 0,9ml de solução de KCl.

Usando-se sacarose como soluto impermeante, não se detectou alteração de absorbância com o tempo em vesículas sonicadas de DODAC (vide Fig. 16B). Lipossomos grandes de DODAC, submetidos a gradientes osmóticos de sacarose, comportaram-se de forma a se obter linearidade para $v\%$ versus gradientes de

concentração de sacarose e para $1/\Delta A$ contra o recíproco do gradiente de concentração de sacarose, dentro da faixa de concentrações de sacarose utilizada (Fig. 20A e B).

FIGURA 20 - Testes de comportamento de osmômetro de lipossomos grandes de DODAC em relação à sacarose a 400nm. 0,1ml de lipossomos grandes de DODAC 2,1 mM foram adicionados a 0,9ml de solução de sacarose.

Usando HCl como soluto gerador de efeito osmótico, conforme o esperado para um soluto permeante, não se obteve linearidade das curvas (Fig. 21A e B). Assim, tanto solutos que induzem processos de agregação como o KCl quanto solutos que são permeantes são inadequados do ponto de vista de se obter comportamento análogo ao de um osmômetro.

Na Fig. 22, verifica-se o efeito da temperatura sobre parâmetros $v\%$ e S obtidos com lipossomos grandes de DODAC submetidos a um gradiente osmótico de KCl situado dentro da faixa em que ocorre comportamento de osmômetro (vide Fig. 17C e D). $v\%$ cresceu com a temperatura em toda

FIGURA 21 - Testes de comportamento de osmômetro de lipossomos grandes de DODAC em relação ao HCl a 400nm. 0,5ml de solução de HCl foi adicionado a 0,5 ml de lipossomos grandes de DODAC 3,0mM.

faixa de temperaturas utilizada apresentando um aumento abrupto para temperaturas mais próximas da T_C . S manteve-se praticamente constante para as temperaturas mais baixas, para, a seguir, decrescer, atingir um mínimo na T_C e crescer imediatamente após a T_C (Fig. 22A e B).

FIGURA 22 - Efeito da temperatura sôbre a extensão total de encolhimento (A) e sôbre a velocidade inicial de encolhimento (B). 0,2ml de lipossomos grandes de DODAC 4,96mM foram adicionados a 0,8ml de KCl 30,4mM.

A reversibilidade do encolhimento lipossomal induzido pelo KCl foi testada obtendo-se reversão desse encolhimento em todos os casos (Fig. 23 e 24; Tabela IV). Na Fig. 23, lipossomos grandes de DODAC foram preparados em KCl 10mM e encolhidos em gradientes osmóticos de 9 e 18mM de KCl ($\Delta C_{KCl} = 9$ e 18mM); a reversão do gradiente sendo feita por diluição em água de alíquotas dos lipossomos encolhidos. Como a isotonicidade do meio extralipossomal em relação ao interior lipossomal foi restabelecida, o valor final da absorbância após reversão do encolhimento (0,330 e 0,244) resultou idêntica, dentro do erro experimental, ao valor da absorbância inicial ao se induzir o encolhimento corrigida para a diluição (0,318 e 0,230) (Tabela IV). Lipossomos grandes de DODAC foram preparados em água e encolhidos com gradientes osmóticos de 40 e 50mM de KCl ($\Delta C_{KCl} = 40$ e 50mM); a reversão parcial do gradiente sendo feita por diluição em água de alíquotas desses lipossomos encolhidos e restando ainda gradientes de KCl de 16 e 8mM após essa diluição (Fig.24). Dessa forma, como o meio extralipossomal ainda estava hipertônico em relação ao interior dos lipossomos, não seria possível esperar uma reversão completa do encolhimento. Valores de absorbância ao final da reversão do encolhimento (A'_f) foram sensivelmente superiores aos valores de absorbância ao se iniciar o encolhimento (A_o) corrigidos para a diluição ($A_o/\text{diluição}$) (Tabela IV).

FIGURA 23 - Testes de reversibilidade de efeito osmótico em lipossomos grandes de DODAC preparados em KCl 10mM. Em (A), (a) 0,3ml de lipossomos 1,5mM foram adicionados de 0,1ml de KCl 0,1M; (b) 0,5ml de lipossomos encolhidos em (a) foram adicionados de 0,5ml de KCl 19mM; (c) 0,5ml de lipossomos encolhidos em (a) foram adicionados de 0,5ml de água. Em (B); (a) 0,8ml de lipossomos 1,5mM foram adicionados de 0,2ml de KCl 0,1M; (b) 0,5ml dos lipossomos encolhidos em (a) foram adicionados de 1,0ml de KCl 28mM; (c) 0,5ml dos lipossomos encolhidos em (a) foram adicionados de 1,0ml de água.

FIGURA 24 - Testes de reversibilidade de efeito osmótico em lipossomos **grandes** de DODAC preparados em água. Em (A), (a) 0,6ml de lipossomos 2mM foram adicionados de 0,4ml de KCl 100mM; (b) 0,4ml de lipossomos encolhidos em (a) foram adicionados de 0,6ml de KCl 0,04M; (c) 0,4ml de lipossomos encolhidos em (a) foram adicionados de 0,6ml de água. Em (B), (a) 0,5ml de lipossomos 2mM adicionados de 0,5ml KCl 10,0mM; (b) 0,5ml lipossomos encolhidos em (a) adicionados de 2ml KCl 50 mM; (c) 0,4ml lipossomos encolhidos em (a) mais 2ml de água.

ΔC_{KCl} (mM)	A_o	A_f	A'_o	A'_f	Diluição (X)	$A_o/\text{Diluição}$
9	0.550	0.598	0.346	0.330	1,73	.318
18	0.515	0.604	0.270	0.244	2,24	.230
40	0.490	0.745	0.360	0.340	2,07	.237
50	0.418	0.642	0.163	0.158	3,94	.106

TABELA IV - Avaliação da reversibilidade do fenômeno de encolhimento de lipossomos grandes de DODAC submetidos aos gradientes osmóticos de KCl (ΔC_{KCl}) indicados.

Supondo que a reversibilidade do encolhimento é um critério adequado para se testar estabilidade dos lipossomos grandes de DODAC em soluções de KCl, em concentrações de KCl em que os lipossomos fôsem instáveis, não ocorreria reversão. A Fig. 25 mostra testes de reversibilidade em lipossomos previamente encolhidos em soluções de KCl de concentrações crescentes. Em todos os casos, a diluição dos lipossomos encolhidos resultou em decréscimo da absorbância com o tempo, mesmo nos casos em que houve floculação a olho nú dos mesmos por adição de KCl (c e d). Todavia, em c e d, o perfil das cinéticas é constituído por duas fases : uma inicial, rápida e outra posterior, bem mais lenta.

FIGURA 25 - Reversibilidade do aumento de absorbância com o tempo decorrente da adição de soluções de KCl a lipossomos grandes de DODAC preparados em água. Aliquota de (1ml lipossomos 1,4mM DODAC mais 1 ml solução a,b,c, ou d de KCl) foi adicionada de 2ml de água. a,b,c ou d referem-se à concentração da solução de KCl utilizada para promover o encolhimento; a : 39mM; b : 75,4mM; c : 97,mM; d : 166mM.

2.4. Permeação de H^+ e/ou OH^- .

2.4.1. Mudança de fluorescência de 2 aminopiridina.

A Tabela V sumariza condições necessárias para se obter incorporação de 2 AP em vesículas sonicadas de DODAC ou em lipossomos grandes de DODAC. Essas condições são : 1) saturação prévia da coluna com DODAC; 2) preparação das dispersões de DODAC a pH's inferiores ao pK da 2 AP (nesses pH's, a 2 AP encontra-se protonada e, portanto, positivamente carregada).

2 AP foi incorporada a vesículas sonica-das de DODAC e a lipossomos grandes de DODAC, como mostra a Fig. 26A e B. V das dispersões calculado por essas % inc. de 2 AP e pela concentração de DODAC das dispersões resultou igual a 0,06 l/mol para as vesículas sonicadas e 1,6 l/mol para os lipossomos grandes de DODAC. O volume intererno desses últimos foi, portanto, cerca de 30 vezes maior que aquele calculado para a dispersão sonicada. Assim, a relação dos volumes internos é confiável, já que mesmo u-tilizando uma sonda que é pouco incorporada (2 AP), a relação de volumes internos é idêntica àquela calculada com a sacarose (vide supra) .

Para se controlar adsorção de 2 AP, lipososomos grandes de DODAC foram preparados em HCl 10^{-2} M (2ml), adicionados de 2 AP em HCl 10^{-2} M (2ml) e 10 minutos apos essa adição foi feita uma separação entre 2 AP livre e in-corporada (e/ou adsorvida) por filtração em Sephadex G-25 (Fig. 27). O volume interno calculado com esses dados foi

EXPERIMENTO	RECUPERAÇÃO Cl^-	INCORPORAÇÃO 2 AP
Injeção ou sonicação de DODAC em tampão borato pH 9,18 com 2 AP 10^{-3} . Filtração em Sephadex G-25 não-saturada com DODAC	NÃO	NÃO
Injeção ou sonicação de DODAC em tampão borato pH 9,18 com 2 AP 10^{-3}M . Filtração em Sephadex G-25 saturada com DODAC	SIM *	NÃO
Injeção ou sonicação de DODAC em HCl 10^{-2}M com 2 AP 10^{-2}M . Filtração em Sephadex G-25 satura da com DODAC	SIM *	SIM

* Recuperação de Cl^- maior que 80%.

TABELA V - Estabelecimento de condições para obtenção de vesículas sonieadas ou lipossomos grandes de DODAC com 2 AP incorporada.

FIGURA 26 - Perfis de eluição de dispersões de DODAC preparados em $\text{HCl } 10^{-2}\text{M}$ e 2 AP 10^{-2}M através de Sephadex G-25 (1,8 X 15,0cm) usando-se $\text{HCl } 10^{-2}\text{M}$ como eluente. Frações eluídas da coluna foram diluídas 10 X. (A) Eluição de 1ml de vesículas sonicadas de DODAC 10mM. Leituras de fluorescência relativa nas sensibilidades de 10/0 (○) e 1/0 (●). Volume interno aparente de 0,06 l/mol. (B) Eluição de lipossomos grandes de DODAC 6mM nas sensibilidades de 30/8 (○) e 0,9/8 (●). Volume interno aparente de 1,6 l/mol.

