

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

PROPRIEDADES DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES

David Domingues Pavanelli

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário José Politi

SÃO PAULO
Data do Depósito do Trabalho na SPG: 22 / 05 / 2006

Agradecimentos

Ao Xuds, pela orientação e amizade, conversas científicas e outras.

Ao pessoal do B10, em especial Flavião, Paradise, Paulinha e Guilherme e Márcia pela amizade.

Ao pessoal do B12 e egressos, em especial, Revi, Abácas, Mimas, Decião, Xá, Mandela, Greg, Luiz, Pí, Marcão, pela amizade e pelas risadas.

À Sílvia, sempre muito alto astral.

Aos professores Maurício, Iolanda, Hernan e Pedro pelo coleguismo.

À Profa. Dra. Rosângela Itri, pelo coleguismo e disponibilização da linha de espalhamento de raio-X a baixo ângulo para experimentos.

Ao Prof. Dr. Watson Loh, pela disponibilização do equipamento de calorimetria diferencial de varredura para experimentos.

Ao meu pai e aos meus irmãos Dante e Daniela, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

E à minha maior incentivadora, crítica e entusiasta, minha esposa Karina.

Resumo

A estabilidade de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) foi monitorada através de microscopia de contraste de fase e de fluorescência, com o auxílio de gradientes de açúcares, do fluoróforo 1,3,6,8 pireno tetrasulfonato de sódio (PTS), do supressor de fluorescência cloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (MV) e do análogo lipídico fluorescente 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino) dodecanoil-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (NBD-PC). Uma grande variabilidade no comportamento individual das GUVs foi obtida no que tange a: (i) manutenção do meio interno; (ii) interações da bicamada lipídica com superfícies e; (iii) estruturas lipídicas conectadas à bicamada.

Os resultados experimentais podem ser explicados pelo aparecimento de poros transientes formados pelo aumento da tensão da bicamada lipídica das GUVs. Após o processo de geração de tensão na bicamada, poros são abertos para relaxação desta tensão, com concomitante efluxo da solução internalizada pela GUV, devido a pressão de Laplace. Com a diminuição do volume interno, a tensão da bicamada é relaxada e o fechamento dos poros guiado pela tensão de linha, minimizando o componente energético de curvatura dos lipídios nas bordas do poro.

O modelo de poros transientes explica resultados como troca de massa entre meios interno e externo das GUVs, possibilidade da existência de fluxos unilaterais em GUVs, transitoriedade dos poros, diâmetro limite dos poros e manutenção do meio interno em GUVs após abertura e fechamento de poros.

Abstract

The stability of giant unilamellar vesicles (GUVs) has been monitored by phase contrast and fluorescence microscopy, using sugar gradients, sodium 1,3,6,8-pyrene tetrasulfonate (PTS) as fluorescent probe, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride (MV) as fluorescence quencher and 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino) dodecanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (NBD-PC) as fluorescent lipid analog. An accentuated variability in the individual behaviour of GUVs was observed as far as (i) stability of encapsulation; (ii) lipid bilayer-surface interactions and; (iii) lipid structures connected to GUVs are concerned.

Experimental results can be explained by transient pores formation due to an increase in lipid bilayer tension. After processes of bilayer tension generation, pores are opened, while effluxes of GUVs internal solution are promoted by Laplace pressure. With the internal volume decrease, bilayer tension is relaxed and pores closure guided by line tension, minimizing the energetic component of lipid curvature in pore edges.

Transient pores model explains experimental results such as mass exchange between internal and external GUVs media, GUVs effluxes, pores' lifetime, pores diameter's limit and stability of GUV encapsulation after opening and closure of pores.

Glossário de Símbolos

- A = área da bicamada
 A^* = área de contato
 A^{ext}, A^{int} = áreas das monocamadas externa e interna
 A_p = área projetada
 c_0 = curvatura espontânea
 c_1, c_2 = curvaturas principais
 d = distância bicamada-superfície ou distância de separação intermembranar
- DMPC = dimiristoil fosfatidilcolina
DOPC = dioleil fosfatidilcolina
DPPC = dipalmitoil fosfatidilcolina
DSPC = diestearoil fosfatidilcolina
 e = espessura da bicamada
 $E_p(r)$ = energia do poro
 f_μ = energia de cisalhamento por unidade de área
 f_κ = energia de esticamento por unidade de área
 f_c = energia de curvatura por unidade de área
 g = genus da superfície
 gli = glicose
 H = curvatura média
 K = curvatura gaussiana
 k_a = módulo elástico de expansão de área
 k_B = constante de Boltzmann
 k_c = módulo elástico de dobramento
 \bar{k}_c = módulo elástico de dobramento Gaussiano
 k_{nl} = módulo elástico de dobramento não-local
 l_i, l_i^0 = comprimentos das membranas depois e antes de deformações
MV = cloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio
NBD-PC = 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino) dodecanoil-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina

N^{ext}, N^{int} = moléculas lipídicas nas monocamadas externa e interna

PTS = 1,3,6,8 pireno tetrasulfonato de sódio

Q = fluxo

q = vetor de onda

r = raio do poro

R_1 = raio de curvatura 1

R_2 = raio de curvatura 2

R_c = raio de curvatura de contorno

S = superfície

sac = sacarose

T = temperatura

T_C = temperatura de transição de fase

V_{fl} = potencial de flutuação

V_L = velocidade de vazamento no centro do orifício

W = potencial de adesão

σ = tensão da bicamada

\mathfrak{S} = tensão de linha

η = viscosidade

μ = módulo de cisalhamento

ζ = expoente de rugosidade

ρ = densidade

\angle = raio de um disco membranar

τ = tempo característico

ξ_{\perp} = amplitude vertical das flutuações térmicas

$\xi_{||}$ = comprimento de correlação lateral

∇^2 = operador de Laplace

ϑ_{eff} = ângulo de contato efetivo

$\lambda_i = l_i/l_i^0$ = relações entre os comprimentos da membrana

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de estruturas de agregados anfífilos em água.

Figura 2. (i) Estrutura do fosfolípido dioleil fosfatidilcolina (DOPC). (ii) a) Modelo estrutural de uma vesícula. b) Observação de uma vesícula unilamelar gigante (GUV).

Figura 3. As três deformações básicas de um elemento de membrana considerado como uma superfície matemática.

Figura 4. Diferentes modelos de poros em bicamadas lipídicas.

Figura 5. Potencial de interação total.

Figura 6. Estruturas moleculares dos fluoróforos e do supressor de fluorescência utilizados.

Figura 7. Decaimento de intensidade de fluorescência do meio interno de GUV.

Figura 8. Representação gráfica do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante.

Figura 9. Representação gráfica do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante.

Figura 10: Representação gráfica da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs.

Figura 11: Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs.

Figura 12. Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV.

Figura 13. Imagens de GUV apresentada na figura 12.

Figura 14: Redução da área meridional em vesículas gigantes.

Figura 15. Monitoramento da intensidade de fluorescência de soluções de PTS e PTS/MV em fluorímetro.

Figura 16. Monitoramento da intensidade de fluorescência de soluções de PTS e PTS/MV em microscópio.

Figura 17: Diferentes GUVs após decaimento total da intensidade de fluorescência do meio interno.

Figura 18: Diferentes modos de observação da mesma GUV.

Figura 19. Mancha fluorescente em área adjacente à GUV.

Figura 20. Evidências de interação bicamada-superfície.

Figura 21. Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante.

Figura 22. Observação de estruturas lipídicas em GUVs contendo NBD-PC.

Figura 23: Observação de estruturas lipídicas em GUVs contendo NBD-PC.

Figura 24. Monitoramento de GUV de DPPC.

Figura 25. Monitoramento de GUV de DPPC.

Figura 26. Perda de contraste de GUV de DPPC em campos fotografados sob contraste de fase.

Figura 27. GUVs de DPPC em campos fotografados sob contraste de fase.

Figura 28. Gráficos de intensidade de fluorescência por tempo.

Figura 29. Espectros de excitação e emissão de fluorescência normalizados.

Figura 30: GUV em xerogel.

Figura 31. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs em “xerogéis”.

Figura 32. GUV em “xerogel” fotografada sob constante irradiação de excitação de PTS.

Figura 33. Irradiação de xerogel de PTS em sacarose com radiação UV constante em objetiva 40x.

Figura 34. Espectros de excitação e de emissão de “xerogel” de PTS em sacarose durante irradiação constante em 370nm.

Figura 35. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUV.

Figura 36. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUV.

Figura 37. Estabilidade de GUVs.

Figura 38. Estabilidade de GUVs.

Figura 39. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUV.

Figura 40. Termogramas de suspensões lipídicas de DMPC.

Figura 41. Gráfico de espalhamento de raio-X de vesículas vortexadas e extrudadas.

Figura 42: Gráfico de espalhamento de raio-X de vesículas extrudadas e eletroformadas.

ÍNDICE

1 – Introdução.....	1
1.1. Termos de curvatura das bicamadas lipídicas.....	6
1.2. Flutuação térmica de bicamadas lipídicas.....	7
1.3. Termos de energia das bicamadas lipídicas.....	10
1.3.1. Elasticidade de bicamadas lipídicas.....	10
1.3.2. Modelo de elasticidade de diferença de área com curvatura espontânea (ADE-SC).....	12
1.3.3. Potencial de Flutuação.....	13
1.3.4. Adesão de bicamadas lipídicas.....	15
1.4. Poros em bicamadas lipídicas.....	20
1.5. Morfologia de bicamadas lipídicas fechadas.....	24
2 – Materiais e Métodos.....	25
3 – Objetivos.....	31
4 – Resultados.....	32
4.1. Decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Possível foto-indução.....	34
4.2. Aumento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Relação com mudanças morfológicas.....	39
4.3. Foto-estabilidade de soluções de PTS e PTS/MV.....	41
4.4. Manutenção do gradiente de açúcares em GUVs que sofreram decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno.....	44
4.5. Impermeabilidade de PTS através da bicamada lipídica de GUVs.....	45
4.6. Interação bicamada-superfície.....	47
4.7. Estruturas lipídicas adjacentes às GUVs.....	51
4.8. Mudanças morfológicas de bicamadas lipídicas de GUVs.....	54
4.9. Comparação com o modelo biomimético LUV.....	57
4.10. Fotoquímica do PTS em xerogéis de açúcares.....	61
4.11. Estabilidade apresentada por GUVs.....	66

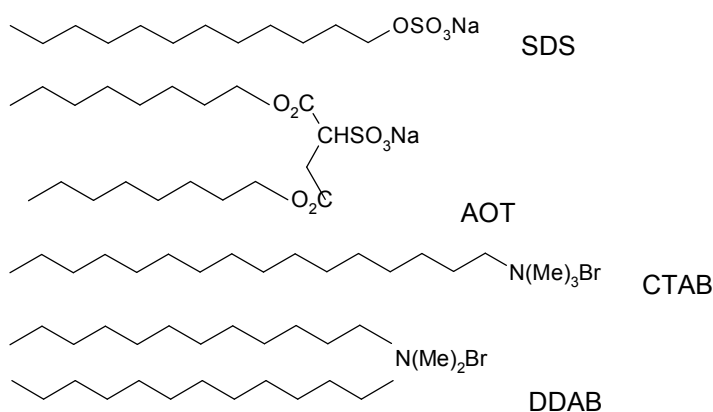
5 – Discussão.....	72
5.1. Estruturas de bicamadas lipídicas de GUVs.....	74
5.2. Decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Possível foto-indução.....	75
5.3. Aumento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Relação com mudanças morfológicas.....	78
5.4. Manutenção do gradiente de açúcares em GUVs que sofreram decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno.....	79
5.5. Interação bicamada-superfície.....	80
5.6. Comparação com o modelo biomimético LUV.....	81
5.7. Fotoquímica do PTS.....	82
6 – Conclusão.....	83
7 – Apêndice.....	84
7.1. Calorimetria diferencial de varredura.....	84
7.2. Espalhamento de raio-X a baixo ângulo.....	87
8 – Referências.....	91

1 – INTRODUÇÃO

Os anfifílicos são moléculas que possuem propriedades hidrofóbicas e propriedades hidrofílicas em partes diferentes de sua estrutura, sendo em geral grupamentos polares ligados à cadeias apolares.

Os anfifílicos apresentam grande variedade de estruturas moleculares, podendo ser divididos em 3 classes (EVANS e WENNERSTRÖM, 1999):

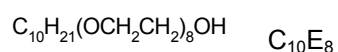
- Iônicos: moléculas como alquil sulfato de sódio, 1,4 dialquil, 3 sulfosuccinato de sódio, brometo de alquil trimetil amônio e brometo de dialquil dimetil amônio. Exemplos:



- Zwitteriônicos: moléculas como dialquil fosfatidilcolinas. Exemplos:

DOPC, DMPC, DPPC.

- Não iônicos: moléculas como alquil etileno glicol. Exemplo:



Os anfifílicos podem formar diferentes estruturas de agregação. Alguns exemplos destas estruturas são apresentados na figura 1.

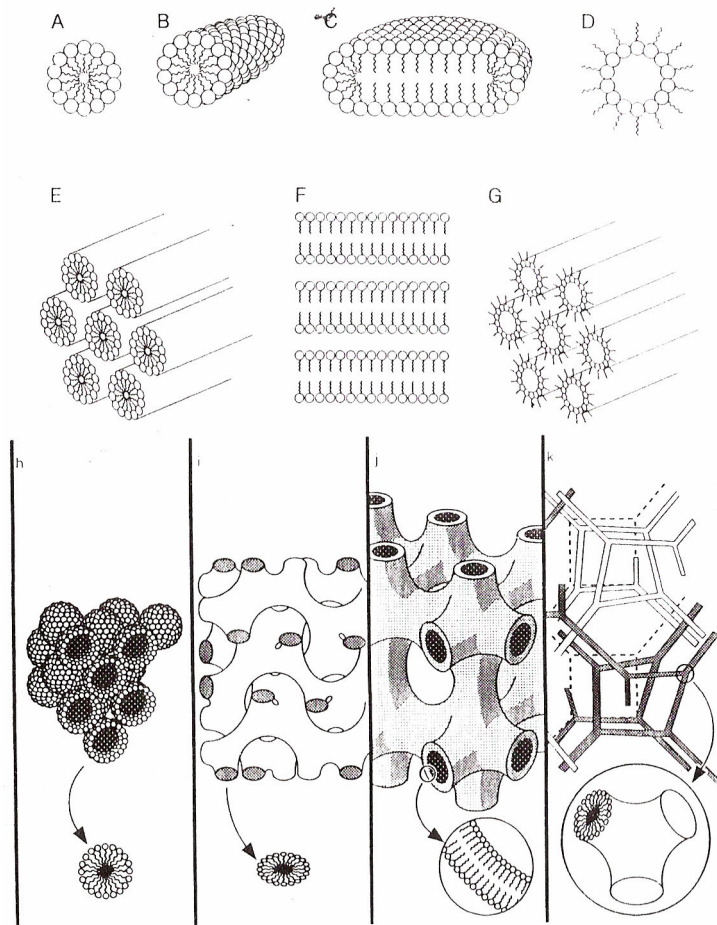


Figura 1. Exemplos de estruturas de agregados anfífilos em água. A) micela esférica; B) micela cilíndrica; C) micela discóide; D) micela reversa; E) fase hexagonal I; F) fase lamelar; G) fase hexagonal II; H) empacotamento cúbico denso de micelar; I) superfície mínima periódica tripla; J) fase prolamelar bicontínua; K) fase cúbica Q. (extraído de LASIC, 1995).

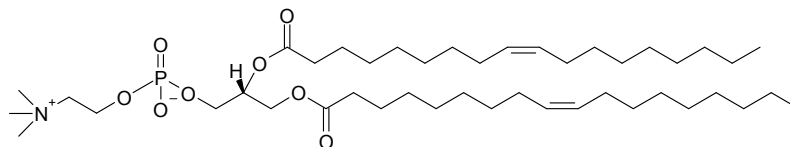
Conforme exemplos apresentados na figura 1, uma grande variedade de agregados pode ser formada devido à grande variedade estrutural dos anfífilos. Possíveis estruturas podem ser restringidas em função do anfílico manter suas regiões polares e apolares arranjadas favoravelmente.