0,012 l/mol, um valor praticamente desprezível em relação ao anteriormente obtido (Fig. 26B) de 1,6 l/mol.

4 horas após o início da filtração dos lipossomos grandes de DODAC na coluna de Sephadex (vide Fig.26B), adicionou-se 0,2ml de NaOH (0,5 N) a 4ml de (0,5ml tubo 6 + 4,5ml $\text{HCl } 10^{-2}\text{M}$) obtendo-se uma queda imediata de fluorescência de, aproximadamente 70% do valor inicial seguida de

FIGURA 27 - Perfil de eluição de 2 AP através de Sephadex G-25 (1,8 X 15,0cm). 1ml de lipossomos grandes de DODAC 6mM preparados em HCl 10^{-2} M foram adicionados de 2 AP 10^{-2} M e cromatografados em Sephadex G-25 para separação entre 2 AP adsorvida e/ou incorporada e 2 AP livre. Fluorescência lida nas sensibilidades de 100/0 (●) e 1/0 (○).

uma queda lenta de 15%. Após atingido um nível estacionário, a adição de 0,2ml de HCl 1N levou ao valor da fluorescência atingido após a queda rápida e correspondente ao início da queda lenta (Fig. 28A e B).

48 horas após início da filtração dos lipossomos grandes de DODAC na coluna, a repetição do teste de adição de NaOH resultou em uma queda imediata de fluorescência de 60% seguida de outra queda lenta de 1,24% do valor inicial antes de se alterar o pH externo (Fig. 29).

FIGURA 28 - Transiente de fluorescência de 2 AP incorporada a lipossomos grandes de DODAC após alteração de pH do meio extralipossomal. Em (A), 0,2ml NaOH 0,5N foram adicionados a 4,0ml da fração 6 diluída 10 X em HCl $10^{-2}M$ e 4 horas após eluição dos lipossomos em Sephadex. Modo "energy". Sensibilidade 30/9. A segunda seta indica a adição de 0,2ml de HCl 1N. Em (B), o logaritmo da fluorescência foi plotado contra o tempo para a cinética obtida em (A).

FIGURA 29 - Transiente de fluorescência de 2 AP incorporada a lipossomos grandes de DODAC após alteração de pH do meio extralipossomal 48 horas após eluição dos lipossomos em Sephadex. 0,2ml NaOH 0,5N foram adicionados a 4ml da fração 6 diluída 10X (Fig. 26A). Sensibilidade de 30/8.

FIGURA 30 - (A) Transientes de fluorescência de 2 AP incorporada a lipossomos grandes de DODAC correspondentes à imposição de um gradiente de pH de 2,2 unidades (pH inicial = 5,8; pH final 8,0). Lipossomos grandes de DODAC foram preparados em uma mistura de água e 2 AP $10^{-2}M$ ajustado a pH 5,8. O injetado obtido nessa mistura foi filtrado em Sephadex G-25 (eluição com água também ajustada a pH 5,8) obtendo-se um pico de fluorescência e de DODAC junto à fração 4. Essa fração 4 foi diluída tomando-se 0,2ml e adicionando-se 2,0ml de água pH 5,8 (essa fração 4 diluída será chamada de FD). Diferentes alíquotas de FD foram novamente diluídas e submetidas a um mesmo gradiente de pH de 2,2 unidades pela adição de 0,005ml de NaOH 0,20M. (a) 0,1ml de FD + 1,9ml H_2O pH 5,8; (b) 0,2ml de FD + 2,0ml H_2O pH 5,8; (c) 0,3ml de FD + 1,7ml de H_2O pH 5,8; (d) 0,4ml de FD + 1,6ml de H_2O pH 5,8. Sensibilidades do fluorímetro em que foram obtidos os transientes de fluorescência foram: (a) 100/5; (b) 30/10; (c) 30/7; (d) 30/4. Concentrações finais de DODAC na cubeta, em mM, foram: (a) 0,06; (b) 0,10; (c) 0,16; (d) 0,22. (B) Logarítmo da fluorescência contra tempo para as mesmas cinéticas (a), (b), (c) e (d) obtidas em (A).

FIGURA 31 - Permeação de 2 AP através de lipossomos grandes de DODAC 0,33mM em câmara de diálise de equilíbrio. Frações 4 e 5 eluídas em Sephadex G-25 a pH 5,8 foram levadas a 10ml e colocadas no lado A de uma câmara de diálise de equilíbrio contra 10ml de H₂O a pH 5,8 no lado B. Para controle, 1ml de 2 AP 10⁻²M a pH 5,8 foi levada a 10ml em H₂O pH 5,8 e colocada no lado A' contra 10ml de H₂O a pH 5,8 no lado B'.

Para se verificar se a cinética de fluorescência obtida dependia da concentração de DODAC ao se estabelecer um dado gradiente de pH através das paredes lipossomais foram feitos testes de adição de NaOH 0,25 N 4 horas após separação entre 2 AP livre e 2 AP incorporada a várias concentrações de DODAC, (Fig. 30A, B). Novamente foram obtidas cinéticas bifásicas que independeram da concentração de DODAC. Repetindo os mesmos testes a várias concentrações de DODAC 48 horas após a separação entre a 2 AP livre e a 2 AP incorporada não mais foram obtidas cinéticas de fluorescências mostrando a reprodutibilidade do fenômeno anteriormente ilustrado pelas Figs. 27A (4 horas) e 28 (48 horas).

Na Fig. 31 mostramos resultados obtidos em câmara de diálise de equilíbrio ilustrando a permeação da 2 AP incorporada a lipossomos grandes de DODAC ao longo do tempo.

2.4.1. Mudança da absorbância de uma mistura de corantes indicadores de pH.

A mudança temporal da absorbância (610nm) observada após adição de ácido ou base a lipossomos de DODAC contendo uma mistura de corantes indicadores de pH estão na Fig. 32.

A reprodutibilidade do fenômeno foi testada com outra amostra de lipossomos 10mM DODAC nas mesmas condições, (Fig. 33). Analogamente às cinéticas de fluorescência

FIGURA 32 - Transientes de absorvância de uma mistura de tintas indicadoras de pH incorporadas a lipossomos grandes de DODAC 10mM após alteração do pH extralipossomal. (A) e (A') : adição de 0,01 ml de HCl 0,95M; (B) e (B') : adição de 0,01ml de NaOH 0,466M. Adições de ácido ou base a 0,7ml de lipossomos grandes de DODAC foram feitas simultaneamente na cubeta de referência e na cubeta da amostra.

FIGURA 33 - Transientes de absorvância a 610nm após a adição de 0,005ml de HCl 0,95M (A) ou 0,005ml de NaOH 0,466M (B) a 1ml de lipossomos grandes de DODAC 10mM contendo tintas (AB + VB) indicadoras de pH.

cia da 2 AP, as cinéticas obtidas com a mistura de corantes indicadores de pH também resultaram bifásicas (Fig. 34).

FIGURA 34 - Logarítmo da absorbância a 610nm contra o tempo para as cinéticas de absorbância da Fig. 33. Após adição de ácido (A); após a adição de base (B).

Registros de espectros de absorção antes e depois da adição de ácido ou base mostram deslocamento dos máximos de absorção em relação aos máximos obtidos para a mistura de tintas em tampão fosfato e em ausência de lipossomos (Fig. 35).

FIGURA 35 - Espectros de absorção obtidos para tintas indicadoras de pH em presença de lipossomos grandes de DODAC 10mM antes (—) e depois (---) da adição de 0,005ml de HCl 0,95M.

3. OBTENÇÃO DE LIPOSSOMOS GRANDES DE DCP (Dicetil fosfato de Na^+).

Com a finalidade de se averiguar se seria possível estender o método de obtenção de lipossomos grandes de DODAC a outros anfifílicos tentamos obter lipossomos grandes de DCP de maneira análoga à preparação dos lipossomos grandes de DODAC (vide "Material e Métodos"). Conforme já verificado por Mortara (1978), esse anfifílico pode formar vesículas pequenas ($\sim 300 \text{ \AA}$ de diâmetro) por dispersão ultrasônica de concentrações de DCP da ordem de 1 mM . Vesículas sonicadas de DCP mostraram-se instáveis a pH's menores que 7,4 (Mortara, 1980). Assim, padronizamos uma solução aquosa a pH 8,2 como o meio no qual seria feita a injeção da solução clorofórmica de DCP.

A determinação do volume interno (V) foi feita utilizando-se (^{14}C)-sacarose como marcador hidrossolúvel do comportamento aquoso interno. V foi igual a $13,4 \pm 4,0 \text{ l/mol}$ ($n = 4$) (Fig. 36A).

Para que esses dados de V sejam realmente uma medida do volume do compartimento aquoso interno, devem ser verificadas 2 condições : 1) sacarose deve ser impermeante; 2) sacarose não deve ser apreciavelmente adsorvida na bicamada de DCP. Recromatografias de frações eluídas da coluna resultam na obtenção de um único pico de radioatividade e de fosfato em torno do volume vazio, o que sugere que sacarose seria impermeante (Fig. 36B). Por outro lado, a adição de (^{14}C)-sacarose a uma preparação de lipossomos

grandes de DCP seguida de filtração em Sephadex G-25 para separação de (^{14}C)-sacarose adsorvida e (^{14}C)-sacarose livre resulta na obtenção de um único pico de radioatividade em torno do volume interno da coluna e de um único pico de fosfato em torno do volume vazio da coluna, o que sugere que sacarose não seria adsorvida pela bicamada de DCP (Fig. 36C).

Além disso, lipossomos grandes de DCP comportaram-se como osmômetros com relação à sacarose, o que mais uma vez demonstra que sacarose é um soluto impermeante e que os lipossomos grandes de DCP são sistemas fechados (Fig. 37).

FIGURA 36 - Perfis de eluição de radioatividade ou de DCP em coluna de Sephadex G-25 (15,0 X 1,4cm) previamente saturada com lipossomos grandes de DCP. (A) Separação entre (^{14}C)-sacarose livre e incorporada em 1ml de lipossomos grandes de DCP 0,53mM. Volume interno calculado correspondeu a 13,3 l/mol. (B) Recromatografia de (0,5ml da fração 5 + 0,5ml da fração 6). (C) Cromatografia de 1ml de lipossomos grandes de DCP adicionados de (^{14}C)-sacarose para controle de adsorção.

FIGURA 37 - Comportamento de osmômetro de lipossomos grandes de DCP 0,33mM frente à sacarose. 0,5ml de lipossomos grandes de DCP 0,5mM foram adicionados de 0,5ml de solução de sacarose sendo então registrados valores de absorbância a 400nm em função do tempo.

DISCUSSÃO

Nesta secção, demonstramos que lipossomos grandes de DODAC, ao contrário do sistema constituído pelas vesículas sonicadas pequenas, podem ser mais adequados como modelos para estudos de permeabilidade através de bicamadas. Para isso, caracterizamos comparativamente ambos os sistemas quanto a algumas propriedades físicas e funcionais. Uma propriedade básica de um modelo é sua capacidade de funcionar como barreira diante de certas substâncias incorporadas em seu meio aquoso interno, no caso de bicamadas fechadas. Ao mesmo tempo, substâncias hidrosolúveis impermeantes podem ser utilizadas para se determinar o volume interno de lipossomos constituídos por fosfolípides (Kornberg e McConnell, 1971; Papahadjopoulos et al., 1971) desde que não sejam apreciavelmente adsorvidos pela bicamada fosfolipídica. Como não houve vazamento (ou preenchimento) de lipossomos grandes de DODAC com a sacarose (Fig. 13), esta resulta um soluto impermeante através desse sistema. O volume interno aparente calculado para os lipossomos grandes de DODAC ($9,7 \pm 1,3$ l/mol) é cerca de 20 vezes maior que o valor calculado para o controle de adsorção de (^{14}C)-sacarose ($0,64 \pm 0,3$ l/mol) (Tab. II). Assim, a sacarose é um marcador hidrosolúvel adequado do compartimento aquoso interno de lipossomos grandes de DODAC. Vesículas fosfolipídicas grandes, preparadas por vaporização de éter exibem volumes internos (14 ± 6 l/mol) (Deamer e Bangham, 1976) que são similares aque-

les dos lipossomos grandes de DODAC. Consequentemente, as capacidades de incorporação desses dois sistemas são comparáveis. O volume do compartimento aquoso interno também pode ser calculado com base no diâmetro obtido por microscopia eletrônica (Fig. 8), como se faz usualmente com sistemas fosfolipídicos fechados (Deamer e Bangham, 1976; Szoka e Papahadjapoulos, 1978; Enoch e Strittmatter, 1979). A área média de um monômero de DODAC em uma bicamada é $40 \text{ \AA}^2$ (Herrmann e Fendler, 1979). Essa área é menor do que aquela de fosfolípides em estruturas comparáveis ; $46 - 75 \text{ \AA}^2$ dependendo da temperatura e da natureza do fosfolípide (Demel e De Kruffyff, 1976). Isso porque a cabeça polar hidrofílica do DODAC é substancialmente menor que a de um fosfolípide, sendo que a repulsão eletrostática entre as cabeças do DODAC, que tenderia a aumentar a área superficial por monômero, seria compensada por uma extensiva condensação devida aos contraíons (Fendler, 1980). Como o diâmetro externo médio ($0,514 \mu$) (Fig. 9) dos lipossomos grandes de DODAC é grande, o número de monômeros nas monocamadas externa e interna da bicamada pode ser considerado igual. Dados de microscopia eletrônica (Fig. 8) exibem pouca evidência de estruturas multilamelares fechadas. Assim, assumindo uma única lamela fechada, o volume interno calculado é de 10 l/mol . Esse valor é concordante com o obtido experimentalmente através de incorporação de (^{14}C) -sacarose.

Vesículas sonicadas de DODAC possuem raio hidrodinâmico de $447 \text{ \AA}$ (Herrmann e Fendler, 1979) e, vesículas sonicadas de fosfolípides têm $200-500 \text{ \AA}$ de diâmetro ex

terno médio (Papahadjopoulos et al., 1980). Assumindo $300\text{--}900\text{ \AA}$ como faixa de diâmetros para vesículas sonicadas de DODAC e $40\text{ \AA}$, para a área média por monômero (Herrmann e Fendler, 1979), o volume interno calculado é $0,15\text{--}0,45\text{ l/mol}$. O volume interno calculado pela incorporação de (^{14}C) -sacarose ($0,33 \pm 0,20\text{ l/mol}$) (Fig. 11A, Tab. II) é da mesma ordem de magnitude que a adsorção externa de sacarose ($0,2 \pm 0,08\text{ l/mol}$) (Fig. 12, Tab. II). Subtraindo $0,20 \pm 0,08\text{ l/mol}$ (adsorção) de $0,33 \pm 0,20\text{ l/mol}$ (adsorção e incorporação), podemos considerar $0,13\text{ l/mol}$ como um limite superior para o volume interno de vesículas sonicadas de DODAC, um valor praticamente idêntico ao estabelecido para vesículas sonicadas de fosfatidilserina em ausência de adsorção (Kornberg e McConnell, 1971; Papahadjopoulos et al., 1971). A observada ausência de responsividade osmótica em vesículas sonicadas de DODAC após o estabelecimento de gradientes osmóticos de sacarose (Fig. 16B) também sugere um compartimento aquoso interno extremamente pequeno. Convém observar ainda que ausência de responsividade osmótica em vesículas sonicadas de fosfolípidos já foi observada por outros autores (Johnson e Buttress, 1973). Por outro lado, foi demonstrado que vesículas unilamelares de fosfolípidos com diâmetro inferior a $400\text{ \AA}$ são instáveis abaixo da T_c e fundem espontaneamente para formar vesículas maiores (Suurkuusk et al., 1976; Kantor et al., 1977; Larrabee, 1979; Schullery et al., 1980; Lichtenberg et al., 1981). No caso da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), essa fusão leva à formação de vesículas unilamelares com cerca de $700\text{ \AA}$ de diâmetro que são es

táveis abaixo da T_c (Schullery et al., 1980) e que apresentam responsividade osmótica e características calorimétricas muito similares às de lipossomos multilamelares. Segundo Lichtenberg et al. (1981), essas vesículas de DPPC de 700 Å⁰ seriam bastante flexíveis e poderiam suportar aumentos de até duas vezes no seu compartimento aquoso interno sem qualquer vazamento do conteúdo interno. Já as vesículas sonicadas de DPPC de diâmetro inferior a 400 Å⁰ seriam esferas rígidas incapazes de responderem a gradientes osmóticos. Outra interpretação possível para a ausência de responsividade osmótica de vesículas sonicadas de DODAC que aliás, nos parece a mais adequada, seria a de um compartimento aquoso interno constituído principalmente por água de hidratação, ou seja, por água ligada fortemente à bicamada que não estaria disponível para responder a gradientes osmóticos de soluto gerados através da mesma. Para verificar a validade dessa interpretação podemos fazer um cálculo simples da proporção entre número de moléculas de água no compartimento aquoso interno e número de moléculas de DODAC na bicamada interna. Vamos supor 0,13 l/mol como o volume interno de vesículas sonicadas de DODAC (vide Tab. II). Supondo que, em cada 3 moléculas de DODAC, 2 estejam na monocamada externa da vesícula e 1 esteja na monocamada interna (Demel e De Kruffyf, 1976), 0,13 l de água serão limitado por 2×10^{23} moléculas de DODAC, ou seja, 43×10^{23} moléculas de H₂O serão limitadas por 2×10^{23} moléculas de DODAC. Finalmente, fazendo a proporção, teremos cerca de 22 moléculas de água para cada molécula de DODAC da monocamada interna da

vesícula. Ora, coincidentemente, existem dados na literatura que mostram que cada molécula de fosfolípide na monocamada interna seria hidratada por 23 moléculas de água (Finer e Darke, 1974).

Nesse trabalho, os autores obtêm espectros de ressonância magnética de deuteron em sistemas binários de $^2\text{H}_2\text{O}$ com lecitina de ovo, fosfatidiletanolamina de ovo ou fosfatidilserina de cérebro de boi na forma de sal sódico. Esses três fosfolípidos estudados apresentaram diferentes comportamentos frente à hidratação. A fosfatidilserina na forma de sal de sódio liga 1 molécula de água em uma casca interna de hidratação (possivelmente ligada ao fosfato), mais 10 moléculas de água em torno de sua parte polar e ainda, 12 moléculas de água associadas com o íon sódio que estariam fracamente ligadas. Todas essas moléculas de água trocam rapidamente de posição entre si ($>10^4 \text{ s}^{-1}$), mas trocam apenas lentamente com a água livre ($<10^2 \text{ s}^{-1}$). Dentre os três fosfolípidos estudados, o que teria estrutura química mais próxima do DODAC seria a fosfatidilserina de sódio, já que esta teria, como o DODAC, cabeças polares carregadas e contra-íons, enquanto que a lecitina e a fosfatidiletanolamina teriam cabeças polares zwitteriônicas e, portanto, não teriam contra-íons. Assim, parece válido supor que o interior de vesículas sonicadas de DODAC contenha principalmente moléculas de água de hidratação. Adicionalmente, Kano e Fendler (1979), através de estudos de polarização de fluorescência de marcadores incorporados no meio aquoso interno de vesículas unilamelares de fosfolípidos, determinaram vis

cosidades do meio intralipossomal antes e depois de choques osmóticos. Verificam que há um substancial aumento das viscosidades após os choques osmóticos e interpretam esse resultado em termos da natureza da água contida no interior dos lipossomos. Antes do choque osmótico, os marcadores fluorescentes estariam em um ambiente constituído por água livre e depois, em um ambiente mais viscoso que seria constituído por água de hidratação. Uma questão ainda em aberto seria se essa água de hidratação poderia ou não deixar o compartimento aquoso interno em decorrência da imposição de gradientes osmóticos elevados, sem desestruturação da bicamada de detergente ou de fosfolípide. Mais adiante pretendemos analisar alterações de absorbância com o tempo em lipossomos grandes de DODAC decorrentes de gradientes osmóticos na faixa de 500 - 1000 miliosmois para se verificar se é possível a retirada de água de hidratação do compartimento aquoso intravesicular.