Variáveis do anfílico tais como volume hidrofóbico, comprimento de cadeia e área do grupamento polar (considerados como parâmetro do anfílico), relacionados a variáveis do meio como composição, temperatura e força iônica podem indicar as estruturas preferenciais de agregação dos anfílicos em determinado meio.

Uma das classes mais estudadas de anfífilos são os fosfolípidos. Estas moléculas são os principais componentes das membranas celulares.

Em temperatura ambiente e em solução aquosa, os fosfolípidos se auto-arranjam em bicamadas. Normalmente, estas bicamadas se fecham formando estruturas chamadas vesículas ou lipossomos, evitando um termo energético da borda das bicamadas devido a reestruturação espacial das moléculas de fosfolípidos para a proteção das cadeias hidrocarbônicas apolares do contato com a água. A figura 2 apresenta a estrutura típica de um fosfolípido e o modelo de bicamada lipídica e de vesícula, estruturas formadas por este anfílico em água.

(i)



(ii)

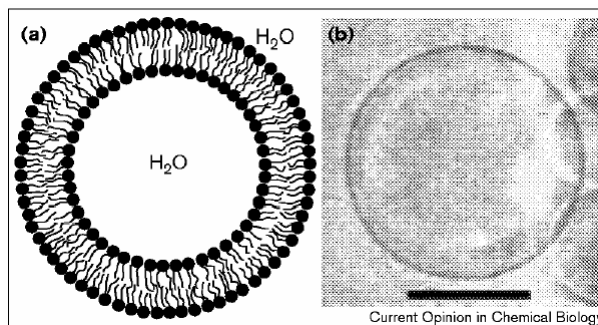


Figura 2. (i) Estrutura do fosfolípido dioleil fosfatidilcolina (DOPC). (ii) a) Modelo estrutural de uma vesícula. A bicamada lipídica formada pela agregação dos fosfolípidos separa o interior aquoso da vesícula do meio externo aquoso. b) Observação de uma vesícula unilamelar gigante (GUV). A linha mais escura na foto indica a localização da bicamada lipídica. (extraído de MENDER e KEIPER, 1998)

Os agregados vesiculares são normalmente classificados de acordo com seu tamanho, lamelaridade (número de bicamadas presente no agregado) e método de formação, conforme apresentado a seguir:

- Vesículas unilamelares pequenas (SUV): diâmetro variando de ~25-100nm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas por sonicação de suspensões lipídicas em água.

- Vesículas unilamelares grandes (LUV): diâmetro variando de 100-400nm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas pela extrusão de suspensões aquosas por membranas contendo pequenos poros de diâmetros definidos.
- Vesículas multilamelares (MLV): diâmetro variando de ~200nm-vários micrômetros, apresentando duas ou mais bicamadas lipídicas concêntricas. São formadas pela hidratação de filmes lipídicos.
- Vesículas unilamelares gigantes (GUV): diâmetros > 1µm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas por hidratação de filmes lipídicos e por eletroformação.

Os diferentes agregados vesiculares, devido a suas estruturas de bicamadas lipídicas, têm sido utilizados como sistemas biomiméticos, ou seja, sistemas que mimetizam as interações e processos ocorridos nas membranas biológicas.

As membranas biológicas são matrizes complexas, organizadas na forma de bicamadas lipídicas compostas principalmente de lipídios e proteínas, que separam o conteúdo de células ou compartimentos celulares de seus meios externos. A conexão das propriedades dinâmicas de componentes lipídicos e protéicos de membranas é considerada como importante na regulação de maquinarias celulares complexas como transdução de sinais e transporte nas membranas.

As vesículas unilamelares gigantes (GUVs) têm sido consideradas sistemas modelo no estudo da dinâmica de lipídios (KORLACH et al, 1999), da formação de domínios lipídicos (BAGATOLLI e GRATTON, 2000; BAUMGART et al., 2003), das propriedades elásticas de membranas lipídicas e mudança de formas vesiculares (DÖBEREINER et al., 1997) e da dinâmica, funcionalidade e atividade de proteínas de membranas (DOEVEN et al. 2005, GIRARD et al, 2004, MANNEVILLE et al., 2001; KAHYA et al., 2001; KAHYA et al., 2002).

GUVs podem ser facilmente manipuladas e levaram a um entendimento significativo de propriedades de membranas celulares como adesão e deformação (SEIFERT e LIPOWSKY, 1990) e importantes

características dinâmicas e estruturais de muitos processos celulares incluindo endocitose, exocitose, fusão celular e infecção viral (LIPOWSKY, 1991; MENGER e ANGELOVA, 1998). GUVs também permitem a visualização de mudanças morfológicas e a dinâmica da reorganização da membrana.

GUVs podem ser consideradas um modelo biomimético mais realístico quando comparadas aos modelos sub-microscópicos, pois características como flutuações térmicas, tensão de bicamada e curvatura podem ter um papel significativo nas propriedades de membrana e nas interações lipídio-proteína e inter-proteínas.

O trabalho apresentado nas próximas seções se baseia na caracterização de fenômenos observados em GUVs. Desta forma, a seguir serão apresentadas descrições físicas e algumas propriedades e fenômenos já descritos em GUVs.

1.1. – Termos de curvatura das bicamadas lipídicas

Uma bicamada lipídica de 4nm de espessura em uma vesícula unilamelar gigante (GUV) de 40 μ m diâmetro pode ser descrita como uma superfície bidimensional inserida num espaço tridimensional. Qualquer superfície assim descrita pode ser localmente caracterizada por dois raios de curvatura, R_1 e R_2 . Destes raios podem ser derivadas a curvatura média (H) e a curvatura gaussiana (K):

$$H = \left[\frac{\left(\frac{1}{R_1} \right) + \left(\frac{1}{R_2} \right)}{2} \right] \text{ e } K = \left(\frac{1}{R_1 \times R_2} \right)$$

As deformações das membranas também podem ser expressas em função dos raios de curvatura, conforme apresentado na figura abaixo.

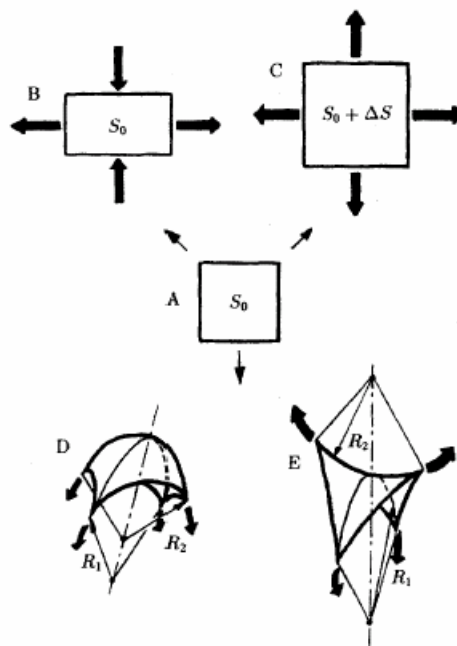


Figura 3. As três deformações básicas de um elemento de membrana considerado como uma superfície matemática. A) O estado não deformado do elemento de membrana é considerado plano. B) A deformação por cisalhamento ocorre quando forças tangenciais paralelas ao lado da membrana são aplicadas sob área constante. C) Forças tangenciais perpendiculares aos lados da membrana aumentam ou diminuem a área da membrana sob curvatura constante. D) e E) representam as deformações de dobramento que ocorrem quando forças aplicadas à membrana estão fora do plano da membrana, no caso de curvaturas Gaussianas positivas (D) ou negativas (E). (extraído de MÉLÉARD et al. 1998)

1.2. – Flutuação térmica de bicamadas lipídicas

Por volta de 1890 os movimentos rítmicos em células vermelhas do sangue em suspensão já podiam ser observados por microscopia. Hipóteses para a explicação do fenômeno se dividiam em duas classes:

- derivado de propriedades fundamentais de matéria viva, como processos de oxidação e redução de hemoglobina; relação com o metabolismo de glicose da hemácea e;
- derivado de processos não relacionados com processos ativos biológicos, onde os movimentos vibratórios seriam resultantes da agitação térmica, ou seja, resultante do movimento browniano, ou do choque de moléculas nos dois lados da fina membrana celular.

Historicamente, a primeira medida de uma constante de membranas naturais foi realizada por BROCHARD e LENNON (1975). O fenômeno chamado de “flickering” é fisicamente análogo às flutuações térmicas de GUVs.

Brochard e Lennon, utilizando microfotometria de contraste de fase mediram os espectros de frequência para a intensidade das flutuações e as funções de correlação $G(R_{12}, \omega)$ para as intensidades das flutuações medidas em dois diferentes pontos da superfície celular, variando por filtros a frequência. Esses resultados demonstram que o “flickering” pode ser interpretado como efeito puramente físico devido às flutuações térmicas da espessura celular.

Os resultados mostraram que as funções de correlação apresentavam um espectro universal, independente da natureza da célula vermelha, da espessura da célula e da frequência para eritrócitos em condições fisiológicas normais.

As condições essenciais para o “flickering” são tensão superficial igual a zero, alta fluidez no interior da célula e diferenças de índices de refração. O “flickering” não é específico para eritrócitos, mas para a maioria das células as condições físicas para que aconteça são inibidas por diferença de pressão

osmótica (membrana sob tensão), alta viscosidade citoplasmática e existência de estruturas rígidas nas paredes celulares.

As flutuações térmicas em GUVs podem ser facilmente observáveis no microscópio, com amplitudes em torno de 10% dos raios das vesículas. As deformações observadas são tempo e espaço dependentes e são originadas do movimento Browniano dos lipídios da membrana e das moléculas de água ao redor da membrana. As amplitudes destas deformações são fortemente relacionadas com a elasticidade de dobramento k_c .

As diferentes formas vesiculares podem ser obtidas pela minimização apropriada da energia de curvatura submetida a restrições geométricas. A vídeo-microscopia revela que estas formas tipicamente exibem flutuações térmicas.

As flutuações térmicas da bicamada lipídica apresentam dois comprimentos típicos, o comprimento de correlação lateral $\xi_{//}$ e a amplitude vertical ξ_{\perp} . No limite de tensão-zero $\xi_{//} \sim \xi_{\perp}^{\zeta}$ com o expoente ζ igual a 1. Desta descrição, tem-se que as flutuações térmicas da bicamada podem ser representadas como uma superfície com elevações randômicas de altura ξ_{\perp} se estendendo sobre uma área $\sim \xi_{//}^2$ (RÄDLER et al., 1995).

As flutuações térmicas são normalmente representadas por harmônicos esféricos no caso de esferas flutuantes ou ondas senoidais no caso de membranas planas, e são suprimidas por tensões laterais da ordem de 10^{-3} mN/m (HELFRICH, 2000).

Na representação por membranas planares, a posição local da membrana com respeito ao plano médio pode ser parametrizado pela variável de altura $h(x,y)$. A energia de curvatura da membrana pode ser escrita:

$$F = \frac{k_c}{2} \int dx dy (\nabla^2 h)^2 = \frac{k_c}{2} \int \frac{d^2 q}{(2\pi)^2} q^4 h_q h_q \quad (1)$$

$\nabla^2 \equiv (\partial_x^2 + \partial_y^2)$ = operador de Laplace

q = vetor de onda

k_c = módulo elástico de dobramento

A transformação de Fourier é definida por $h(x) \equiv \int h_q e^{iqx} d^2q / (2\pi)^2$. O teorema da equipartição define as amplitudes médias a temperatura T:

$$\langle |h_q|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c q^4} \quad (2)$$

Em princípio as flutuações podem ser calculadas em torno de qualquer forma média vesicular utilizando esta mesma aproximação, entretanto, na prática, as diferentes geometrias complicam o problema. A exceção notável existe para as vesículas quase-esféricas das quais o valor da rigidez ao dobramento pode ser deduzido do espectro de flutuação.

As análises de flutuações térmicas observáveis mostram concordância com o modelo de flutuações excitadas termicamente e permitiu a medida com alta precisão dos módulos de dobramento de membranas de lecitina (FAUCON et al., 1989).

1.3. – Termos de energia das bicamadas lipídicas

1.3.1. – Elasticidade de bicamadas lipídicas

Uma teoria de elasticidade de bicamadas lipídicas foi primeiramente proposta por HELFRICH (1973), onde foram derivados termos de elasticidades de esticamento, de inclinação dos lipídios e de curvatura da bicamada.

Helfrich conclui que a energia de curvatura da bicamada seria dominante se o volume da vesícula fosse reduzido abaixo do valor caracterizado pelo desaparecimento total da tensão na bicamada esférica. Nesses casos poderiam ser encontradas formas não-esféricas de vesículas sem o esticamento ou a inclinação da bicamada.

O custo energético por unidade de área para pequenas deformações por esticamento, pode ser escrito por:

$$f_{k_a} = \frac{k_a}{2} \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (3)$$

k_a = módulo elástico de expansão de área

A_0 e A = áreas antes e depois da deformação ($\Delta A = A - A_0$)

Deformações induzindo mudanças de curvatura sem cisalhamento ou esticamento são consideradas, com custo energético por unidade de área dado por:

$$f_c = \frac{k_c}{2} (c_1 + c_2 + c_0)^2 + \bar{k}_c c_1 c_2 \quad (4)$$

k_c = módulo elástico de dobramento

\bar{k}_c = módulo elástico de dobramento Gaussiano

c_0 = curvatura espontânea

c_1, c_2 = curvaturas principais

A deformação por cisalhamento é considerada nula em bicamadas lipídicas no estado fluido. Para bicamadas no estado gel, a energia por unidade de área associada a qualquer transformação de um elemento quadrado de membrana é:

$$f_{\mu} = \frac{\mu}{2} \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} + \frac{\lambda_2}{\lambda_1} - 2 \right) \quad (5)$$

μ = módulo de cisalhamento

$\lambda_i = l_i / l_i^0$ ($i=1,2$) = relações entre os comprimentos da membrana depois (l_i) e antes (l_i^0) da deformação.

Qualquer deformação de unidade de área da membrana tem de aumentar a energia comparada ao equilíbrio. Desta forma, os módulos elásticos μ , k_a e k_c devem ser positivos.

As equações 3, 4 e 5 apresentam as contribuições das elasticidades de esticamento, dobramento e cisalhamento, quando deformações locais são aplicadas a um elemento de membrana. Sendo consideradas as GUVs definidas por suas bicamadas, essas equações serão adicionadas e integradas sobre toda a superfície para o cálculo do custo total de energia livre de qualquer deformação. Ainda, duas outras ocorrências teóricas têm de ser consideradas como termos energéticos:

i) Poros na bicamada: Quando a bicamada lipídica apresenta poros de dimensões maiores que os tamanhos moleculares, o custo de energia livre destas bordas pode ser expresso por:

$$E_{\mathfrak{S}} = \mathfrak{S} \delta \quad (6)$$

$\mathfrak{S} > 0$ = tensão de linha

δ = comprimento total da borda (a relação prévia deve ser substituída por $\mathfrak{S} \delta - \sigma s$ onde s é a área do poro quando poros são formados em uma membrana sobre tensão fixa σ).

Fisicamente um poro pode resultar da fusão de duas monocamadas de uma bicamada, com as moléculas das bordas altamente curvadas numa situação desfavorável devido a seus empacotamentos hidrofóbicos. Entretanto, poros podem também ser formados por fusão de bicamadas. A curvatura da membrana na região deste poro formado será dependente da espessura do filme de água que separa as duas bicamadas. Os dois modelos de poros são apresentados na figura 4:

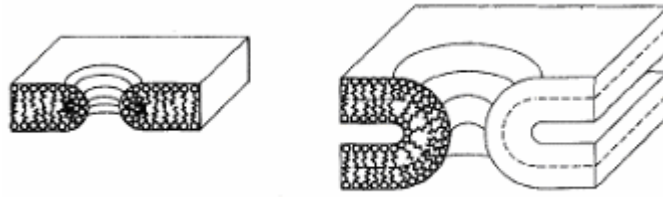


Figura 4. Diferentes modelos de poros em bicamadas lipídicas. (extraído de MÉLÉARD et al., 1998)

ii) Topologia da vesícula: Para bicamadas fechadas, o teorema de Gauss-Bonnet estabelece que a integração da superfície total do vesícula de curvatura Gaussiana c_1c_2 , depende somente da característica topológica da vesícula ($\oint c_1c_2 dS = 4\pi(1-g)$, onde g é o genus da superfície). Desta forma, qualquer deformação de uma forma esférica para elipsoidal implica em μ , k_a e k_c somente, mas não no módulo elástico de dobramento Gaussiano \bar{k}_c , pois a topologia é conservada durante a transformação.