O HCl é ligeiramente mais permeante que o KCl e, a sacarose e o NaCl são tão impermeantes quanto o KCl (Fig. 15). Recentemente, foi mostrado que H^+ permeia vesículas de asolecitina (Clement e Gould, 1981). Dados relativos à permeação de H^+ em lipossomos grandes de DODAC sugerem que essa velocidade de permeação é menor que velocidades de permeação de H^+ através de vesículas fosfolipídicas (Ver Resultados relativos à permeação de H^+ a partir da Fig. 27 e comparar com dados de Clement e Gould (1981)). Em um sistema positivamente carregado, como os lipossomos grandes de DODAC (Cuccovia et al., 1982), espera-se que a velocidade de permeação do H^+ seja menor que a ve-

locidade de permeação em vesículas de asolecitina neutras ou negativamente carregadas. Entretanto, H^+ permearia lipossomos grandes de DODAC mais depressa que K^+ , um íon de dimensões bem maiores. Dados de permeabilidade absoluta para a sacarose (Fig. 11, 12, 13) demonstram que a sacarose é impermeante através de lipossomos grandes de DODAC. Assim, KCl e NaCl são também impermeantes e o HCl é ligeiramente permeante, em termos absolutos. Resumindo, lipossomos grandes de DODAC comportam-se como barreira diante de sacarose, de NaCl e de KCl. Vamos agora, analisar o comportamento desse sistema em relação à permeação de água.

Em esferas de lecitina, Edelberg (1953) observou alterações de volume após alterações da osmolaridade do meio. Bangham et al. (1965) previram, a partir de estudos de permeação de íons e de água em suspensões de lecitina, que um efeito osmótico poderia vir a ser observado nessa preparação. Rendi (1967), usando fosfolípidos extraídos de mitocôndria que se encontravam presumivelmente na forma de cristais líquidos em uma mesofase esmética, mostrou que essas suspensões de fosfolípidos respondiam a gradientes osmóticos e seguiam a lei de Boyle van'tHoff, quantificando pela primeira vez o fenômeno osmótico nessa preparação. Como o NaCl não era adequado como gerador de efeito osmótico devido à indução de precipitação das "micelas" de fosfolípidos (Robim e Thomas, 1963; Abramson et al., 1964), Rendi (1967) usou um não-eletrólito : a sacarose. Bangham et al. (1967) mostraram que suspensões de lecitina ou de lecitina e ácido fosfatídico (96 : 4) comportavam-se como osmômetros quase

perfeitos para solutos como a glicose, a sacarose, o manitol e sais de metais alcalinos. O critério para verificação de comportamento osmométrico foi também a lei de Boyle van't Hoff segundo a qual o volume final de uma dispersão previamente submetida a um gradiente osmótico deve ser inversamente proporcional à concentração de soluto utilizada para gerar o gradiente. Formalmente, essa lei pode ser expressa como : $V = k/C + V_{C \rightarrow \infty}$ onde V : volume total final dos lipossomos que pode ser medido como o volume de um "pellet" obtido por centrifugação de dispersão menos o volume intersticial determinado com o auxílio de um marcador radioativo do meio extralipossomal adicionado à suspensão antes da centrifugação (insulina ou sacarose marcados); C : concentração do soluto; $V_{C \rightarrow \infty}$ = espaço osmótico morto, ou seja, o volume lipossomal após saída de toda a água por aplicação de um gradiente de concentração infinita de soluto.

A determinação do volume final da suspensão após aplicação do gradiente osmótico pode ser feita pelo método fotométrico (Rendí, 1967; Bangham et al., 1967), uma vez demonstrada uma relação linear entre o volume de pellet (em $\text{mm}^3/\mu\text{mol}$ de fosfolípide, por exemplo) e o recíproco da absorbância. Assim, à partir de registros de A_f (absorbância final da suspensão à qual foi aplicado um dado gradiente osmótico), pode-se verificar se $1/A_f$ é proporcional ao recíproco da concentração do soluto utilizado como gerador de efeito osmótico.

Para determinar um coeficiente de permeação osmótica de água, Bangham et al. (1967) estimaram a varia-

ção inicial de volume com o tempo, isto é, $\left. \frac{dV}{dt} \right|_{t \sim 0}$, que daria uma medida da velocidade inicial de movimentação de água induzida por efeito osmótico : $\left. \frac{dV}{dt} \right|_{t \sim 0} = \frac{d(1/A)}{dt} \Big|_{t \sim 0} \equiv - \frac{1}{A_o^2} \frac{dA}{dt} \Big|_{t \sim 0}$ onde A_o : valor constante de absorbância de $\underline{V}$ ml de dispersão mais $\underline{v}$ ml de solução isoosmolar com o com partimento intralipossomal, sendo que $\underline{V}$ ml de dispersão eram adicionados de $\underline{v}$ ml de solução hipotônica para obtenção do efeito osmótico; $\left. \frac{dA}{dt} \right|_{t \sim 0}$ = coeficiente angular da reta tangente à curva absorbância (A) versus tempo (t) no instante em que se iniciou seu registro ($t \sim 0$).

À partir de dV/dt e da determinação de área superficial externa total da dispersão (através de adsorção estequiométrica de UO_2^+), o coeficiente de permeabilidade osmótica de água foi estimado e comparado com valores já existentes para outros sistemas - modelo de membrana.

Nosso critério para identificar comportamento de osmômetro foi também a lei de Boyle van't Hoff que implica em linearidade para os gráficos de $1/A_f$ contra $1/\Delta C$ e de $v \%$ contra ΔC . A expressão que define "velocidade inicial de encolhimento" é a de Bangham et al. (1967) : $\left. \frac{d(1/A)}{dt} \right|_{t \sim 0} = - \frac{1}{A_o^2} \frac{dA}{dt} \Big|_{t \sim 0}$. A definição que utilizamos é a de Blok et al. (1976) onde $v \%$ = $-\frac{1}{A_o} \frac{dA}{dt} \Big|_{t \sim 0}$ que, matematicamente, não é correta. Todavia, como A_o é um valor praticamente constante para uma mesma concentração final de DODAC e para um mesmo soluto gerador de efeito osmótico, os perfis das curvas obtidas com os parâmetros de Blok et al. (1976) são os mesmos que os obtidos segundo Bangham et al. (1967) (dividindo todos os pontos de uma curva por uma constante não alteramos o

perfil da curva). Por motivo análogo, pode-se usar $1/A_f - A_o$ ou $(1/A_o - 1/A_f) A_o \times 100$ em função de $1/\Delta C$ para se expressar o comportamento de $1/A_f$ com $1/\Delta C$.

O sistema constituído por lipossomos grandes de DODAC pode ser descrito pela lei de Boyle van't Hoff para a faixa de concentração de 0-50mM de KCl (Fig. 17C e D). A não-linearidade dos parâmetros osmométricos para concentrações além dessa faixa pode ser explicada pela susceptibilidade dessas preparações a sais (Tran et al., 1978; Fendler, 1980) e consequentes alterações de absorbância com o tempo decorrentes de fenômenos não-osmóticos (floculação ou fusão). Para vesículas sonicadas de DODAC foi descrito comportamento de osmômetro em relação ao KCl (Kano et al., 1979). Todavia, esses dados são criticáveis por dois motivos principais : 1) parâmetros osmométricos calculados não são representativos (determinações isoladas e não, valores médios); 2) efeitos induzidos pelo KCl como floculação ou agregação podem ter sido interpretados como encolhimento. Além disso, dados de absorbância derivada do espalhamento de luz para vesículas sonicadas de DODAC demonstram a ocorrência de agregação por adição de sal (Fendler, comunicação pessoal). Assim, vesículas sonicadas de DODAC não se comportaram como osmômetros em relação ao KCl ao longo da mesma faixa de concentrações de DODAC e de KCl, na qual lipossomos grandes de DODAC apresentaram esse comportamento (Fig. 17A e B). Para explicar esse resultado devem ser considerados os seguintes fatores : 1) o número de vesículas na dispersão sonicada é maior que o número de vesícu

las na dispersão injetada para uma mesma concentração de DODAC; a área superficial total e a secção de choque disponível para interações intervesiculares são maiores para a dispersão sonicada (considerando uma mesma área superficial por monômeros nas duas dispersões, o mesmo número de monômeros nas duas dispersões, uma relação 2 : 1 entre o número de monômeros na monocamada externa e na interna das vesículas sonicadas e 1:1, para o número de monômeros na monocamada externa e interna dos lipossomos grandes de DODAC, uma relação entre os raios das sonicadas e das grandes de 1/20, é possível calcular um número de vesículas pequenas cerca de 100 vezes maior que o número de vesículas grandes); 2) estabilidade intrínseca da dispersão constituída pelas vesículas sonicadas é menor que a estabilidade da dispersão constituída pelos lipossomos grandes de DODAC, devido ao menor raio de curvatura das sonicadas que diminui a interação hidrofóbica entre cadeias hidrocarbônicas adjacentes (T_c para lipossomos grandes de DODAC é maior que a T_c para vesículas sonicadas de DODAC (Fig. 10, Tab. I), um dado que também corrobora a maior instabilidade das vesículas sonicadas de DODAC); 3) maior velocidade de difusão para vesículas sonicadas de DODAC em relação aos lipossomos grandes de DODAC, desde que partículas menores difundem mais depressa que as maiores.

A transição de fase dos lipossomos grandes de DODAC resultou mais nítida que a transição de fase das vesículas sonicadas, ou seja, ocorreu em uma faixa mais estreita de temperaturas. Por cooperatividade, entende-se a facilidade sempre crescente com que mais desordenados são atin-

gidos por moléculas adjacentes (Zimm e Bragg, 1959). No estado gel, as cadeias acila estão numa configuração estendida e no estado líquido-cristal, estão totalmente desordenadas (Lee, 1977). Como a liberdade de rotação em torno das ligações C-C em uma dada cadeia acila de uma molécula requer que os lípides vizinhos estejam fluídos, por simples razões estéricas, a transição será cooperativa. Como as vesículas obtidas por injeção são maiores que as obtidas por sonicação, a transição de fase das primeiras será mais abrupta que a das últimas. Uma vez iniciada a fusão em um vazio do retículo ou em um defeito qualquer da bicamada de uma vesícula, todas suas moléculas fundem cooperativamente.