1.3.2. – Modelo de elasticidade de diferença de área com curvatura espontânea (ADE-SC)

Um termo energético adicional pode ser derivado como consequência do arranjo da bicamada como superfície fechada, segundo o modelo de elasticidade de diferença de área com curvatura espontânea (ADE-SC) (MIAO et al. 1994; DÖBEREINER et al,1997).

Dada uma forma da vesícula e assumindo bastante razoavelmente a espessura da bicamada e sendo independente da curvatura local c_1+c_2 , pode-se concluir que a área local de uma superfície posicionada na interface hidrofílica/hidrofóbica da monocamada externa (A^{ext}) é pouco maior que a da monocamada interna (A^{int}) se $c_1+c_2>0$ (c_1 é positiva quando a curvatura é dirigida de dentro para fora da vesícula). As moléculas lipídicas presentes nas monocamadas interna e externa são respectivamente N^{int} e N^{ext} . O estado relaxado da bicamada correspondendo à minimização de densidade lipídica em N^{int} e N^{ext} fixos pode ser escrito $\Delta A_0 = A_0^{int} - A_0^{ext} \approx \bar{a}_{lipídica} \Delta N$ sendo $\Delta N = N^{int} - N^{ext}$ e \bar{a} é a área lipídica no equilíbrio. Como o processo de formação de vesículas não é controlado e devido à pequena taxa de *flip-flop*, a forma da vesícula dita uma diferença de área $\Delta A = A^{int} - A^{ext} = \oint (c_1 + c_2) dA$

que é geralmente diferente daquele correspondendo ao estado relaxado ΔA_0 . Conseqüentemente, outra contribuição resultante da distribuição lipídica não-homogêneas nas duas monocamadas tem de ser adicionada para a integração da equação 3 sobre a área total da vesícula:

$$E_c = \oint \left[\frac{k_c}{2} (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{k}_c c_1 c_2 \right] dA + \frac{k_{nl}}{2} \frac{\pi}{Ae^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (7)$$

k_{nl} = módulo elástico de dobramento não-local

BROCHARD e LENNON (1975) aplicaram a interpretação das propriedades elásticas das membranas nas formas e flutuações de membrana de eritrócitos. Se o volume encapsulado é reduzido para um valor abaixo do volume crítico, caracterizado pelo desaparecimento total da tensão na bicamada esférica, a forma celular será controlada inteiramente pela elasticidade de curvatura.

1.3.3. – Potencial de Flutuação

Um mecanismo que gera uma interação repulsiva entre membranas fluídas, como resultado do impedimento mútuo estérico de membranas ondulantes, foi originalmente proposto por Helfrich (HELFRICH, 1978). A interação foi derivada empregando a teoria de compressibilidade smética e a teoria de membrana única entre paredes rígidas, produzindo o potencial de Helfrich:

$$\frac{3 (k_B T)^2}{8 k_c d^2} \leq \frac{\Delta F}{A} \leq \frac{3\pi^2 (k_B T)^2}{64 k_c d^2} \quad (8)$$

sendo os fatores numéricos objetos de discussão.

O potencial repulsivo resultante da aproximação de uma vesícula com flutuações de bicamada lipídica à uma superfície rígida, em função da distância d e da tensão da bicamada σ , pode ser expresso por:

$$V_f(\sigma, d) = \left[\frac{6b^2(k_B T)^2}{k_c d^2} \right] \times \left(\frac{y^2}{\sinh^2 y} \right) \quad (9)$$

$$y = \left(\frac{\sigma}{bT} \right)^{\frac{1}{2}} \times \frac{d}{2}$$

σ = tensão lateral na membrana

b = fator numérico onde $6b^2 \sim 0,1$

Caso a tensão da bicamada σ desapareça, o potencial de flutuação se torna o potencial de Helfrich (equação 8).

Um aspecto importante deste potencial puramente entrópico é que este apresenta os mesmos expoentes das interações de van der Waals entre interfaces. Em membranas fosfolipídicas este potencial pode superar as atrações de van der Waals (SACKMANN, 1995).

O potencial de interação total de uma membrana sob tensão e um substrato sólido plano pode ser aproximado pela superposição de interações de van der Waals e de flutuação (RÄDLER et al., 1995). Esta superposição se opõe à rigorosa renormalização e é válida se as flutuações são fracas, sempre o caso para membranas sob tensão. No caso das GUVs apresentarem diferenças de densidade em relação ao meio, o potencial gravitacional será linear se a forma da GUV não mudar com a distância média de separação, como observado na figura 5.

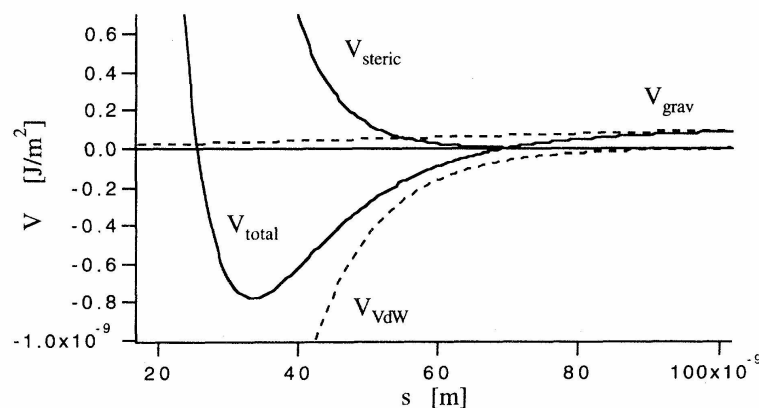


Figura 5. Potencial de interação total calculado por $V_{total} \sim V_{estérico} + V_{vdW} + V_{grav}$. (extraído de RÄDLER et al., 1995).

A posição do mínimo da curva apresentada na figura 5 diminui com o aumento da tensão na bicamada da mesma forma que a profundidade e a curvatura do mínimo aumentam. A contribuição gravitacional é fraca e não afeta fortemente a posição do mínimo. A profundidade do mínimo pode ser considerada a primeira aproximação da energia de adesão por área da bicamada lipídica.

1.3.4. – Adesão de bicamadas lipídicas

A adesão vesicular a um substrato apresenta dois aspectos complementares: o macroscópico (relativo à forma total da vesícula) e o mesoscópico (relativo ao espectro de flutuação na vizinhança do substrato).

O modelo macroscópico considera que a forma mais simples de adesão de uma vesícula a um substrato consiste em adicionar à energia de dobramento uma energia de adesão F_a dada por:

$$F_a = -W \times A^* \quad (10)$$

W = potencial de adesão

A^* = área de contato

A adesão pode ser considerada forte ou fraca dependendo do tamanho da vesícula e da força do potencial de adesão. A adesão pode ser escalonada como $w = W R^2/k_c$, definindo limites de adesão fraca ($w \sim 1$) ou forte ($w \gg 1$).

Observa-se ser necessário um valor limite w_c para a adesão ocorrer, sendo que para potenciais de adesão muito baixos possíveis ganhos na energia de adesão são menores que a energia de deformação despendida pela vesícula. Isto propõe vantagens de adesão que vesículas grandes teriam sobre as pequenas dada a relação adesão-dobramento.

Para valores de $w > w_c$ a vesícula adere ao substrato e sua área de contato A^* aumenta com o potencial de adesão W (regime de adesão fraca). Em regime de adesão forte, a energia de dobramento se torna irrelevante e a forma da vesícula é determinada pela maximização da área de contato para uma dada área total e volume fechado da vesícula.

O modelo mesoscópico considera que a parte aderida da vesícula está a muitos nanômetros do substrato e ainda apresenta flutuações térmicas.

Várias forças estão envolvidas nesta interação, como forças de van der Waals, contribuições eletrostáticas no caso de membranas carregadas e forças repulsivas de curto alcance, como forças de hidratação e protrusão. Estas forças combinadas formam um potencial efetivo $V_d(l)$, que é a energia de uma membrana planar não flutuante a uma distância l do substrato. Para membranas flutuantes o potencial total será dado pela soma do potencial efetivo ($V_d(l)$) com o potencial de flutuação ($V_f(\sigma, l)$) da equação 9, produzindo:

$$V(l) = V_d(l) + V_f(\Sigma, l) \quad (11)$$

sendo que o potencial macroscópico de adesão W corresponderá ao potencial total em seu mínimo l_0 :

$$W = -[V_d(l_0) + V_f(\Sigma, l_0)] \quad (12)$$

As flutuações térmicas nas vesículas podem estocar área da bicamada e liberá-la em situações de deformação da bicamada como deformações induzidas por fluxo hidrodinâmico (SEIFERT, 2000) ou aspiração por micropipeta (MANNEVILLE et al., 2000, MONTEIRO et al., 2004).

Vesículas em adesão (RÄDLER et al., 1995)

No caso de vesículas aderindo a um substrato, somente a parte adjacente da vesícula é sujeita ao potencial de interação descrito acima. A forma total da vesícula em uma superfície atrativa é determinada pelo módulo de dobramento da membrana e por limites como área de superfície constante e volume interno constante. A vesícula ganha energia de adesão aumentando a área de contato mas paga pela mudança de forma através da energia de dobramento. Devido a energia de dobramento elástico, a membrana preferencialmente exibirá uma curvatura de contato descrita pelo raio de curvatura de contato R_c . Para raios pequenos comparados às dimensões das vesículas:

$$R_c = \sqrt{\kappa_c / 2W_A} \quad (13)$$

$W_A =$ energia de adesão por área

Entretanto, um ângulo de contato efetivo \mathcal{G}_{eff} definido pela tangente do contorno de contato pode ser definido pela equação de Young-Dupré:

$$W_A = \sigma(1 - \cos \mathcal{G}_{eff}) \quad (14)$$

$\sigma =$ tensão da bicamada

$\mathcal{G}_{eff} =$ ângulo de contato efetivo

Como demonstrado na equação 14, a adesão induz tensão na bicamada. A resposta elástica da parte livre da vesícula é dupla: a tensão reduzirá a área de excesso consumida pelas flutuações térmicas e, posteriormente, altas tensões poderão esticar a área real da bicamada. A aparente dilatação $\alpha = (A - A_0)/A_0$ pode ser escrita:

$$\alpha = \frac{A - A_0}{A_0} = \frac{kT}{8\pi\kappa_c} \ln \frac{\sigma a^2}{\kappa_c \pi^2} + \frac{1}{\kappa_a} \sigma \quad (15)$$

O primeiro termo do lado direito da equação 15 descreve a área de excesso entrópico que é utilizada pelas flutuações térmicas e que é retirada pela tensão da bicamada. O comprimento a é uma escala de comprimento microscópico que determina o limite dos comprimentos de onda das ondulações. O segundo termo denota o esticamento elástico da bicamada lipídica com o módulo elástico de expansão de área κ_a . A equação 15 também pode ser usada para determinar a “tensão efetiva” se a área de dilatação α é fixada por condições de contorno. Uma vesícula em um estado pouco deflado, de tal modo que as condições de contorno de volume fixo e de área de superfície fixa restrinjam as ondulações, pode ser descrita como sujeita a uma tensão efetiva dada pela equação 15.

A adesão de GUVs em superfícies pode ser descrita por três regimes distintos (BERNARD et al., 2000a e 2000b):

Regime I: aproximação da GUV à superfície.

A GUV sedimenta por força gravitacional até a força repulsiva de Helfrich entre membrana e superfície se tornar relevante. O tempo τ_1 pode corresponder à saída do filme de água entre a GUV e a superfície até a GUV atingir uma distância da superfície comparável à amplitude ξ_{\perp} das flutuações térmicas da membrana.

A retirada de um filme de água entre um disco de raio \angle e um plano rígido é governada pela lei de Reynolds:

$$\frac{dh}{dt} = \frac{2}{3\pi} F_T h^3 \frac{1}{\eta \angle^4} \quad (16)$$

F_T = força resultante da força de Helfrich e do peso

Quando h se aproxima de ξ_{\perp} pode ser introduzido um tempo característico τ_1 .

Este tempo τ_1 apresenta concordância com as observações:

- (i) é proporcional à η ;
- (ii) ele diminui quando ξ_{\perp} aumenta;
- (iii) diminui com o raio inicial da GUV.

Regime II: Rápido aumento na área de contato. No final deste regime, a diminuição da amplitude das flutuações térmicas demonstra que a bicamada está sob tensão.

Durante o tempo τ_2 , a vesícula adota uma forma de calota esférica sugerindo que a vesícula se espalha sob volume e área total constantes até o início da área de superfície de excesso. As ondulações da superfície da membrana são fortemente diminuídas.

O espalhamento vesicular durante o segundo regime parece limitado pela dissipação hidrodinâmica na borda líquida na linha de contato, corroborado pelas seguintes observações:

- (i) quanto maior a vesícula, maior é o volume de água a ser evacuado e maior é o τ_2 ;
- (ii) como o fluxo da solução é diminuído com o aumento da viscosidade do meio, espera-se que τ_2 aumente com a viscosidade;
- (iii) pelo aumento do módulo de curvatura da bicamada, o colesterol reduz as flutuações térmicas das membranas, conseqüentemente o fluxo abaixo da vesícula ocorre mais rápido e τ_2 é reduzido;
- (iv) de forma inversa, vesículas defladas aumentam as flutuações térmicas que diminuem o fluxo de água e aumentam o τ_2 .

Regime III: Caracterizado pelo aumento lento na área de contato. A GUV atinge um estado de equilíbrio no fim deste regime.

No fim do segundo regime a vesícula está sob tensão e mantém a forma de calota esférica. A área da superfície pode ser considerada constante. O volume da vesícula deve diminuir para espalhamento adicional da vesícula.

A diminuição do volume da vesícula foi considerada utilizando o modelo de TAUPIN et al.(1975), que descreve um poro circular de raio r na bicamada. A energia do poro $E_p(r)$ pode ser escrita por:

$$E_p(r) = \mathfrak{I}2\pi r - \sigma\pi r^2 \quad (17)$$

$\mathfrak{I}2\pi r = \text{energia de linha}$

$\sigma\pi r^2 = \text{energia interfacial}$

Poros podem ser considerados como tubos com comprimento igual à espessura da membrana e e raio r . Um fluxo de Poiseuille através desse poro leva a um tempo característico τ :

$$\tau \approx \frac{\eta e R}{\rho \sigma r^4} \quad (18)$$

$\eta = \text{viscosidade da solução}$

$\rho = \text{densidade da solução}$

$\sigma = \text{tensão da membrana}$

$R = \text{raio da vesícula}$

τ_3 é proporcional ao raio inicial da vesícula e à viscosidade η . Este tempo característico é maior para vesículas defladas.

1.4. – Poros em bicamadas lipídicas

Membranas fechadas, como células vermelhas ou vesículas gigantes, se encontram com tensão da bicamada lipídica igual à zero em seu equilíbrio. A resistência à deformação das membranas é principalmente causada pela energia de curvatura. A superfície é “enrugada” pelas flutuações. Um excesso de área

$$\Delta A = A - A_p > 0 \quad (19)$$

onde A é a área total e A_p é a área projetada, é requerido para a manutenção de estado de tensão da bicamada igual à zero. Quando uma vesícula adere a um substrato ou é succionada com uma micropipeta, a superfície não pode se ajustar a um valor ideal e uma tensão lateral σ é criada. As flutuações da vesícula são fortemente reduzidas e a forma da vesícula se torna esférica. As técnicas de micropipetagem permitem a medida da relação entre a tensão σ e o aumento da área projetada A_p .

$$A_p = 4\pi R_i^2 \quad (20)$$

se $\sigma = 0$,

$$A_p = 4\pi R_0^2$$

se $\sigma > 0$,

$$A_p = 4\pi R_0^2 \left(1 + \frac{\sigma}{k_a} \right)$$

R_i = raio inicial da GUV

R_0 = raio da GUV sob tensão da bicamada igual a 0

$$k_a = \frac{48\pi k_c^2}{R_0^2 k_B T}$$

k_c = módulo elástico de dobramento

k_a = módulo elástico de expansão de área.

Dois regimes aparecem no tensionamento da membrana (SANDRE et al. 1999):

- (i) um regime de baixa tensão, onde as flutuações de forma não são totalmente destruídas e a área projetada A_p aumenta em escala logarítmica com σ ;
- (ii) um regime de alta tensão, onde A_p aumenta linearmente com σ devido à direta expansão da área por molécula.

Se durante a abertura de um poro a forma esférica é mantida e a quantidade de lipídio conservada pode ser feita uma relação entre a tensão lateral σ e raio do poro r e raio da vesícula gigante R :

$$4\pi R^2 = A_p + \pi r^2 = 4\pi R_0^2 \left(1 + \frac{\sigma}{k_a}\right) + \pi r^2 \quad (21)$$

definindo raio crítico do poro r_c como:

$$4\pi(R_i^2 - R_0^2) = 4\pi r_c^2 \quad (22)$$

r_c = raio crítico do poro, correspondendo à completa relaxação da tensão da bicamada ($\sigma = 0$).

Observa-se que R_i é sempre maior que R_0 pois sempre há uma σ finita. Porém, se a abertura do poro πr^2 relaxa a tensão da bicamada σ , o raio R_i tende à R_0 .

A partir de r_c deriva-se:

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = 1 - \frac{r^2}{r_c^2} - \frac{4(R_i^2 - R^2)}{r_c^2} \quad (23)$$

σ_0 = tensão na abertura do poro

σ = tensão após abertura do poro

r_c = raio crítico do poro ($\sigma = 0$)

r = raio do poro

R_i = o raio inicial da vesícula (c/ σ diferente de zero)

R = raio de vesícula após abertura do poro. Se não há vazamento $R = R_i$

Dois possíveis mecanismos podem relaxar a tensão das GUVs:

- (i) a abertura de poro faz com que os lipídios se distribuam em uma área menor, a superfície se retrai, aliviando a tensão; a razão r^2/r_c^2 aumenta e σ diminui;
- (ii) quando um poro é aberto, o líquido interno vaza do poro, devido a pressão de Laplace $\Delta P = 2\sigma/R$. Este vazamento diminui o raio da vesícula gigante, a razão $4(R_i^2 - R^2)/r_c^2$ aumenta e a tensão diminui.

A dinâmica de poros em GUVs ainda apresenta a tensão de linha \mathfrak{I} , que guia o fechamento dos poros quando a tensão da bicamada relaxa o suficiente.

A abertura e fechamento de poros em vesícula gigantes seguem a modelo hidrodinâmico de:

$$\frac{2\eta_s}{r} \frac{dr}{dt} = \sigma - \frac{\mathfrak{I}}{r} \quad (24)$$

$\eta_s \equiv \eta_2 e$: viscosidade superficial em Ns/m definida como produto da viscosidade lipídica η_2 e a espessura da membrana e .

A dinâmica do raio R da GUV é determinada considerando o fluxo através do poro:

$$Q = cV_L r^2 = -4\pi R^2 \frac{dR}{dt} \quad (25)$$

V_L = velocidade de vazamento do líquido no centro do orifício,

r = raio do poro

c = fator numérico.

A velocidade de vazamento pode ser estimada pela pressão de Laplace, dada por

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \quad (26)$$

que está presente devido a uma tensão de membrana diferente de zero, agindo na condução do líquido interno para fora.

Cálculos (KARATEKIN et al., 2003) de fluxos através de orifícios circulares determinam o fator numérico:

$$Q = \frac{2\sigma}{3\eta_0 R} r^3 = -4\pi R^2 \frac{dR}{dt} \quad (27)$$

η_0 = viscosidade do líquido interno

Estritamente a equação acima só se aplica a fluxos através de orifícios de raio constante, mas é uma boa aproximação dado que r muda vagarosamente:

$$\frac{dr}{dt} \leq V_L \quad (28)$$

Obtém-se desta forma a dinâmica do raio r do poro, e do raio R da vesícula gigante, relacionado com a tensão σ da membrana. Assim, são

representadas equações numéricas para $r(t)$ e $R(t)$ em soluções detalhadas. (BROCHARD-WYART et al., 2000)

A formação de um poro na bicamada lipídica implica na existência de bordas. É esperado que os lipídios próximos à esta região de borda se reorientem para a minimização da exposição de suas cadeias hidrofóbicas do meio aquoso. Um arranjo molecular plausível é a formação de interfaces cilíndricas, porém este empacotamento molecular modificado dá origem a um excesso de energia em relação à bicamada não perturbada. Esta energia, expressa por unidade de comprimento da borda é a tensão de linha \mathcal{J} . Devido à tensão de linha \mathcal{J} se originar deste custo energético para o curvamento das moléculas lipídicas nos limites do poro, esta tensão é da ordem de $k_c/2e$.

As membranas lipídicas não são estáveis possuindo rompimentos em sua estrutura e capacidade de auto-selação. Esta propriedade é derivada da tensão de linha e é essencial na manutenção na integridade de todos os compartimentos celulares delimitados por membranas e conseqüentemente para a manutenção da vida.

1.5. – Morfologia de bicamadas lipídicas fechadas

Considerando uma membrana fosfolipídica fluída ($\mu=0$), pode ser demonstrado que o módulo elástico de expansão de área k_a é muito alto para gerar flutuações de área mensuráveis no equilíbrio térmico. Como consequência, a área total da bicamada é fixa durante experimentos de curta duração. Considerando também o volume encapsulado pelas GUVs como constante (monitoramento em soluções isoosmóticas), são obtidas duas constantes geométricas dependentes do processo de formação da vesícula.

A minimização da energia das bicamadas pelo modelo de elasticidade em diferença de área² (MIAO et al. 1994; DÖBEREINER et al,1997) sobre limites físicos como área (A) e volume (V) produz a grande variedade de formas observadas em células vermelhas do sangue e GUVs de diferentes topologias, que são exploradas randomicamente num processo chamado difusão conformal. Este fenômeno é reflexo da degenerescência conformal da energia de curvatura elástica (MICHALET e BENSIMON, 1995).

Devido a este processo requerer uma redistribuição de volumes fluídos, as vesículas utilizam uma longa escala de tempo hidrodinâmico (dezenas de segundos). Estas longas escalas de tempo dos modos de deformação demonstram que estes não estão relacionados com excitações térmicas dos modos de dobramento, as quais apresentam tipicamente escalas de subsegundo, como observado nas flutuações térmicas das membranas pelas diferentes formas vesiculares.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. Os lipídios dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dioleil fosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) foram fornecidos pela Sigma. O lipídio fosfatidilglicerol de ovo (eggPG) foi fornecido pela Avanti Polar Lipids. O fluoróforo hidrofílico 1,3,6,8 pireno tetrasulfonato de sódio (PTS) foi fornecido pela Kodak Eastman Company. e o fluoróforo lipossolúvel 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino) dodecanoil-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (NBD-PC) foi fornecido pela Molecular Probes. O supressor de fluorescência cloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (MV) e os açúcares glicose e sacarose foram fornecidos pela Sigma. Os demais reagentes utilizados são de grau analítico.

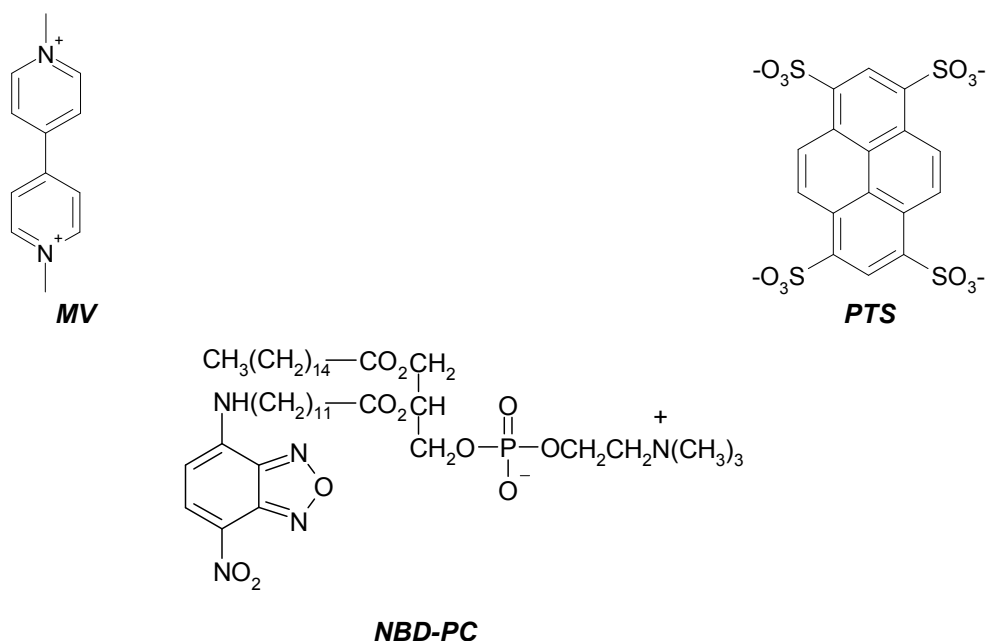


Figura 6. Estruturas moleculares dos fluoróforos e do supressor de fluorescência utilizados: 1,3,6,8 pireno tetrasulfonato de sódio (PTS), cloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (MV) e 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino) dodecanoil-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (NBD-PC).

Produção de GUVs via eletroformação

As GUVs foram eletroformadas (ANGELOVA e DIMITROV, 1986; ANGELOVA et al, 1992) através de uma câmara de eletroformação construída em nosso laboratório. A câmara de eletroformação foi produzida em teflon, com volume interno de 2mL, onde os eletrodos paralelos de platina (Pt) são imersos para a formação das vesículas. A câmara pode ser termostatizada por imersão.

Para a produção das GUVs, o volume de 5 μ L de uma solução lipídica foi espalhado com o auxílio de uma microseringa sobre os eletrodos da câmara de eletroformação. A concentração típica da solução lipídica em clorofórmio/metanol 0,1% foi de 1mg/mL.

A câmara de eletroformação com o filme lipídico depositado sobre os eletrodos permaneceu em um dessecador sob baixa pressão por 2 horas, para a total remoção do solvente. Após este período, um volume de 2mL de solução (meio de formação das GUVs) foi adicionado na câmara de eletroformação, sendo os eletrodos imersos na solução.

Um gerador de potencial foi acoplado aos eletrodos, produzindo uma tensão AC de onda senoidal com intensidade de 3V pico a pico na frequência de 10Hz por 2 horas. Ao final desse período a aplicação da tensão foi interrompida e a câmara aberta. A suspensão de vesículas gigantes formada foi retirada com o auxílio de uma micropipeta e transferida para um tubo tipo eppendorf.

Para a incorporação de fluoróforos no meio interno das GUVs, estes foram previamente dissolvidos no meio de formação. Para a incorporação de fluoróforos lipossolúveis nas bicamadas lipídicas, estes foram previamente dissolvidos nas soluções lipídicas aplicadas aos eletrodos.

Produção de GUVs via hidratação

(MENGER e ANGELOVA, 1998) Sobre uma pastilha de teflon foram depositados 10 μ L de solução lipídica em clorofórmio/metanol 0,1%. A pastilha foi colocada dentro de um frasco de vidro, com o lado do filme para cima, sendo esse conjunto mantido à pressão reduzida no dessecador por 2 horas, para a total eliminação do solvente. O frasco foi retirado do

dessecador e transferido para uma estufa com temperatura acima da temperatura de transição de fase (T_c) do lipídio por 2 horas para a pré-hidratação. Após esse período o frasco foi preenchido com a solução (meio de formação das GUVs) e retornado à estufa por 48 horas. Uma suspensão que contém a maioria das vesículas se formou acima das pastilhas a partir do filme nelas depositado. As vesículas foram retiradas do frasco e transferidas para um eppendorf.

Para a incorporação de fluoróforos seguiu-se o mesmo protocolo apresentado para as GUVs eletroformadas.

Produção de LUVs

Uma solução (meio de formação das LUVs) foi adicionada sobre um filme lipídico formado em um tubo de ensaio, que foi submetido à vortexação em temperatura acima da temperatura de transição de fase (T_c) do lipídio. Essa suspensão foi transferida para um extrusor, submetida a passagem por 23 vezes por uma membrana de nylon de poro 100nm em temperatura acima da T_c do lipídio e transferida para um tubo tipo eppendorf. Para a incorporação de fluoróforos seguiu-se o mesmo protocolo das GUVs eletroformadas.

Espalhamento de raio-X a baixo ângulo

Os experimentos foram conduzidos em um gerador de raio-X de ânodo rotativo localizado no Instituto de Física da USP ou no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) sob a coordenação da Prof^a.Dr^a.Rosângela Itri.

Os perfis de intensidade espalhamento das amostras em função do vetor de espalhamento foram apresentados após subtração do espalhamento causado pela solução e pela normalização da não homogeneidade do detector.

Calorimetria diferencial de varredura

Os experimentos foram conduzidos no aparelho HS-DSC (*High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry*) modelo Microcal VP-DSC localizado no Instituto de Química da Unicamp, sob a coordenação do Prof. Dr. Watson Loh. As suspensões lipídicas foram analisadas preenchendo-se o

volume de 0,5142 mL de cada cela, sendo que em uma cela coloca-se a amostra e na outra a referência, contendo a solução na qual as vesículas foram suspensas.

Os termogramas que apresentam os dados de calor específico (C_p) em função de temperatura foram obtidos pela subtração do termograma da suspensão lipídica pelo termograma da referência. Para o cálculo de entalpias, a curva obtida foi dividida pela concentração molar do lipídio em suspensão.

Espalhamento dinâmico de luz

Os experimentos foram conduzidos no modelo Zeta Pals da Brookhaven. As suspensões lipídicas foram colocadas em cubetas de 3mL e analisadas pelo espalhamento causado pela amostra detectado a 90° .

Dosagem de fosfolipídios

As amostras a serem analisadas, juntamente com uma curva-padrão de KH_2PO_4 foram secas em tubos pirex. A cada tubo foi adicionado 0,4mL de HClO_4 concentrado. Os tubos foram deixados por 1 hora em bloco quente à 180°C . Após o resfriamento foram adicionados por tubo 1mL de água, 0,4mL de solução de molibdato de amônio 1,25% e 0,4mL de solução de ácido ascórbico 3%, seguido de agitação. Os tubos foram mantidos por 10 minutos à 100°C e resfriados. As absorvâncias foram lidas em 797nm em espectrofotômetro.

Análises microscópicas

As análises microscópicas de GUVs foram obtidas por contraste de fase após a mistura de suspensões de GUVs formadas em sacarose com soluções de glicose de mesma osmolaridade. Deste modo, obtém-se a formação de um gradiente de densidade, fazendo com que as vesículas migrem para o fundo da câmara de observação devido à ação gravitacional e de um gradiente de índice de refração proporcionando uma fácil observação das vesículas. As concentrações de açúcares usadas na formação destes gradientes variaram entre 0,1-1,0mol/L. A imposição destes gradientes se faz

necessária dada a impossibilidade de observação das vesículas sem estes contrastes.

As análises microscópicas das GUVs obtidas por fluorescência foram conduzidas pela mistura de suspensões de vesículas gigantes em meio de PTS com soluções contendo MV. O PTS não internalizado nas vesículas tem sua fluorescência suprimida pelo MV, permitindo o contraste das vesículas com o meio. As concentrações típicas de PTS e MV nas suspensões variaram entre 10^{-5} mol/L e 10^{-3} mol/L.

O contraste por fluorescência pôde ser formado concomitantemente ao contraste por gradiente de açúcares pela adição de PTS e de MV às soluções de sacarose e glicose respectivamente.

As observações de GUVs foram realizadas através do microscópio modelo Eclipse TS100 da Nikon com módulo de epifluorescência acoplado e da câmera CCD modelo LE-D da Nikon. Para observação da fluorescência do PTS nas amostras foi utilizado o cubo de filtro UV-2A (Nikon), permitindo a excitação da amostra em comprimentos de onda entre 340-380nm e observação de emissão em comprimentos de onda ≥ 420 nm. Para a observação da fluorescência do NBD-PC foi utilizado o cubo de filtro B-2A (Nikon), permitindo a excitação da amostra em comprimentos de onda entre 450-490nm e observação de emissão em comprimentos de onda ≥ 515 nm.