O fato de vesículas sonicadas fundirem a temperaturas inferiores às dos lipossomos grandes de DODAC (Tab. II) sugere que as sonicadas teriam uma configuração abaixo da transição de fase que seria mais instável que a configuração dos lipossomos grandes de DODAC. Possivelmente, essa maior instabilidade seria decorrente do menor raio de curvatura com conseqüente diminuição de interação hidrofóbica entre moléculas adjacentes nas sonicadas em relação aos lipossomos grandes por motivos geométricos e estéricos (Israelachvili et al., 1980).

Desde que o volume molar de DODAC na fase líquido-cristal é maior que o volume molar de DODAC na fase gel, em analogia com o comportamento de sistemas fosfolipídicos, um domínio na fase líquido-cristal estará sob compressão enquanto que um domínio na fase gel estará sob tensão (Lee, 1977). Isso explicaria a pronunciada histerese

obtida nas curvas de transição de fase de lipossomos grandes de DODAC ou de vesículas sonicadas de DODAC (Fig. 10). Dispersões aquosas de fosfatidilserinas não apresentam curvas superpostas de aquecimento e resfriamento; histerese sendo um fenômeno mais provável para lípides carregados (Mac Donald et al., 1976).

Recentemente, Takemoto et al. (1981) descreveram o efeito do tamanho lipossomal sobre os parâmetros de transição de fase de lipossomos unilamelares de fosfatidilcolina e de dipalmitoilfosfatidilcolina. Verificaram que, tanto o ponto médio quanto a nitidez da transição aumentavam com o tamanho dos lipossomos, um resultado totalmente análogo ao que obtivemos para as vesículas sonicadas e os lipossomos grandes de DODAC. Além disso, observaram desaparecimento da pré-transição em todas as preparações constituídas por lipossomos unilamelares, mesmo os maiores, sugerindo que a pré-transição envolveria interações entre lamelas adjacentes. A ausência de pré-transição (Fig. 10) pode, portanto, significar que tanto os lipossomos grandes de DODAC quanto as vesículas sonicadas de DODAC são unilamelares.

Lipossomos fosfolipídicos são permeáveis à água e responsivos a gradientes osmóticos tanto acima quanto abaixo da T_c (Lee, 1977). Em torno da T_c , uma alteração acentuadamente reduzida de absorbância após um choque osmótico pode ocorrer devido a permeabilidades aumentadas à água ou ao soluto (Haest et al., 1972; Papahadjapoulos et al., 1973; Inoue, 1974; Nichols e Miller, 1974; Blok et al., 1975). Lipossomos grandes de DODAC, em parti-

cular, comportaram-se em torno de T_c como lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (Blok et al., 1976) atingindo um mínimo para a extensão total de encolhimento e aumentando abruptamente a velocidade inicial de encolhimento (Fig.22). Esse comportamento pode ser explicado, como para os lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina, por uma permeabilidade aumentada à água e ao KCl em torno da T_c decorrente da formação de poros estatísticos nas regiões de interfase, ou seja, nas regiões entre domínios gel/líquido-cristal.

Fenômenos puramente osmóticos de encolhimento após estabelecimento de hipertonicidade no meio extralipossomal deveriam ser reversíveis. Assim, alterações de absorvância com o tempo decorrentes de hipertonicidade no meio extralipossomal também seriam reversíveis desde que se revertesse o gradiente osmótico inicialmente estabelecido e desde que essas alterações de absorvância estivessem refletindo encolhimento lipossomal. A reversibilidade osmótica exibida pelos lipossomos grandes de DODAC (Fig. 23, 24) confirma a natureza vesicular proposta para essa preparação. Além disso, poder-se-ia imaginar que um critério adequado para estabilidade da dispersão frente a sais fôsse a reversão do efeito osmótico. Fenômenos não-osmóticos deveriam ser, nesse caso, irreversíveis. Assim, ao se aumentar a concentração salina os efeitos de floculação e/ou agregação induzidos pelo sal se manifestariam e não se obteria reversão do efeito por diluição. Os resultados obtidos mostram que não é esse o caso (Fig. 25), uma vez que fenômenos não-osmóticos também parecem reverter com a diluição. As cinéticas

bifásicas de reversão obtidas em C e D (Fig. 26) sugerem que fenômenos não osmóticos também seriam reversíveis com a diluição. A fase inicial rápida corresponderia à reversão dos fenômenos não-osmóticos enquanto que a fase posterior mais lenta corresponderia à reversão do encolhimento.

Volumes internos de vesículas sonicadas de DODAC ou de lipossomos grandes de DODAC calculados através da incorporação de 2 AP resultaram sempre menores que os obtidos através da incorporação de (^{14}C)-sacarose (vide Fig. 26). Além disso, cinéticas de permeação de OH^- em frações eluídas de coluna que continham lipossomos grandes de DODAC incorporando 2 AP tornavam-se cada vez menos detectáveis com o tempo. Assim, 4 horas após a separação 2 AP livre/2 AP incorporada era possível detectar uma cinética bastante pronunciada de permeação de OH^- (Fig. 27A), ao passo que 48 horas após essa mesma separação, não era possível detectar uma cinética apreciável de permeação de OH^- (Fig. 28). Esses dados sugerem que 2 AP estaria permeando as paredes dos lipossomos de DODAC. A confirmação dessa hipótese está na Fig. 31 onde verificamos que 2 AP incorporada em lipossomos grandes de DODAC é capaz de permear esses lipossomos e de chegar ao lado B de uma câmara de diálise de equilíbrio. Uma discussão cabível no caso seria referente à espécie de 2 AP que efetivamente está permeando o lipossomo. Em torno do pK aparente, há um equilíbrio entre 2 AP neutra e 2 AP positivamente carregada. Assim, a distribuição de ácidos e bases fracas através de membranas irá depender do gradiente de pH existente através das mesmas. Esse efeito

vem sendo usado para se medir gradientes de pH em mitocôndria (Addanki et al., 1968), em cloroplastos (Rottenberg et al., 1972), em lisossomos (Goldman e Rottenberg, 1973), em grânulos de cromatina (Johnson e Scarpa, 1976) e em lipossomos (Deamer et al., 1972) com aminas como a metilamina e a 2-aminoacridina. Em lipossomos preparados com o interior âcido em relação ao tampão externo, catecolaminas adicionadas ao meio externo podem se concentrar. Assim, gradientes de pH poderiam contribuir para a concentração de catecolaminas em sítios de armazenamento subcelulares. Lipossomos de fosfatidilcolina de ôvo preparados por vaporização de éter resultam impermeantes â forma carregada das aminas e permeantes â forma neutra sendo capazes de acumular concentrações crescentes de catecolaminas com o aumento dos gradientes de pH através das paredes lipossomais (Nichols e Deamer, 1976). Assim, supondo permeação da forma neutra de 2 AP e não-permeação da forma positivamente carregada é possível interpretarmos os resultados obtidos de forma coerente. A pH 5,8, um pouco abaixo do pK, há uma concentração de 2 AP carregada ligeiramente superior â concentração de 2 AP neutra tanto no interior quanto no meio exterior aos lipossomos. Ao iniciarmos a separação entre a 2 AP livre e a 2 AP incorporada na coluna, como a forma neutra incorporada é permeante, já se inicia, desde o topo da coluna, um certo vazamento de 2 AP neutra. Como a 2 AP neutra permeia, o equilíbrio 2 AP neutra/2 AP carregada dentro do lipossomo é deslocado no sentido de se obter mais 2 AP neutra no interior do lipossomo a qual, por sua vez, também irá vazar. Assim,

uma vez terminada a separação na coluna, teremos uma concentração de 2 AP incorporada nos lipossomos que será sempre inferior àquela que foi incorporada ao injetarmos uma solução clorofórmica de DODAC em água contendo 2-aminopiridina, o que concorda com os valores subestimados de volume interno dos lipossomos grandes de DODAC obtidos por incorporação de 2 AP. A adsorção de 2 AP à bicamada resultou praticamente nula (0,01 l/moles) em relação ao volume interno calculado pela % de incorporação (1,6 l/mol) (Fig. 24 e 26B). Assim, 2 AP seria um marcador hidrossolúvel adequado do compartimento aquoso interno por não ser adsorvido e não-adequado por ser permeante.

Tanto a alteração de fluorescência da 2 AP como a mudança de absorbância da mistura de tintas induzidas por gradiente de pH através das vesículas de DODAC apresentaram um caráter bifásico (Fig. 30 e 34). Portanto, esse caráter parece independer do método de detecção do fenômeno. Por outro lado, em ambos os métodos foram obtidas alterações dentro de uma mesma ordem de grandeza quanto à escala de tempos, o que também sugere que o mesmo fenômeno foi detectado por ambos os métodos. Considerando que os marcadores utilizados nos dois métodos são moléculas completamente diferentes (2 AP abaixo de seu pK é positivamente carregada enquanto que as tintas AB e VB são negativamente carregadas; 2 AP é uma molécula pequena enquanto que as tintas são moléculas relativamente grandes), torna-se difícil atribuir as cinéticas obtidas a propriedades inerentes aos marcadores. Além disso, as cinéticas obtidas são equiparáveis às obtidas

por Clement e Gould (1981) para a permeação de prótons em vesículas grandes de asolecitina. O fato de nossas cinéticas serem mais lentas (embora da mesma ordem de grandeza) que as desses autores pode significar que o sistema constituído pelos lipossomos grandes de DODAC seria menos permeante a H^+/OH^- que o sistema constituído pela asolecitina.

As tintas indicadoras de pH possivelmente estão fortemente adsorvidas à bicamada devido aos seus grupos sulfônicos negativos ($pK \sim 2,0$). Dessa forma, as cinéticas bifásicas obtidas poderiam ser devidas a : 1º) uma passagem rápida de H^+/OH^- pela bicamada que modificaria a absorção da tinta adsorvida na bicamada; 2º) um preenchimento do comportamento aquoso interno com H^+/OH^- mudando a absorção da tinta contida no mesmo. Todavia, como no caso da 2 AP em que o controle de adsorção de 2 AP à bicamada mostrou uma adsorção praticamente nula foi obtido também um fenômeno bifásico, exclui-se essa possibilidade de que a fase mais rápida da cinética seja devida à passagem de H^+/OH^- através da bicamada.