Análise da intensidade de fluorescência das GUVs

Para a análise da intensidade de fluorescência das vesículas foi utilizado o programa Scion Image da Scion Corporation gratuitamente disponibilizado na internet através do National Institute of Health (NIH). As imagens coloridas digitalizadas foram transformadas em escalas de cinza, com intensidades variando entre 0 (branco) e 255 (preto). As intensidades de fluorescência das GUVs foram analisadas segundo a função:

$$\frac{I_{sol} - I_{ves}}{I_{sol}}$$

onde I_{sol} representa a intensidade em escala de cinzas da área externa à GUV e I_{ves} representa a intensidade em escala de cinzas da área interna da

GUV. A área para o cálculo de I_{sol} e I_{ves} corresponde a um círculo de área $30\mu\text{m}^2$.

Medidas de diâmetro das GUVs

Para as medidas de diâmetro das vesículas gigantes foi utilizado o programa Scion Image da Scion Corporation gratuitamente disponibilizado na internet através do National Institute of Health (NIH). Imagens de esferas de latéx de diâmetro igual à 6,02mm foram utilizadas para a geração de relação de número de pixels por micrômetro. Com base nesta escala foram feitas as medidas dos diâmetros das GUVs.

Análises por fluorimetria

As análises fluorimétricas foram obtidas através do fluorímetro Fluorolog da SPEX.

3 – OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização de GUVs para sua utilização como modelo biomimético. Devido à metodologia de análise de GUVs por microscopia, com o monitoramento sendo feito individualmente em cada GUV e durante longo período, a variabilidade de dados e fenômenos apresentados por estas foi enorme.

A iniciar pelas próprias eletroformações, somente a padronização de metodologias não se mostrou eficaz na produção de GUVs com propriedades idênticas. Apesar de concentrações muito pequenas de lipídios ($\sim 10^{-6}M$), o número de GUVs geradas em cada eletroformação é enorme, sendo possível observar desde GUVs muito bem formadas, de aspecto unilamelar e sem agregados lipídicos visíveis até estruturas sem morfologias vesiculares.

Todos os experimentos apresentados com GUVs foram realizados com GUVs visualmente similares, ou seja, sem a presença de agregados e bicamadas de aparência unilamelar.

Os resultados apresentados na próxima seção foram agrupados conforme os fenômenos observados num número representativo de GUVs e embora possam parecer antagônicos a primeira vista, são expressões de propriedades características das GUVs.

Estudos sobre funcionalidades, estabilidades e atividades de proteínas inseridas em bicamadas de GUVs só podem ser realizados após a caracterização deste modelo biomimético no que tange a formação, permeabilidade apresentada pela bicamada, foto-estabilidade, interações entre a bicamada lipídica e superfícies e geração de tensões na bicamada e como estas tensões podem ser dissipadas. Este foi o objetivo principal deste trabalho.

4 – RESULTADOS

O monitoramento de GUVs apresentou grande variabilidade de fenômenos observados em virtude do acompanhamento individual de cada GUV durante o período experimental. Os resultados aqui apresentados foram compilados por tipo de fenômeno apresentado por um grande número de GUVs monitoradas e estão divididos da seguinte forma:

4.1. Decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Possível foto-indução.

4.2. Aumento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Relação com mudanças morfológicas.

4.3. Foto-estabilidade de soluções de PTS e PTS/MV.

4.4. Manutenção do gradiente de açúcares em GUVs que sofreram decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno.

4.5. Impermeabilidade de PTS através da bicamada lipídica de GUVs.

4.6. Interação bicamada-superfície.

4.7. Estruturas lipídicas adjacentes às GUVs

4.8. Mudanças morfológicas de bicamadas lipídicas de GUVs

4.9. Comparação com o modelo biomimético LUV.

4.10. Fotoquímica do PTS em xerogéis de açúcares

4.11. Estabilidade apresentada por GUVs

Todos os resultados apresentados nesta seção serão analisados em conjunto na seção DISCUSSÃO.

As suspensões de GUVs eletroformadas apresentaram concentrações abaixo dos limites de detecção das técnicas de espalhamento de raio-X a baixo ângulo e de calorimetria diferencial de varredura. Os resultados experimentais obtidos com a aplicação das técnicas em suspensões de GUVs eletroformadas estão apresentados na seção APÊNDICE.

Todos os experimentos conduzidos nesta seção contendo GUVs, exceto àqueles que apresentam comentário sobre condição experimental,

foram realizados com suspensões de GUVs produzidas pela mistura de iguais volumes dos itens descritos abaixo:

- suspensão de GUVs de DOPC eletroformadas em solução contendo [PTS]= 1×10^{-3} mol/L e [sac]=1 mol/L;
- solução contendo [MV]= 2×10^{-3} mol/L e [gli]=1 mol/L,

Desta forma, as GUVs apresentam no meio interno [PTS]= 1×10^{-3} mol/L e [sac]=1 mol/L, e nos meios externos [PTS]= 5×10^{-4} mol/L, [sac]=0,5 mol/L, [MV]= 1×10^{-3} mol/L e [gli]=0,5 mol/L.

A supressão do PTS pelo MV no meio externo das GUVs possibilita a visualização das GUVs por fluorescência do PTS livre no meio interno. A diferença da concentração de açúcares entre o meio interno e externo das GUVs permite a observação destas por contraste de fase dada a diferença dos índices de refração do meio interno ([sac]=1 mol/L) e o meio externo ([sac]=0,5 mol/L e [gli]=0,5 mol/L).

As intensidades de fluorescência do meio interno das GUVs apresentadas nas figuras e gráficos desta seção foram calculadas conforme função $\frac{I_{sol} - I_{ves}}{I_{sol}}$ apresentada em Materiais e Métodos. De acordo com esta função, seu valor igual a 1 representa contraste máximo entre meios interno e externo das GUVs e o seu valor igual a 0 representando a total falta de contraste entre os meios. Exceções a esta metodologia serão discutidas no texto.

Toda menção à radiação e irradiação ultra-violeta (UV) em GUVs nesta seção deve ser compreendida como a radiação de excitação da amostra do cubo de filtro modelo UV-2A do microscópio. Esta radiação possui comprimento de onda entre 340 e 380 nm.

Todos os resultados de monitoramentos de GUVs apresentados nesta seção foram obtidos individualmente por vesícula, ou seja, uma única GUV sendo monitorada por contraste de fase ou fluorescência durante determinado período. Exceções a esta metodologia serão discutidas no texto.

4.1. – Decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Possível foto-indução

GUVs quando monitoradas por fluorescência apresentaram um decaimento da intensidade de fluorescência de seu meio interno durante o monitoramento. A figura 7 apresenta uma GUV durante o processo de decaimento e a figura 8 apresenta gráficos representando o decaimento de diversas GUVs monitoradas.

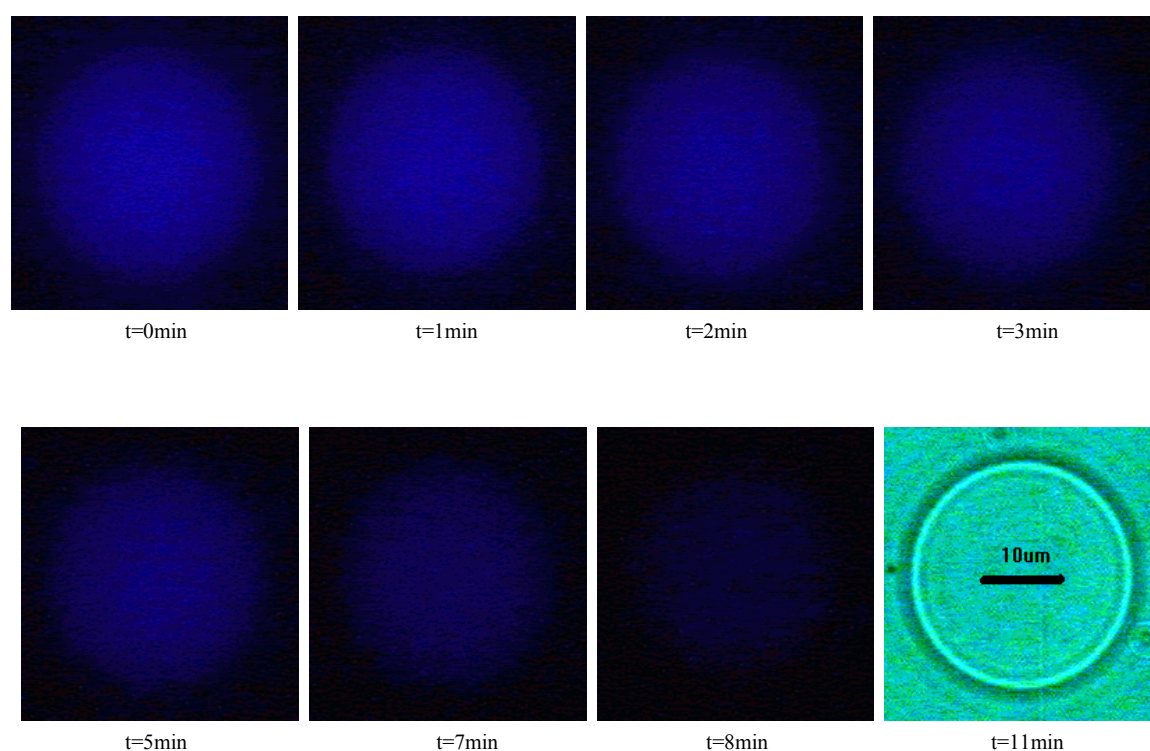


Figura 7. Decaimento de intensidade de fluorescência do meio interno de GUV. O tempo inicial ($t=0'$) foi considerado como o tempo de início de irradiação da vesícula. Após 11min, apesar do decaimento total da fluorescência, a GUV ainda se apresenta íntegra por contraste de fase. A barra de escala na última foto indica $10\mu\text{m}$.

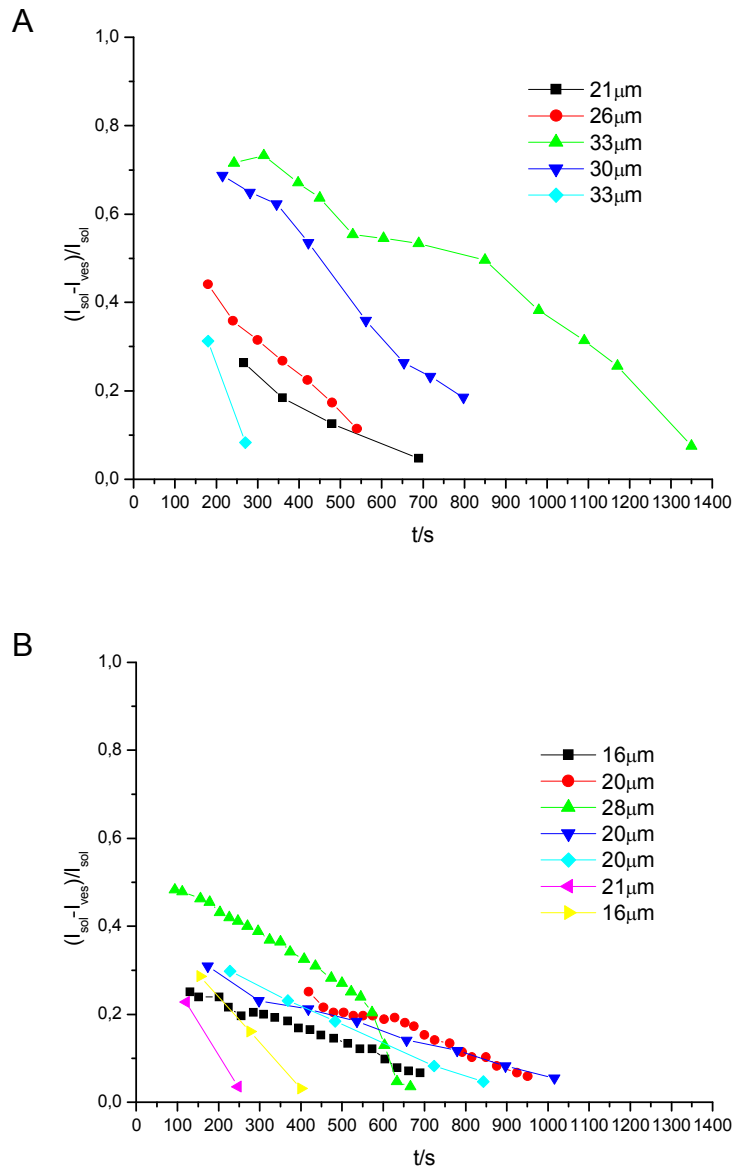


Figura 8. Representação gráfica do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante. A) Diferentes GUVs monitoradas imediatamente após eletroformação. B) Diferentes GUVs monitoradas 3 dias após a eletroformação. O diâmetro das diferentes GUVs analisadas estão inseridos nos gráficos.

O gráfico A da figura 8 apresenta GUVs monitoradas imediatamente após eletroformação enquanto o gráfico B apresenta GUVs monitoradas três dias após eletroformação. A figura 8 demonstra que o decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs é independente do tempo pós-eletroformação.

A figura 9 apresenta monitoramentos da intensidade de fluorescência de GUVs produzidas com menores gradientes de glicose/sacarose entre meio interno e externo. Estas GUVs foram produzidas pela mistura de iguais volumes de solução contendo $[MV]=2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, $[gli]=0,1 \text{ mol/L}$ e de suspensão de GUVs eletroformadas em $[PTS]=1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, $[sac]=0,1 \text{ mol/L}$.

A figura 9 demonstra que os decaimentos da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs não são funções dos gradientes de açúcares entre meio interno e externo. Resultados similares foram produzidos por GUVs sendo formadas e observadas na ausência de açúcares.

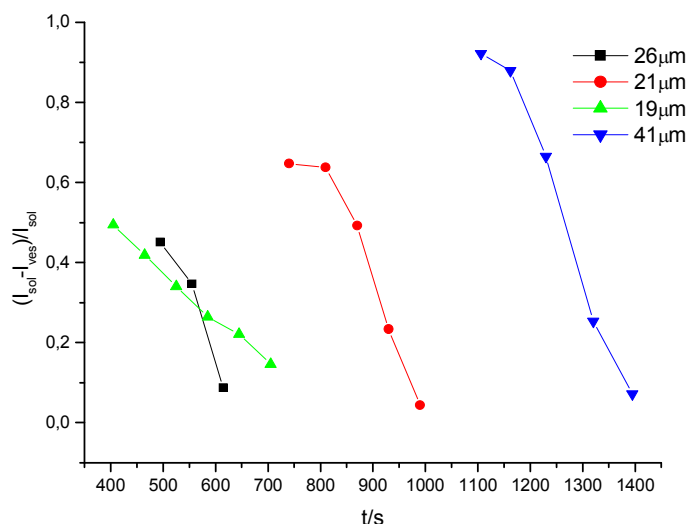


Figura 9. Representação gráfica do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante. O diâmetro das diferentes GUVs analisadas estão inseridos nos gráficos.

As intensidades de fluorescência do meio interno de diversas GUVs são representadas nos gráficos da figura 10. Cada ponto experimental nos gráficos representa a intensidade de fluorescência do meio interno de uma única GUV. Os números acima dos pontos experimentais representam o diâmetro (em μm) das diferentes GUVs. Observa-se que não existe uma relação estrita entre a intensidade de fluorescência do meio interno da GUV e seu diâmetro ou tempo da GUV na suspensão.