Outra possibilidade de interpretação das cinéticas obtidas seria a indução de floculação e/ou encolhimento dos lipossomos grandes de DODAC por adição de NaOH e/ou HCl. Floculações e/ou encolhimentos dos lipossomos resultariam em aumentos do espalhamento de luz das dispersões e consequente diminuição da fluorescência de 2 AP detectada. Entretanto, no caso das tintas indicadoras de pH, essa possibilidade está excluída uma vez que a cubeta de referência contém lipossomos sen tintas que são submetidos às mesmas

adições de NaOH/HCl que a cubeta da amostra. Isso garante que efeitos de encolhimento e/ou floculação não estejam contribuindo para os transientes de absorbância registrados.

Em conclusão, cinéticas de alteração de fluorescência da 2 AP e de alteração de absorbância das tintas podem ser interpretadas qualitativamente como cinéticas de permeação de H^+/OH^- através de lipossomos grandes de DODAC. Um estudo quantitativo do fenômeno vem sendo objeto de pesquisas sistemáticas em nosso laboratório com a finalidade de se estabelecer a dependência de constantes de velocidade aparentes do fenômeno com o gradiente de concentração de prótons e com a faixa de pH's em que se situam esses gradientes.

Provavelmente, os dois aspectos mais interessantes desse trabalho são : 1) a introdução de um critério confiável de estabilidade de vesículas sintéticas em relação a sais, isto é, a determinação de faixas de concentração de sal nas quais o comportamento de osmômetro ocorre; 2) a perspectiva de empregar métodos disponíveis para fosfolípidos para se obter novos sistemas sintéticos constituídos por detergentes nos quais propriedades funcionais de membranas podem ser sistematicamente testadas.

RESUMO

Lipossomos de cloreto de dioctadecildimetilamonio (DODAC) com $0,51\mu$ de diâmetro externo médio e transição de fase ocorrendo em uma faixa estreita de temperaturas ($0,5-1,0^{\circ}\text{C}$) foram obtidos por vaporização de clorofórmio e comparados com vesículas sonicadas de DODAC (cerca de $250 \text{ \AA}$ de diâmetro externo).

Sacarose foi impermeante através de lipossomos grandes de DODAC ou de vesículas sonicadas de DODAC podendo ser utilizada para determinações de volume interno em ambas as preparações. Volume interno aparente para lipossomos grandes de DODAC foi $9,7 \pm 1,3 \text{ l/mol}$ e para vesículas sonicadas de DODAC, $0,33 \pm 0,20 \text{ l/mol}$ (adsorção de sacarose à bicamada de, respectivamente, $0,64 \pm 0,30$ e $0,20 \pm 0,08 \text{ l/mol}$). Lipossomos grandes de DODAC comportaram-se como osmômetros em relação à sacarose e ao KCl ($0-50\text{mM KCl}$). Já as vesículas sonicadas de DODAC foram osmoticamente não-responsivas em relação à sacarose, floculando em presença de KCl. Essa não-responsividade osmótica foi interpretada como decorrente da presença única e exclusiva de água de hidratação no compartimento aquoso interno das vesículas sonicadas.

Outras propriedades de lipossomos grandes de DODAC foram análogas às apresentadas por lipossomos de fosfolípidos. Permeabilidades relativas (KCl como referência incorporado ao compartimento aquoso interno) do NaCl, HCl e sacarose foram similares às descritas para lipossomos de

fosfatidilcolina; NaCl e sacarose sendo tão impermeantes quanto o KCl e HCl, sendo ligeiramente mais permeante que o KCl. Nas vizinhanças da temperatura de transição de fase, ocorreu um acentuado aumento da velocidade inicial de encolhimento e a extensão total de encolhimento chegou a um mínimo.

A comparação de algumas propriedades físicas e funcionais de vesículas sonicadas e de lipossomos grandes de DODAC permitiu concluir que lipossomos grandes de DODAC constituem um modelo mais adequado para estudos de transporte.

Adicionalmente, o método de vaporização de clorofórmio foi testado para o dihexadecilfosfato de Na^+ (DCP) sendo obtidas dispersões homogêneas desse anfifílico capazes de incorporar um volume de 13 ± 4 l/mol e de responderem como osmômetros a gradientes osmóticos de sacarose, um soluto que praticamente não é adsorvido à bicamada de DCP e que resultou impermeante através da mesma.

ABSTRACT

Diocetadecyldimethylammonium chloride (DODAC) liposomes with 0.51μ mean external diameter and sharp phase transitions were obtained by chloroform vaporization and compared with (small) sonicated DODAC vesicles. Sucrose was impermeant through large DODAC liposomes and sonicated vesicles and was used for internal volume determinations. The apparent internal volumes for large DODAC liposomes and sonicated DODAC vesicles were, respectively, 9.7 ± 1.3 and 0.33 ± 0.20 l/mol. (External sucrose adsorption were, respectively, 0.64 ± 0.30 and 0.20 ± 0.08 l/mol). Ideal osmometer behaviour towards KCl over the 0-50mM concentrations range and towards sucrose were observed only for large DODAC liposomes. Sonicated DODAC vesicles were osmotically non responsive towards sucrose and flocculate with KCl. Other properties of large DODAC liposomes closely resembled those of phospholipid liposomes. At temperatures near the phase transition temperature, a steep increase in the initial shrinkage rate and a minimum for the total extent of shrinkage occurred. Relative permeabilities (KCl as reference entrapped inside) to NaCl, HCl and sucrose were similar to those of phosphatidyl choline liposomes. NaCl and sucrose were as impermeant as KCl, and HCl slightly more permeant than KCl. Large DODAC liposomes are proposed as an adequate synthetic membrane model, in contrast to sonicated DODAC vesicles. In addition, the chloroform vaporization method

was tested for sodium dihexadecylphosphate (DCP). Large DCP liposomes were demonstrated to be impermeant towards sucrose entrapping 13 ± 4 l/mol and behaving as an osmometer towards this solute.

REFERÊNCIAS

- Abramson, M.B., Katzman, A. e Gregor, H.P. (1964) J.Biol. Chem. 239, 70.
- Adam, N.K. (1968) "The Physics and Chemistry of Surfaces" -- New York, Dover.
- Addanki, S., Cahill, R.D. e Sotos, J.F. (1968) J.Biol.Chem. 243, 2337.
- Akimoto, A., Dorn, K., Gross, L., Ringsdorf, H. e Schupp, H. (1981) Angew.Chem.Int.Ed.Eng. 20, 90.
- Babiak, S. e Testa, A.C. (1974) J.Phys.Chem. 78, 201.
- Bader, H., Ringsdorf, H. e Skura, J. (1981) Angew.Chem. Int.Ed.Eng. 20, 91.
- Bangham, A.D. (1968) Progr.Biophys.Mol.Biol. 18, 29.
- Bangham, A.D., Hill, M.W. e Miller, M.G.A. (1974) In "Methods in Membrane Biology" (E.D. Korn, ed.), Plenum Press, New York, p. 1.
- Bangham, A.D., de Gier, J. e Greville, G.D. (1967) Chem. Phys.Lipids., 225.
- Bangham, A.D. e Horne, K.W. (1964) J.Mol.Biol. 8, 660.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. e Watkins, J.C. (1965) J.Mol. Biol. 13, 238.
- Barenkolz, Y., Amselem, S. e Lichtenberg, D. (1979) FEBS Lett. 99, 210.

- Barenholz, Y.; Gibbes, D., Litman, B.J., Goll, J.; Thompson, T.E. e Carlson, F.D. (1977) Biochemistry 16, 2806.
- Barton, P.G. (1968) J.Biol.Chem. 243, 3884.
- Batzri, S. e Korn, E.D. (1973) Biochim.Biophys.Acta 298, 1015.
- Baumgartner, E. e Fuhrhop, J.H. (1980) Angew.Chem.Int.Ed. Engl. 19, 550.
- Black, C., Joris, G.C. e Taylor, H.S. (1948) J.Phys.Chem. 16, 537.
- Blok, M.C., Van Der Neut-Kok, E.C.M.; Van Deenen, L.L.M., e De Gier, J. (1975) Biochim.Biophys.Acta. 406, 187.
- Blok, M.C., Van Deenen, L.L.M. e De Gier, J. (1976) Biochim. Biophys.Acta 433, 1.
- Bottchen, C.J.J.; Gent, C.M. e Van Pries, C. (1961) Ann. Chem.Acta 24, 203.
- Brunner, J.; Skrobal, P. e Hauser, H. (1976) Biochim.Biophys. Acta 455, 322.
- Bonner, O.D. e Choi, Y.S. (1975) J.Solution Chem. 4, 457.
- Buldt, Y. e Wohlgemuth, R. (1981) J.Membr.Biol. 58, 81.
- Burton, A.C. (1975) Eur.J.Cancer. 11, 365.
- Cafiso, D.S. e Hubbell, W.L. (1978) Biochemistry 17, 187.
- Carmona, A.M.I. (1979) Dissertação de Mestrado.- Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

- Cass, A. e Finkelstein, A. (1967) J.Gen.Physiol. 50, 1765.
- Castle, J.D. e Hubbell, W.L. (1976) Biochemistry 15, 4818.
- Chapman, D. (1975) Biomembranes 7, 1.
- Chapman, D. (1976) Q.Rev.Biophys. 8, 185.
- Chapman, D., Williams, R.M.e Ladbroke, B.D. (1967) Chem. Phys.Lipids 1, 445.
- Clement, M.R. e Gould, J.M. (1981) Biochemistry 20, 1534.
- Clement, N.R. e Gould, J.M. (1981) Biochemistry 20, 1539.
- Cole, K.S. (1968) "Membrane, Ions and Impulses" University of California Press, Berkeley, California.
- Cuccovia, I.M., Aleixo, R.M.V., Mortara, R.A., Filho, P.B., Bonilha, J.B.S., Quina, F.H.e Chaimovich, H. (1979) Tetrahedron Lett. n° 33, p. 3065.
- Cuccovia, I.M., Quina, F.H. Chaimovich, H. (1982) Tetrahedron 38, 917.
- Czarniecki, M.F.e Breslow, R. (1979) J.Am. Chem.Soc. 101, 3675.
- Darszon, A., Vanderberg, C.A., Schönfeld, M., Ellisman, M. H., Spitzer, N.C.e Montol, M. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 239.
- Davies, J.T. e Rideal, E.K. (1963) "Interfacial Phenomena" New York, Academic Press.

- Deamer, D.W. (1978) "Liposomes and Their Uses in Biology and Medicine" (D. Papahadjopoulos, ed.), Annals New York Academy of Sciences 308, 250.
- Deamer, D. e Bangham, A.D. (1976) Biochim.Biophys.Acta 443, 629.
- Deamer, D.W., Prince, R.C. e Crofts, A.R. (1972) Biochim. Biophys.Acta 274, 323.
- Deguchi, T. e Mino, J. (1978) J.Colloid Interface Sci. 65, 155.
- Demel, R.A. e De Kruyff, B. (1976) Biochim.Biophys.Acta 457, 109.
- Edelberg, R. (1953) J.Cellular Comp.Physiol. 41, 37.
- Enoch, H. e Strittmatter, P. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 145.
- Fendler, J.H. (1980) Acc.Chem.Res. 13, 7.
- Fernández, M.S. (1981) Biochim.Biophys.Acta 646, 23.
- Fettiplace, R., Andrews, D.M. e Haydon, D.A. (1981) J.Membrane.Biol. 5, 277.
- Finer, E.G. e Darke, A. (1974) Chem.Phys.Lipids 12, 1.
- Gaffney, B.J. e Mich, R.J. (1976) J.Am.Chem.Soc. 98, 3044.
- Gaines, G.L. (1966) "Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces", New York, Interscience.
- Gally, H., Niederberger, W. e Seelig, J. (1975) Biochemistry 14, 3647.
- Gebicki, J.M. e Hicks, M. (1976) Chem.Phys.Lipids 16, 142.

- Gebicki, J.M. e Hicks, M. (1973) Nature 243, 232.
- Gerson, D.F. (1978) "Cell Cycle Regulation", eds. Cameron I.L., Padilla, G.M. e Zimmerman, A.M. (Academic, New York) p. 105-131.
- Gerson, D.F. e Burton, A.C. (1977) J.Cell.Physiol. 91, 297.
- Gillies, R.J. e Deamer, D.W. (1979) "Current Topics in Bioenergetics", ed. Sanadi, R. (Academic, New York), vol. 3, p. 63-87.
- Gillies, R.J. e Deamer, D.W. (1979) J.Cell.Physiol. 100, 23.
- Goldacre, R.J. (1958) "Surface Phenomena in Chemistry and Biology", J.F. Danielli, K.G.A. Pankhurst, A.C. Rid diford (eds.), Pergamon Press, Oxford.
- Goldman, R. e Rottenberg, H. (1973) FEBS Lett. 33, 233.
- Gomperts, B.D. (1977) "The Plasma Membrane : Models for Structure and Function", Academic Press (London).
- Gorter, E. e Grendel, F. (1925) J.Exp.Med. 41, 439.
- Gutknecht, J. e Walter, A. (1981) Biochim.Biophys.Acta 641, 183.
- Haest, C.W.M., de Gier, J., van Es, G.A., Verkleij, A.J. e van Deenen, L.L.M. (1972) Biochim.Biophys.Acta 288, 43.
- Hanai, T. e Haydon, D.A. (1966) J.Theor.Biol. 11, 370.
- Haydon, D.A. (1968) "Membrane Models and the Formation of Biological Membranes" (L.Bolis and B.A. Perhice, eds.) North Holland, Amsterdam, p. 91-97.

- Haydon, D.A. e Myers, V.B. (1973) Biochim.Biophys.Acta 307, 429.
- Hamilton, R.L.Jr., Goerke, J., Gus, L.S.S., William, M.C.e Havel, R.J. (1980) J.Lipid.Res. 21, 981.
- Hargreaves, W.R. e Deamer, D.W. (1978) Biochemistry 17, 3759.
- Henglein, A., Proske, Th.e Schnecke, W. (1978) Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 82, 956.
- Henn, F.A. Thompson, T.E. (1969) Annu.Rev.Biochim. 38, 241.
- Henning, R. (1975) Biochim.Biophys.Acta 401, 307.
- Herrmann, U. e Fendler, J.H. (1979) Chem.Phys.Letters 64, 270.
- Hicks, M. e Gebicki, J.M. (1977) Chem.Phys.Lipids 20, 243.
- Huang, C. (1969) Biochemistry 8, 344.
- Hub, H.H., Hupfer, B., Koch, H.e Ringsdorf, H. (1980) Angew.Chem.Int.Ed.Eng. 19, 938.
- Inoue, K. (1974) Biochim.Biophys.Acta 339, 390.
- Israelachvili, J.N., Marcelja, S.e Horn, R.G. (1980) Q.Rev.Biophys. 13, 121.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J.e Ninham, B.W. (1976) J.Chem.Soc.Faraday.Trans.II. 72, 1525.
- Jacobson, K. e Papahadjopoulos, D. (1975) Biochemistry 14, 152,

- Jagendorff, A.T. (1975) "Bioenergetics of Photosynthesis", ed. Govindjee (Academic, New York), p. 423-492.
- Jain, M.H. (1972) "The Bimolecular Lipids Membrane. A system", Van Nostrand, Reinhold Co., New York.
- Jain, M.K. e Wagner, R.C. (1980) "Introduction to Biological Membranes", Wiley - Interscience, New York.
- Janiak, M.J.; Small, D.M. e Shipley, G.G. (1976) Biochemistry 15, 4575.
- Janiak, M.J., Small, D.M. e Shipley, G.G. (1979) J.Biol. Chem. 254, 6068.
- Johnson, S.M. e Buttress, N. (1973) Biochim.Biophys.Acta, 307, 20.
- Johnson, R.G. e Scarpa, A. (1976) J.Gen.Physiol. 68, 601.
- Kajiyama, T., Kumano, A., Takayanagi, M.; Okahata, Y. e Kunitake, T. (1979) Chem.Lett. 645.
- Kano, K. e Fendler, J.A. (1979) Chem.Phys.Lipids 23, 189.
- Kano, K., Romero, A., Djermouni, B., Ache, H. e Fendler, J.H. (1979) J.Am.Chem.Soc. 101, 4030.
- Kantor, H.L., Mabrey, S., Prestegard, J.H. e Sturtevant, J.M. (1977) Biochim.Biophys.Acta 466, 402.
- Katchalsky, A. e Cursan, P.F. (1967) "Non Equilibrium Thermodynamics in Biophysics", p. 713, Haward University Press, Boston.
- Kinsky, S.C. (1974) "Methods in Enymology" (S.Fleischer

- and L. Parker, eds.), Academic Press, New York, 32, p. 501.
- Korenbrot, J.I. (1977) Ann.Rev.Physiology. 39, 19.
- Kornberg, R.D. e McConnell, H.M. (1971) Biochemistry 10, 1111.
- Kornberg, R.D. McNamee, M.G. e McConnell, H.M. (1972) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 69, 1508.
- Kremer, J.M.H., Esker, M.W.J.v.d., Pathmamanoharan, C. e Wierseman, P.H. (1977) Biochemistry 16, 3932.
- Kunitake, T., Nakashima, M., Hayaskida, S., Yonemori, K. (1979) Chem.Lett., 1413.
- Kunitake, T., Nakashima, M. e Morimitsu, K. (1980b) Chem.Lett, 1347.
- Kunitake, T., Nakashima, N., Shimomura, M. e Okahata, Y. (1980a) J.Am .Chem.Soc. 102, 6642.
- Kunitake, T. e Okahata, Y. (1977) Chem.Lett, 1337.
- Kunitake, T. e Okahata, Y. (1977) J.Am .Chem.Soc. 99, 3860.
- Kunitake, T. e Okahata, Y. (1978) Bull.Chem.Soc.Jpn. 51, 1877.
- Kunitake, T. e Okahata, Y. (1980) J.Am.Chem.Soc. 102, 549.
- Kunitake, T., Okahata, Y., Tamaki, K., Takayanagi, M. e Kuma-
mura, F. (1977) Chem.Lett., 387.
- Kunitake, T. e Sakamoto, T. (1978) J.Am.Chem.Soc. 100, 4615.

- Kunitake, T. e Yamada, S. (1978) Polymer Bull. 1, 35.
- Ladbrooke, B.D. e Chapman, D. (1969) Chem.Phys.Lipids 3, 304.
- Lakshminarayanaiah, N. (1974) In "Electrochemistry, Vol. 4, Specialist Periodical Reports", (E.H. Thrisk, ed.), The Chemical Society, London, p. 167.
- Lakshminarayanaiah, N. (1975) In "Electrochemistry, Vol. 5, Specialist Periodical Reports", (E.H. Thrisk, ed.), The Chemical Society, London, p. 132.
- Lakshminarayanaiah, N. (1979) "Transport Phenomena in Membranes", Academic Press, New York.
- Langmuir, I. (1920) Trans.Faraday.Soc. 15 III, 62.
- Larrabee, A.L. (1979) Biochemistry 18, 3321.
- Lee, A.G. (1977a) Biochim.Biophys.Acta 472, 237.
- Lee, A.G. (1977b) Biochim.Biophys.Acta 472, 285.
- Lelkes, P.I. (1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 90, 656.
- Lichtenberg, D., Freire, E., Schmidt, C.F., Barenholz, Y., Felgner, P.L. e Thompson, T.E. (1981) Biochemistry 20, 3462.
- Litman, B.J. e Thompson, T.E. (1967) Fed.Proc. 26, 834.
- Luzzati, V. (1968a) Biol.Membr. 1, 71.
- Luzzati, V.; Gulik-Krzywicki, T. e Tardieu, A. (1968b) Nature (London) 218, 199.
- Luzzati, V. e Husson, F. (1962) J.Cell.Biol. 12, 207.
- MacDonald., R.C., Simon, S.A. e Baer, E. (1976) Biochemistry 15, 885.