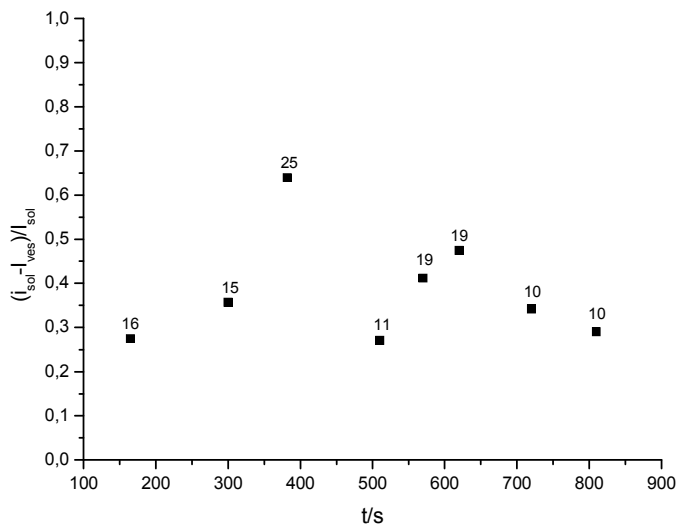
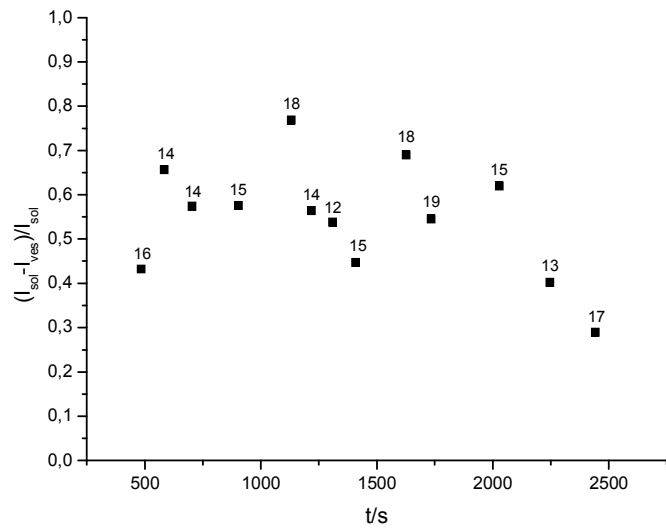


Figura 10: Representação gráfica da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. O diâmetro (em μm) das diferentes GUVs analisadas estão inseridos acima dos pontos experimentais dos gráficos. Cada gráfico representa uma eletroformação.

O efeito da irradiação UV no decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de cinco GUVs, representadas por diferentes cores, pode ser observado na figura 11. As setas de cores diferentes indicam o início da irradiação UV constante sobre determinada GUV. Nos períodos anteriores aos indicados pelas setas, cada GUV foi irradiada somente durante a obtenção de sua foto. Os diâmetros de cada GUV estão inseridos no gráfico.

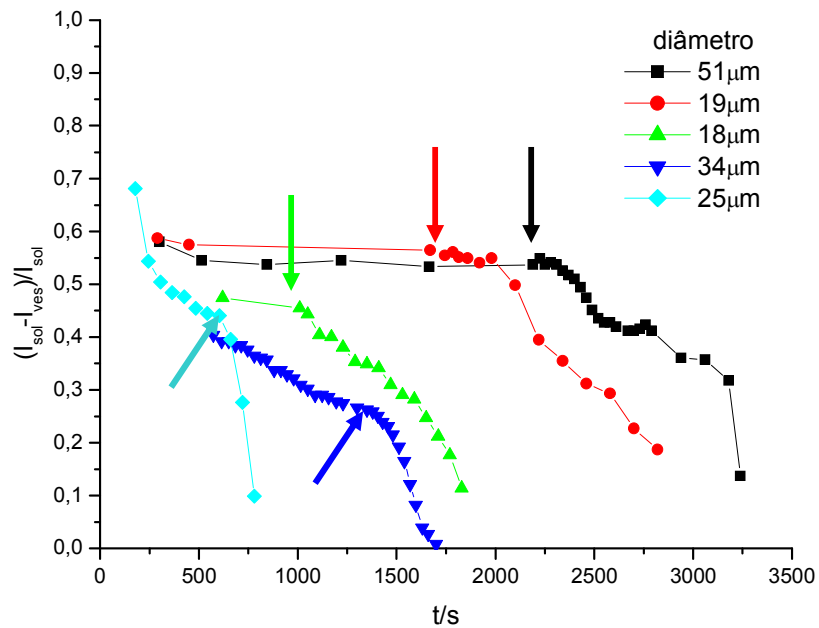


Figura 11: Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. As setas de cores diferentes indicam o início da irradiação UV constante sobre determinada GUV. Nos períodos anteriores aos indicados pelas setas, cada GUV foi irradiada somente durante a obtenção de sua foto. O diâmetro das diferentes GUVs analisadas estão inseridos no gráfico.

A figura 11 apresenta um aumento na taxa de decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno das GUVs com o aumento da exposição das GUVs à radiação UV.

4.2. – Aumento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs. Relação com mudanças morfológicas

Um pequeno aumento da intensidade de fluorescência do meio interno apresentado por certas GUVs durante irradiação UV pode ser observado nas figuras 12 e 13.

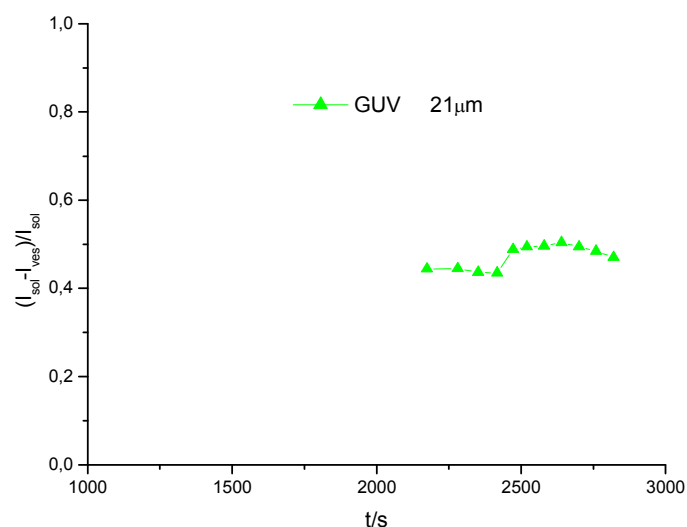


Figura 12. Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV. A legenda do gráfico apresenta o diâmetro da GUV no início do monitoramento. A GUV foi constantemente irradiada com radiação UV.

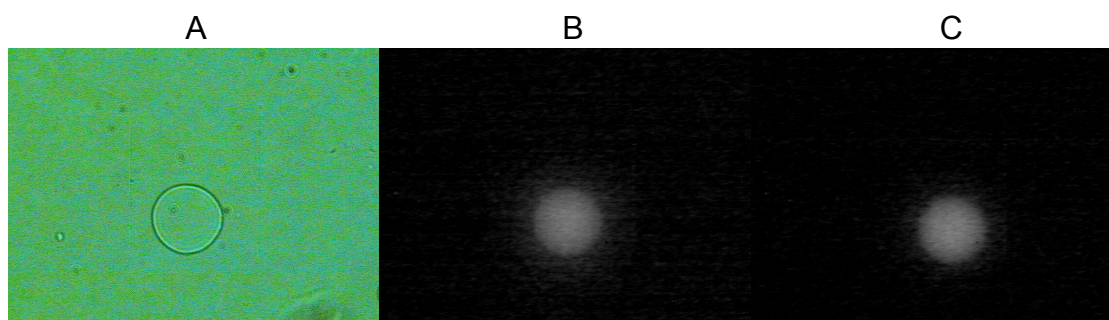
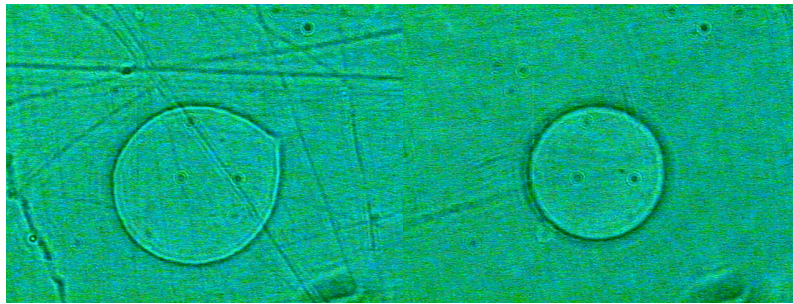


Figura 13. Imagens de GUV apresentada na figura 12. A) Foto de campo sob contraste de fase (início do monitoramento). B) e C) Fotos de campo sob irradiação de excitação de PTS (em escala de cinzas) no início e fim do monitoramento.

Um aumento na intensidade de fluorescência do meio interno de certas GUVs foi observado em vesículas que apresentaram uma redução em sua área meridional, conforme figura 14.

A)



B)

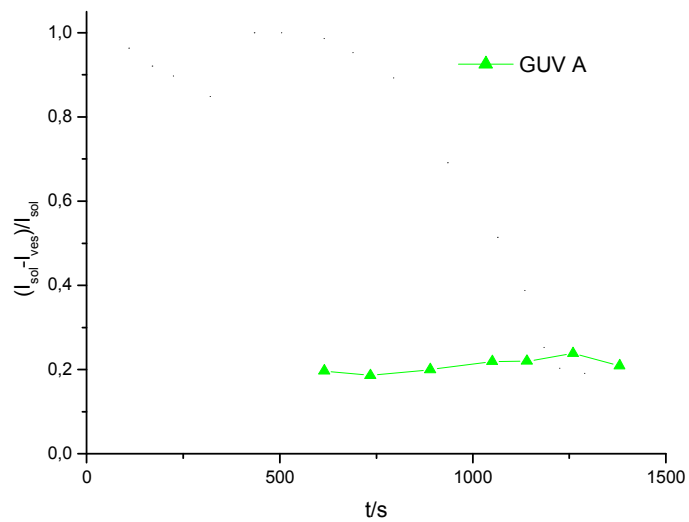


Figura 14: Redução da área meridional em vesículas gigantes. A) Foto anterior (esquerda) e posterior (direita) ao processo de redução da área meridional de GUV. B) Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV apresentada no item A desta figura.

As figuras 12, 13 e 14 demonstram que mudanças morfológicas nas GUVs como redução do raio meridional podem causar um aumento no sinal de fluorescência do meio interno das GUVs.

4.3. – Foto-estabilidade de soluções de PTS e PTS/MV

Para a elucidação de possíveis reações fotoquímicas apresentadas por PTS e/ou PTS/MV que pudessem ser responsáveis pelos decaimentos da intensidade de fluorescência do meio interno observados em GUVs, soluções de PTS e PTS/MV foram monitoradas em diferentes arranjos experimentais.

As figuras 15 e 16 apresentam o monitoramento da intensidade de fluorescência de soluções de PTS e PTS/MV em cubetas de caminho ótico de 100 μ m em arranjos experimentais em fluorímetro e no microscópio.

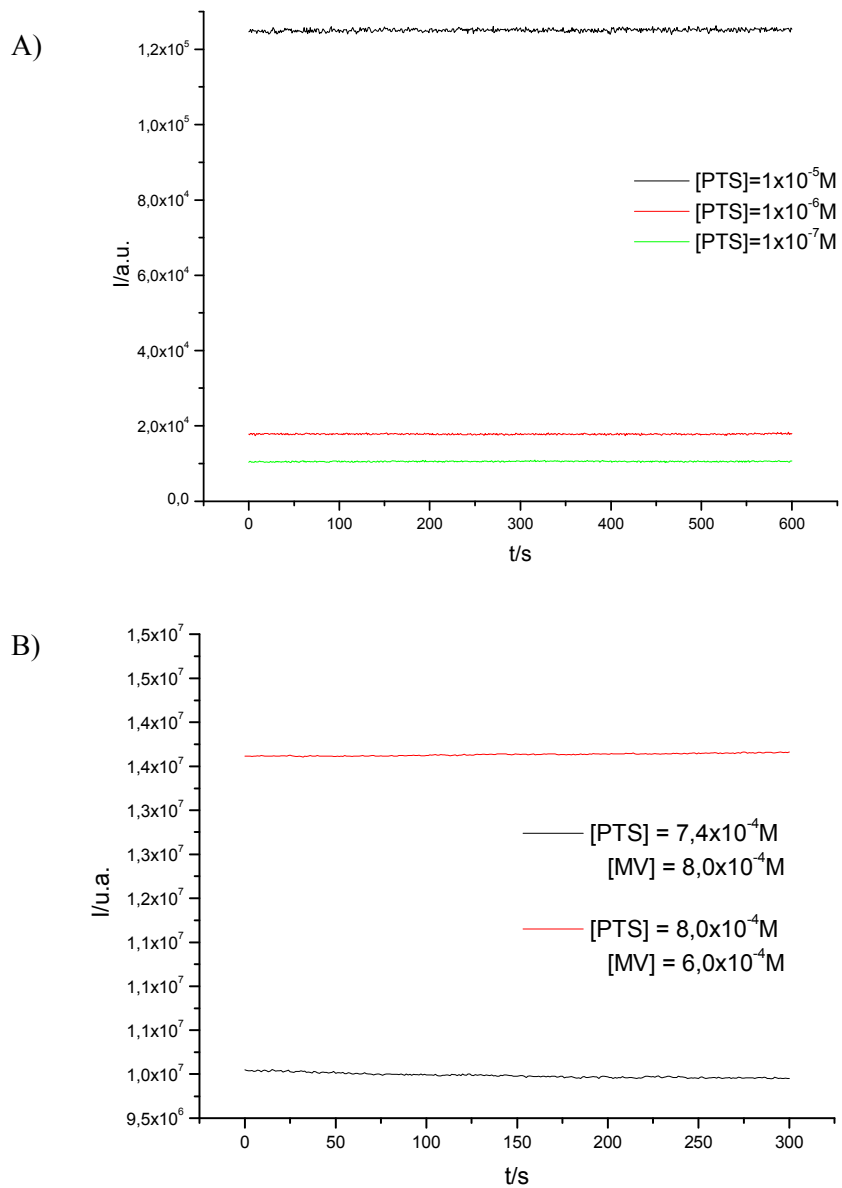


Figura 15. Monitoramento da intensidade de fluorescência de soluções de PTS e PTS/MV obtido em fluorímetro (λ_{exc} . 370nm, λ_{emi} 420nm). A) Soluções de PTS nas concentrações indicadas na figura. B) Soluções PTS/MV nas concentrações indicadas na figura.

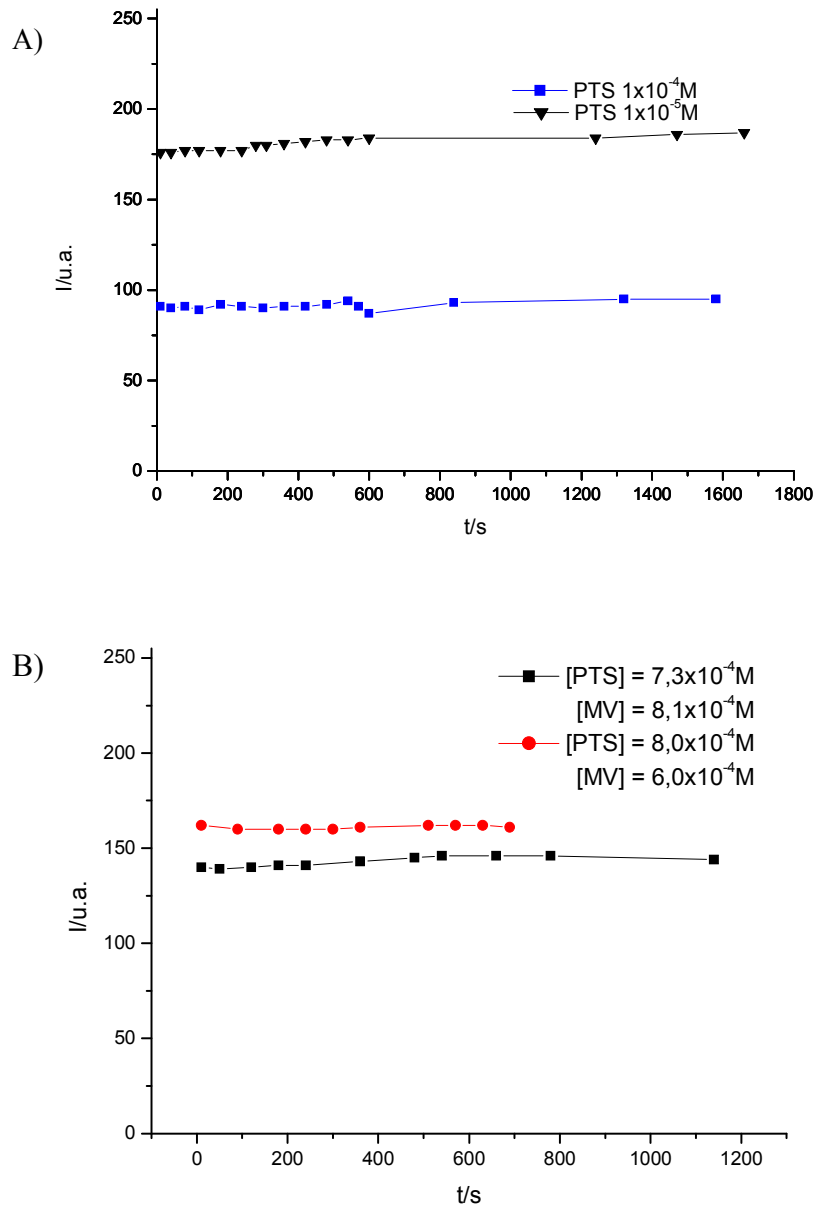


Figura 16. Monitoramento da intensidade de fluorescência de soluções de PTS e PTS/MV obtido em microscópio, objetiva 40x (λ_{exc} 340-380nm, $\lambda_{emi} \geq 420\text{nm}$). A) Soluções de PTS nas concentrações indicadas na figura. B) Soluções PTS/MV nas concentrações indicadas na figura.

As figuras 15 e 16 demonstram a estabilidade da intensidade de fluorescência de soluções de PTS e PTS/MV com irradiação constante em procedimentos similares às análises de decaimento de fluorescência de GUVs.

4.4. – Manutenção do gradiente de açúcares em GUVs que sofreram decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno

A figura 17 apresenta GUVs que sofreram decaimento total da intensidade de fluorescência do meio interno, mantendo entretanto o gradiente de açúcares entre os meios interno e externo.

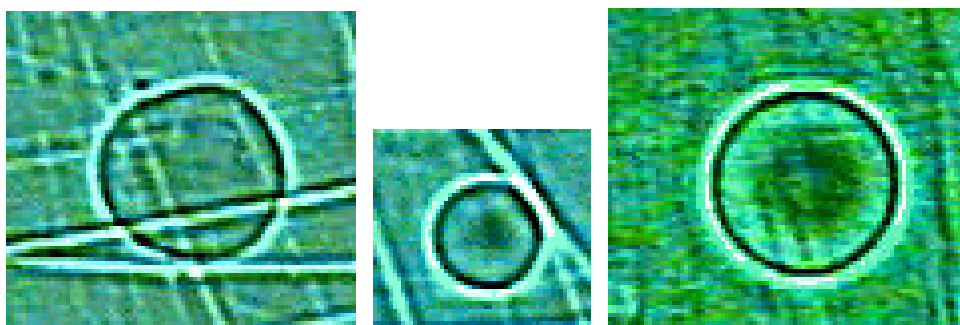


Figura 17: Diferentes GUVs após decaimento total da intensidade de fluorescência do meio interno. Fotos por contraste de fase em objetivas 10x.

A manutenção do gradiente de açúcares é evidenciada pela continuidade de observação das GUVs por contraste de fase e é um demonstrativo da integridade vesicular durante o decaimento da fluorescência das vesículas. O equilíbrio entre as concentrações de açúcares do meio interno e externo das GUVs imporia uma difícil visibilidade às vesículas.

4.5. – Impermeabilidade do PTS através da bicamada lipídica de GUVs

Para o estudo da permeabilidade do PTS através das bicamadas, foram estudadas suspensões produzidas pela mistura de iguais volumes dos itens descritos abaixo:

- suspensão de GUVs eletroformadas com o análogo lipídico NBD-PC em solução contendo [sac]=1mol/L;
- solução contendo [PTS]= 1×10^{-3} mol/L e [gli]=1mol/L.

Desta forma, comparado aos resultados de decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno, as GUVs mantiveram o gradiente de açúcares porém impondo a presença de PTS somente ao meio externo.

A incorporação do análogo lipídico fluorescente NBD-PC à bicamada é utilizada para a delimitação da área meridional da vesícula pela fluorescência da bicamada e é mais um marcador da integridade vesicular.

A impermeabilidade do PTS por bicamadas de GUVs pode ser observada na figura 18.

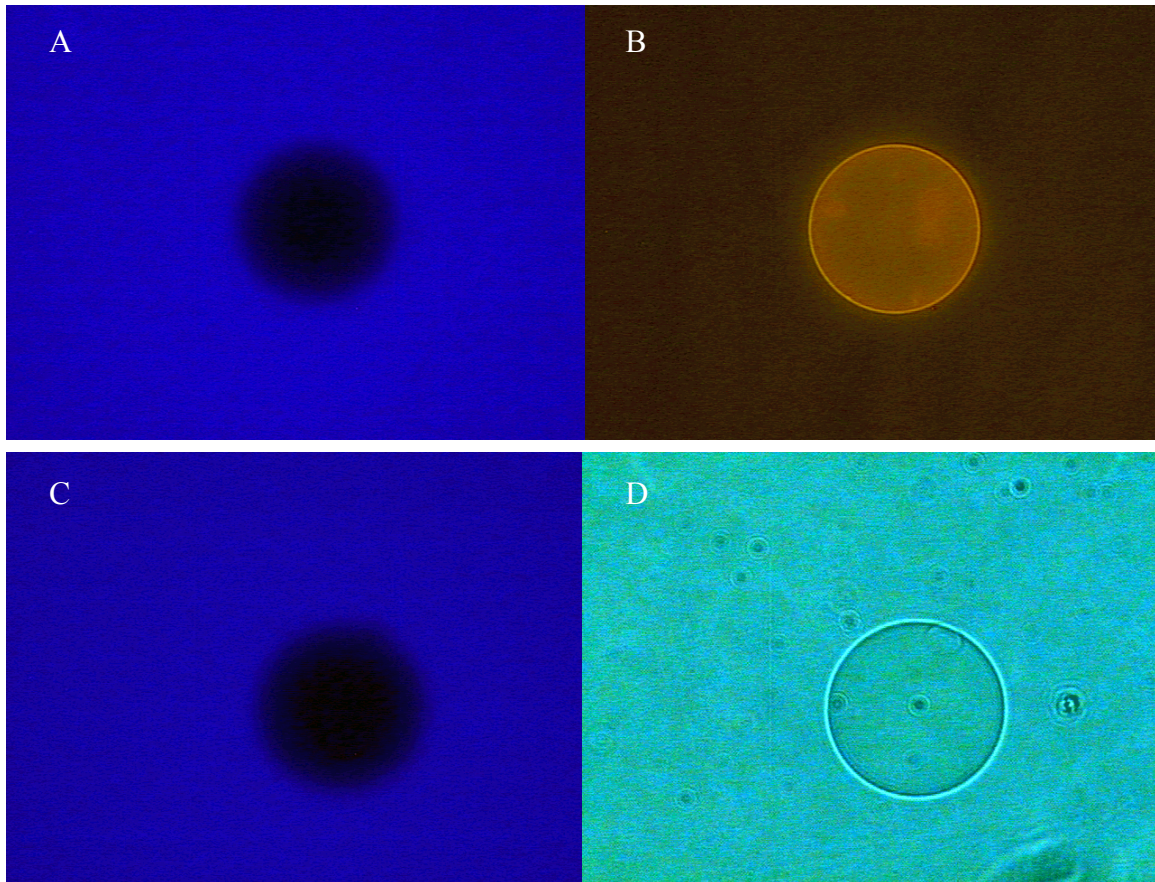


Figura 18: Diferentes modos de observação da mesma GUV. A) Foto de campo sob irradiação de excitação de PTS. B) Foto de campo sob irradiação de excitação de NBD. C) Foto de campo sob irradiação de excitação de PTS, após 1500s de irradiação constante. D) Foto de campo sob contraste de fase.

4.6. – Interação bicamada-superfície

Algumas GUVs contendo NBD-PC na bicamada apresentaram a formação de manchas fluorescentes em áreas adjacentes à vesícula, como mostra a figura 19.

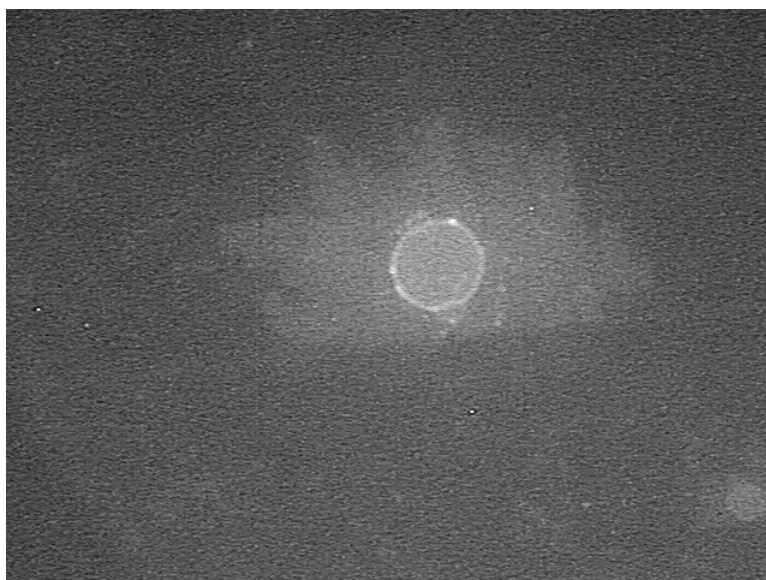
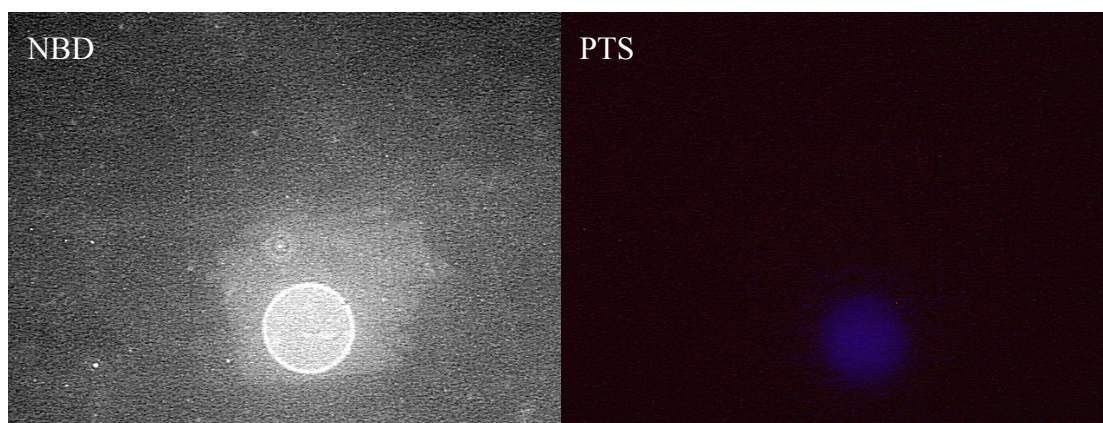


Figura 19. Mancha fluorescente em área adjacente à GUV. A forma circular indica área meridional da GUV. Campo fotografado sob irradiação de excitação de NBD.

A formação de manchas fluorescentes em regiões onde a GUV entra em contato com a superfície evidencia uma interação bicamada-superfície não descrita na literatura para GUVs (bicamadas formadas por lipídios zwitteriônicos e superfícies de vidro não modificadas). A observação desta interação só foi possível devido a presença do análogo lipídico NBD-PC.

A figura 20 apresenta evidências de interações entre bicamada-superfície de GUVs contendo PTS em seu meio interno.

A)



B)

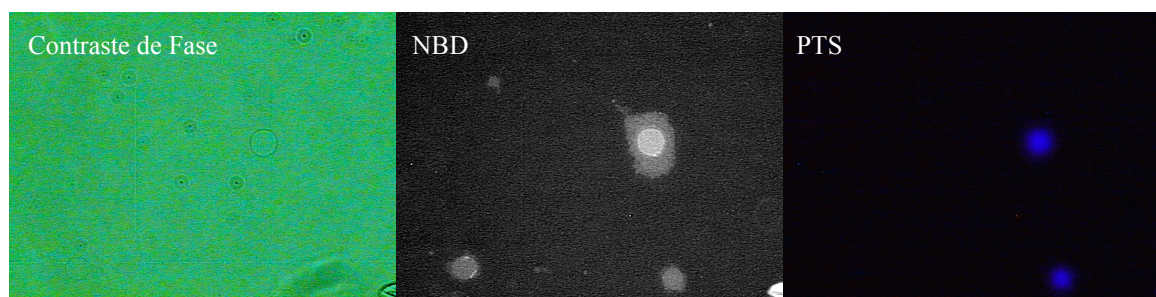


Figura 20. Evidências de interação bicamada-superfície. A) GUV fotografada sob irradiação de excitação de NBD e PTS; B) GUVs fotografadas sob contraste de fase, irradiação de excitação de NBD e PTS.

A figura 20 mostra que as interações bicamada-superfície podem retirar parte da bicamada mantendo a aparência esférica da GUV em sua área meridional, inclusive com o redimensionamento do conteúdo interno de PTS.

As interações bicamada-superfície podem explicar a deformação de algumas vesículas esféricas, a redução de tamanho observada em algumas vesículas e a eliminação das flutuações térmicas observáveis pelo aumento da tensão da bicamada (HELFRICH, 2000), gerada por área da bicamada em contato específico com a superfície. Porém, estas interações não são intrinsecamente observáveis em todas as vesículas que sofrem decaimento de fluorescência, tampouco vesículas que mostraram esta interação deixaram de apresentar fluorescência de PTS no meio interno, como apresentado na figura 20.

Caso sejam inerentes ao sistema, as interações bicamada-superfície não aumentaram a permeabilidade do PTS para o meio interno das vesículas (vide figura 18) e também não parecem ser fotoinduzidas. Embora possíveis geradoras de inomogeneidades locais nas bicamadas que podem favorecer processos de permeabilidade (BERNARD et al., 2000a e 2000b) , estas interações não explicam todos os decaimentos da intensidade de fluorescência do meio interno acompanhados em GUVs.

Eliminando a participação de qualquer evento fotoquímico sobre o PTS ou PTS/MV, a indução do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs direciona-se para a interação luz-bicamada. Interações específicas entre luz e bicamadas já são descritas na literatura, como no caso de laser tweezers (BAR-ZIV e MOSES, 1994), porém com a utilização de lasers com intensidades fotônicas ordens de grandeza maiores que as utilizadas nos experimentos de decaimento de intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs.

A figura 21 demonstra que GUVs em suspensão por dezenas de minutos apresentam uma indução no decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno produzido pela irradiação UV.

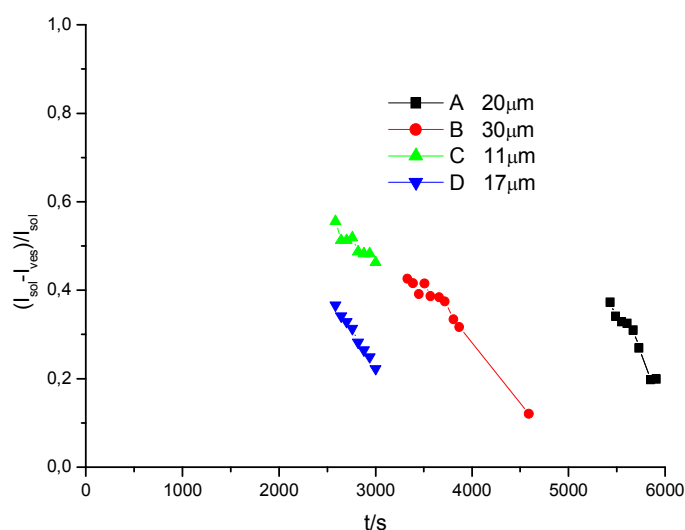


Figura 21. Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante. O diâmetro das diferentes GUVs analisadas estão inseridos no gráfico.

GUVs formadas por misturas lipídicas DOPC/eggPG, DMPC, DPPC e DSPC apresentaram taxas de decaimento de intensidade de fluorescência do meio interno semelhantes às apresentadas por vesículas de DOPC, demonstrando certa inespecificidade do decaimento frente a bicamadas negativas, comprimento de cadeia do lipídio e grau de insaturação.

4.7. – Estruturas lipídicas adjacentes às GUVs

Fortes deformações das bicamadas ou estruturas adjacentes às bicamadas lipídicas das vesículas se apresentam como possíveis causas de inhomogeneidades que levem à perda da capacidade de manutenção do meio interno de GUVs. Estruturas lipídicas de “fios” e/ou tubos ligados às GUVs, também chamados de “tethers” podem ser observados nas figuras 22 e 23.