- Marcelja, S. (1974a) J.Chem.Phys. 60, 3599.
- Marcelja, S. (1974b) Biochim.Biophys.Acta 367, 165.
- Martonosi, M.A. (1974) FEBS Lett. 47, 327.
- Menger, F.M., Jerkunica, J.M.e Johnston, J.C. (1978) J.Am. Chem.Soc. 100, 4675.
- Milsmann, M.H.W., Schwendener, R.A.e Weder, H.G. (1978) Biochim.Biophys.Acta 512, 147.
- Mimms, L.T., Zampghi, G., Nozaki, Y., Tanford, C.e Reynolds, J.A. (1981) Biochemistry 20, 833.
- Mitchell, P. (1966) Biol.Rev.Cambridge Philos.Soc. 41, 445.
- Montal, M. e Mueller, P. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 3561.
- Mortara, R.A., Quina, F.H.e Chaimovich, H. (1978) Biochem. Biophys.Res.Comm. 81, 1080.
- Mueller, P. e Rudin, D.O. (1969) "Laboratory Techniques in Membrane Biophysics" (H. Passow and R. Stampfli, eds.) Springer, Berlin, p. 141-156.
- Mueller, P.; Rudin, D.O., Tien, H.T.e Wescott, W.C. (1962a) Nature 194, 979.
- Mueller, P.; Rudin, D.O., Tien, H.T.e Wescott, W.C. (1962b) Circulation, 26, 1167.
- Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T.e Wescott, W.C. (1963) J.Phys.Chem. 67, 534.
- Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T.e Wescott, W.C. (1964) Science 1, 379.

- Murakami, Y., Nakano, A. e Fukuya, K. (1980) J. Am. Chem. Soc. 102, 4253.
- Nagamura, T., Mikara, S., Okahata, Y., Kunitake, T. e Matsuo, T. (1978) Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 82, 1093.
- Nagamura, T., Takeyama, M. e Matsuo, T. (1981) J. Phys. Chem. In press.
- Nichols, J.W. e Deamer, D.W. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455, 269.
- Nichols, J.W. e Deamer, D.W. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2038.
- Nichols, J.W., Hill, M.W., Bangham, A.D. e Deamer, D.W. (1980) Biochim. Biophys. Acta 596, 393.
- Nichols, P. Miller, N. (1974) Biochim. Biophys. Acta 356, 184.
- Nozaki, Y. e Tanford, C. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4324.
- O'Brien, D.F., Whitesides, T.H. e Klingbiel, R.T. (1981) J. Polym. Sci. Polym. Lett. 19, 95.
- Okahata, Y. e Kunitake, T. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 5231.
- Okahata, Y. e Kunitake, T. (1980) Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 84, 550.
- Oldfield, E., Marsden, J. e Chapman, D. (1971) Chem. Phys. Lipids 7, 199.
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J. e Papahadjapoulos, D. (1979) Biochim. Biophys. Acta 557, 9.

- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S. e Irac, T. (1973) Biochim.Biophys.Acta. 311, 330.
- Papahadjopoulos, D., Nir, S. e Ohki, S. (1971) Biochim.Biophys.Acta. 266, 561.
- Papahadjopoulos, D. e Watkins, J.C. (1967) Biochim.Biophys. Acta 135, 639.
- Papahadjopoulos, D., Wilson, T. e Taber, R. (1980) "Transfer of Cell Constituents into Eukaryotic Cells", Celis, J.H. Graessman, A. and Loyter, A., Ed., N.Y., Plenum Press, 155-172.
- Pick, U., Rottenberg, H. e Avron, M. (1974) "Proceedings of the 3rd Internacional Congress on Photosynthesis", ed. Avron, M. (Elsevier, Amsterdam), p. 967-974.
- Racker, E. (1972) Am.Sci. 60, 56.
- Racker, E. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 55, 224.
- Racker, E. e Hinckle, P.C. (1974) J.Membrane Biol. 17, 181.
- Razin, S. (1972) Biochim.Biophys.Acta 265, 241.
- Reeves, J.P. e Dowben, R.M. (1969) J.Cell.Physiol. 72, 49.
- Reeves, J.P. e Dowben, R.M. (1970) J.Membr.Biol. 3, 123.
- Regen, S.L., Czech, B. e Singh, A. (1980) J.Am.Chem.Soc. 102, 6638.
- Regen, S.L., Singh, A., Ochme, G. e Singh, M. (1981) J.Am. Chem.Soc. 103.

- Rendi, R. (1965) J.Cell.Biol. 27, 83A.
- Rendi, R. (1967) Biochim.Biophys.Acta 135, 333.
- Rhoden, V. e Goldin, S.M. (1979) Biochemistry 18, 4163.
- Robertson, J.D. (1960) Progr.Biophys.Chem. 10, 343.
- Robins, D.C. e Thomas, I.L. (1963) J.Pharm.Pharmacol. 15, 157.
- Rottenberg, H. (1979) Methods Enzymol. 55F, 547.
- Rottenberg, H.; Grunwald, T. Avron, M. (1972) Eur.J.Biochem. 25, 54.
- Rouser, G., Nelson, G.J., Fleischer, S. e Simon, G. (1968) "Biological Membranes", Chapman, D. (Editor), chap. 2 : 5-69, New York, Academic.
- Salsbury, M.J.; Darke, A. e Chapman, D. (1971) Chem.Phys.Lipids 8, 142.
- Schales, O. e Schales, S.S. (1941) J.Biol.Chem. 140, 879.
- Schatzberg, P. (1965) J.Polym.Sci. 10C, 87.
- Schenkman, S. (1981) - Tese de Doutorado - Instituto de Química da USP.
- Schenkman, S., Araujo, P.S., Dijkman, R., Quina, F.H. e Chaimovich, H. (1981) Biochim.Biophys.Acta 649, 633.
- Schenkman, S., Araujo, P.S., Sesso, A., Quina, F.H. e Chaimovich, H. (1981) Chem.Phys.Lipids 28, 165.
- Schieren, H., Rudolph, S., Finkelstein, M., Coleman, P. e Weismann, G. (1978) Biochim.Biophys.Acta 542, 137.

Schindler, H. e Seelig, J. (1975) Biochemistry 14, 2283.

Schullery, S.E., Schmidt, C.F., Felgner, P., Tillack, T.W. e
Thompson, T.E. (1980) Biochemistry 19, 3919.

Seelig, A. e Seelig, J. (1974) Biochemistry 13, 4839.

Seelig, J. e Seelig, A. (1980) Q.Rev.Biophys. 13, 19.

Sheetz, M.P. e Chan, S.F. (1972) Biochemistry 11, 4573.

Snell, F.D. e Snell, C.T. (1937) "Calorimetric Methods of
Analysis", Vol. II, p. 557, D.Van Nostrand Company, Inc.
(N.Y.) .

Sogor, B.V. e Zull, J.E. (1975) Biochim.Biophys.Acta 375,
363.

Stein, J.M., Tourtellote, M.E., Reinhart, J.C., McElhaney, R.
N.e Pader, R.L. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 63, 104.

Stoeckenius, W. (1962) J.Cell.Biol. 12, 221.

Sturtevant, J.M. (1974) "Quantum Statistical Mechanics in
the Natural Sciences" (B. Kursunoglu, S. Mintz e S. Wid-
meyer, eds.) Plenum Press, New York, p. 63.

Suurkuusk, J., Lentz, B.R., Barenholz, Y., Biltonen, R.L.e
Thompson, T.E. (1976) Biochemistry 15, 1393.

"
Sudhölter, E.J.R., Engberts, J.B.F.N.e Hoekstra, D. (1980)
J.Am.Chem.Soc. 102, 2467.

Suurkuusk, J., Lentz, B.R., Barenholz, Y., Biltonen, R.e Thomp
son, T.E. (1976) Biochemistry 10, 2106.

- Szoka, F.Jr., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Maykew, E. e Papahadjapoulos, D. (1980) Biochim.Biophys.Acta 601, 559..
- Szoka, F.Jr. e Papahadjapoulos, D. (1978) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 75, 4194.
- Takemoto, H., Inoue, S., Yasunaga, T., Sukigara, M.e Toyoshima, Y. (1981) J.Phys.Chem. 85, 1032.
- Tanford, C. (1980) "The Hydrophobic Effect:Formation of Micelles and Biological Membranes", 2nd Edition, Wiley, Interscience, New York.
- Teorell, T. (1956) Discuss Faraday Soc. 21, 9.
- Tien, H.T. (1974) "Bilayer Lipid Membranes (BLM):Theory and Practice", Marcel Dekker, New York.
- Tien, H.T. (1976) Photochem.Photobiol. 24, 97.
- Tien, H.T. (1979) "Photosynthesis in Relation to Model Systems"(J.Barber, Ed.), Elsevier, Amsterdam, p. 115.
- Toll, L. e Howard, B.D. (1978) Biochemistry 17, 2517.
- Tran, C.D., Klahn, P.L., Romero, A.e Fendler, J.H. (1978) J.Am.Chem.Soc. 100, 1622.
- Tundo, P., Kippenberg, D.J., Prieto, N.E., Klahn, P.L.e Fendler, J.H. (1981b) Angew.Chem.Int.Ed.Engl.
- Tundo, P., Prieto, N.E., Kippenberger, D.J., Klahn, P.L., Kurihare, K., Politi, M.e Fendler, J.H. (1981c) J.Am. Chem.Soc. 103.

Tundo, P., Kippenberger, D.J., Klahn, P.L. e Fendler, J.H.

(1981a) J.Am.Chem.Soc. 103.

Tundo, P., Kurihara, K., Prieto, N.E., Kippenberger, D.J.,

Politi, M. e Fendler, J.H.; (1981d) J.An.Chem.Soc. 103,

Van Deenen, L.L.M. (1981) FEBS Lett. 123, 3.

Van Diyck, P.W.M., Ververgaert, P.H.J.T., Verkleij, A.J., Van

Deenen, L.L.M. e De Gier, J. (1975) Biochim.Biophys.Acta 406, 465.

Van Holde, K.E. (1975) "Espalhamento" em "Bioquímica Física",

Tradução : Alexandre Matos de Souza Melo - São Paulo,
Edgard Blücher; Brasília, INL.

Vaughan, D.J. e Keough, K.M. (1974) FEBS Lett. 47, 158.

Verkleij, A.J., De Kruyff, B., Ververgaert, P.H.J.T., Tocanne,

J.F. e Van Deenen, L.L.M. (1974) Biochim.Biophys.Acta 339, 432.

Waggoner, A.S. (1976) J.Membr.Biol. 27, 317.

Watts, A., Marsh, D. e Knowles, P.F. (1978) Biochemistry

17, 1792.

Weisstuch, A. e Testa, A.C. (1968) J.Phys.Chem. 72, 1982.

Zumbuehl, O. e Weder, H.G. (1981) Biochim.Biophys.Acta

640, 252.