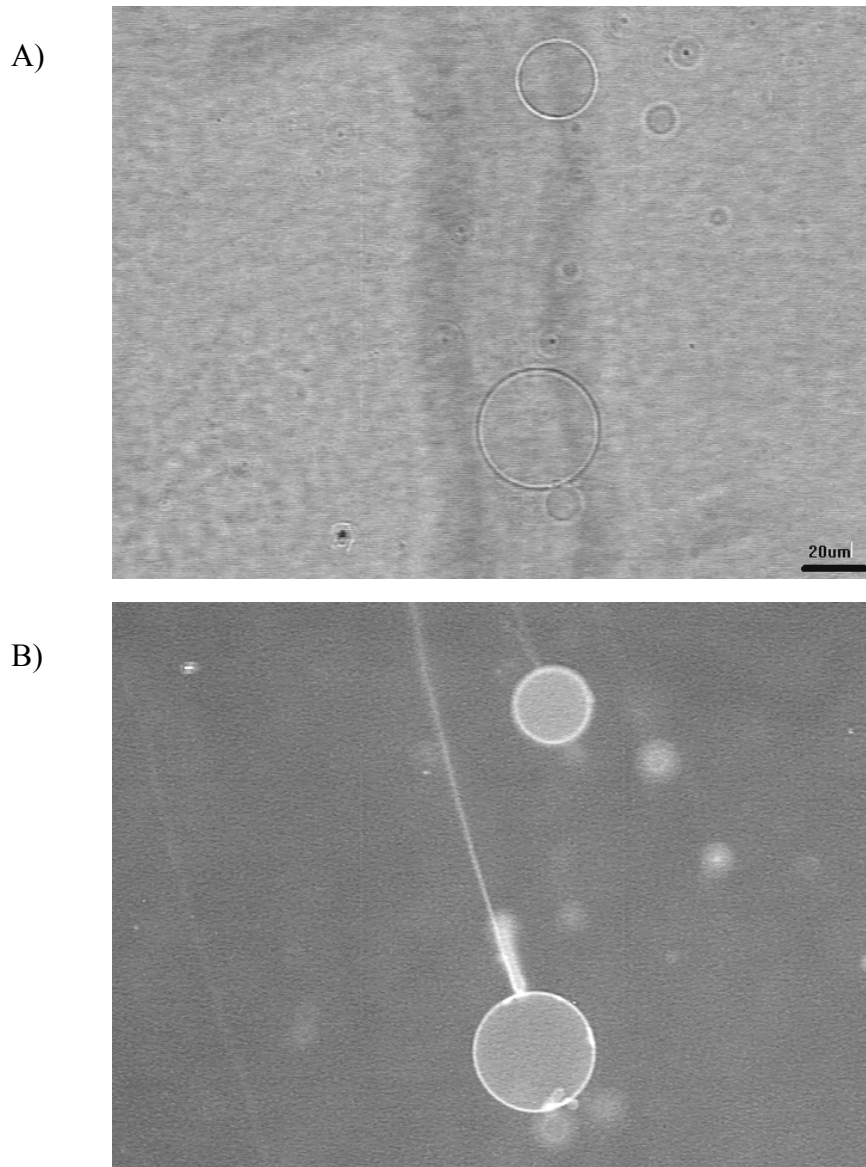


Figura 22. Observação de estruturas lipídicas em GUVs contendo NBD-PC. A) GUVs fotografadas sob contraste de fase. B) GUVs fotografadas sob irradiação de excitação de NBD. A barra indicando a escala é a mesma para as duas fotos.

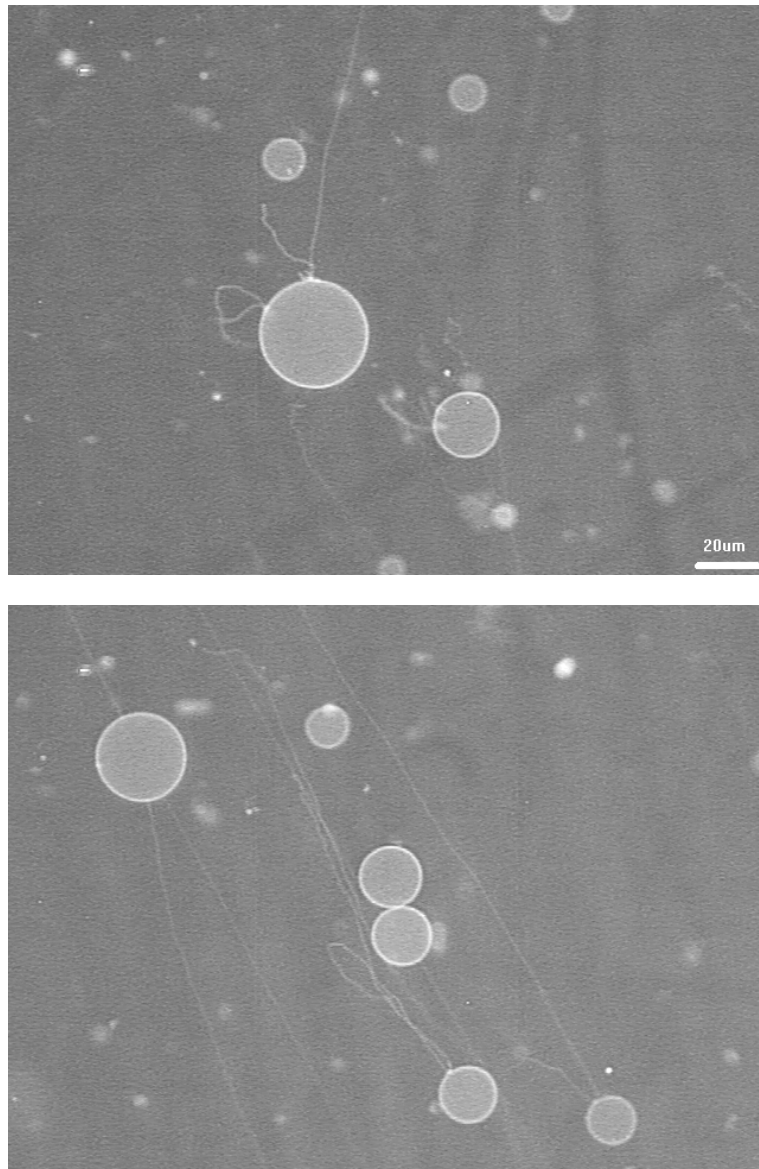


Figura 23: Observação de estruturas lipídicas em GUVs contendo NBD-PC. GUVs fotografadas sob irradiação de excitação de NBD. A barra indicando a escala é a mesma para as duas fotos.

As figuras 22 e 23 evidenciam estruturas lipídicas na forma de fios ou pequenos tubos que se encontram ligados às vesículas gigantes e de muito difícil observação sem o uso de análogos lipídicos fluorescentes. Estas estruturas podem ser as responsáveis por comunicação lipídica entre diferentes vesículas, como já observado em experimentos de recomposição de fluorescência (FRET) conduzidos por MATHIVET et al. (1996) e também pela já mencionada relaxação de tensões laterais da bicamada, no entanto demonstram claramente a inhomogeneidade na estrutura de certas vesículas.

Deve ser destacado que todos os resultados experimentais apresentados foram obtidos de GUVs que não apresentavam estruturas adjacentes visíveis. Até o momento não foi encontrada uma explicação definitiva pela presença destas estruturas nas diferentes eletroformações de GUVs. Determinadas eletroformações apresentam maiores quantidades de vesículas possuindo tais estruturas.

4.8. – Mudanças morfológicas de bicamadas lipídicas de GUVs

Possíveis causas de inhomogeneidade nas bicamadas de GUVs, de importância estrutural e de consequências na capacidade de internalização e/ou manutenção da baixa permeabilidade das bicamadas lipídicas puderam ser observadas em GUVs de DPPC e DSPC em suspensões produzidas pela mistura de iguais volumes de:

- suspensão de GUVs eletroformadas de DPPC ou DSPC em solução contendo [sac]=1mol/L. A eletroformação ocorreu em temperaturas superiores às temperaturas de transição destes lipídios. A suspensão foi mantida à temperatura ambiente ($T \sim 25^{\circ}\text{C}$) após a eletroformação.
- solução contendo [gli]=1mol/L.

Os resultados são apresentados nas figuras 24 e 25.

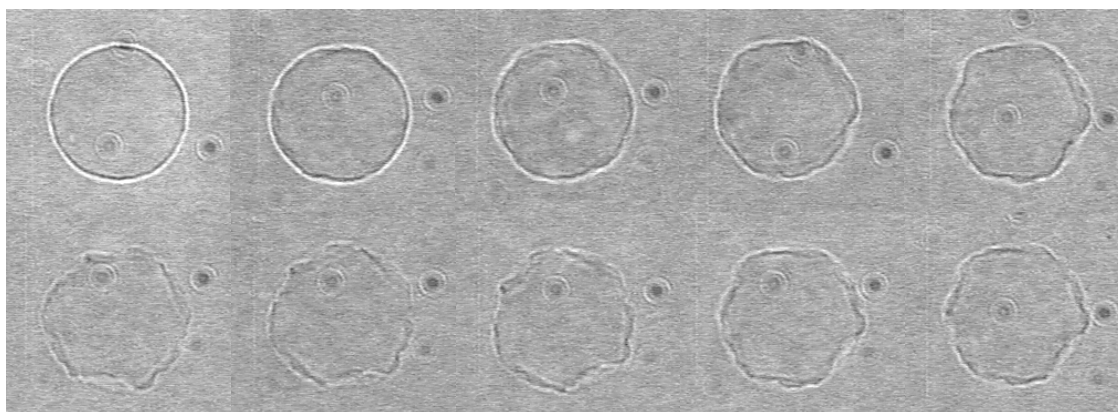


Figura 24. Monitoramento de GUV de DPPC. GUV fotografada sob contraste de fase com objetiva de 40x. No sentido horário, a partir do canto superior esquerdo: observação de mudança morfológica de GUV com o tempo. A GUV possui inicialmente diâmetro de $22\mu\text{m}$. Tempo total de monitoramento: 10 minutos.

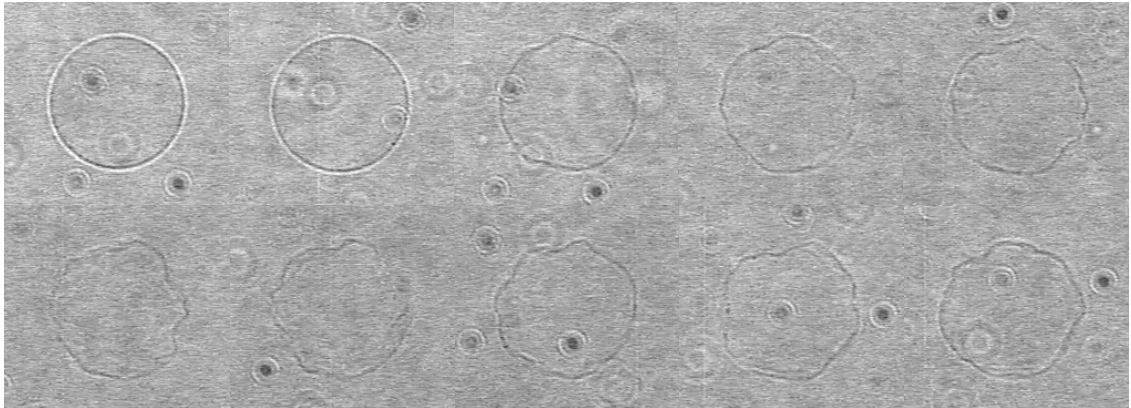


Figura 25. Monitoramento de GUV de DPPC. GUV fotografada sob contraste de fase com objetiva de 40x. No sentido horário, a partir do canto superior esquerdo: observação de mudança morfológica de GUV com o tempo. A GUV possui inicialmente diâmetro de $22\mu\text{m}$. Tempo total de monitoramento: 10 minutos.

A figura 26 apresenta o estado inicial e final da GUV observada na figura 25, evidenciando a perda de contraste imposta à GUV durante o processo.

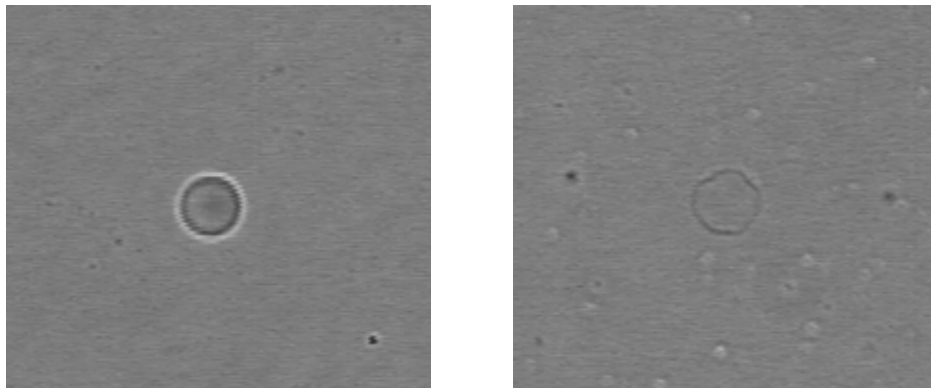


Figura 26. Perda de contraste de GUV de DPPC em campos fotografados sob contraste de fase com objetiva de 10x. Estado final e inicial da GUV apresentada na figura 25.

A figura 26 demonstra uma alteração da permeabilidade da bicamada resultando numa diminuição do gradiente de açúcares entre o meio interno e externo da GUV, observada pela diminuição da capacidade de observação da GUV por contraste de fase.

A figura 27 apresenta o estado final das GUVs observadas nas figuras 24 e 25, ambas após o processo de mudança morfológica observado.

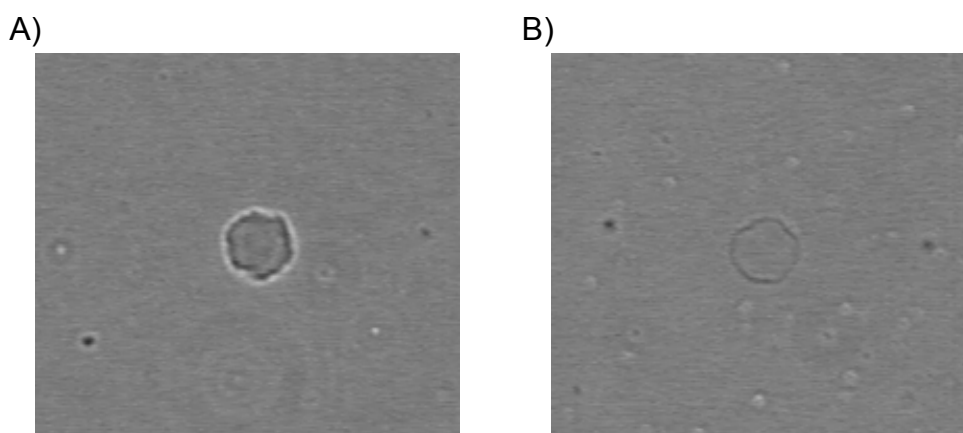


Figura 27. GUVs de DPPC em campos fotografados sob contraste de fase com objetiva de 10x. A) Estado final da GUV observada na figura 24. B) Estado final da GUV observada na figura 25.

A figura 27 demonstra que a GUV apresentada na figura 24 mostrou uma capacidade de manutenção do meio interno mesmo durante o processo de mudança morfológica, ao contrário do observado pela GUV apresentada na figura 25.

O processo de mudança morfológica observado em GUVs remete ao problema de inhomogeneidades locais e à individualidade das micro e sub-micro estruturas apresentadas pelas GUVs como causa de alterações de permeabilidade nas bicamadas lipídicas.

4.9. – Comparação com o modelo biomimético LUV.

Vesículas extrudadas (LUVs) contendo PTS em seu meio interno foram analisadas por fluorimetria para a comparar de resultados apresentados entre os diferentes modelos biomiméticos.

As suspensões de LUVs estudadas foram produzidas pela mistura de volumes de:

- suspensão de LUVs de DOPC formadas em solução contendo $[PTS]=1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$;
- solução contendo $[MV]=3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

A figura 28 apresenta a estabilidade da intensidade de fluorescência do meio interno das LUVs e demonstra que qualquer processo de indução de permeabilidade na bicamada de LUVs gera uma diminuição do sinal de fluorescência monitorado.

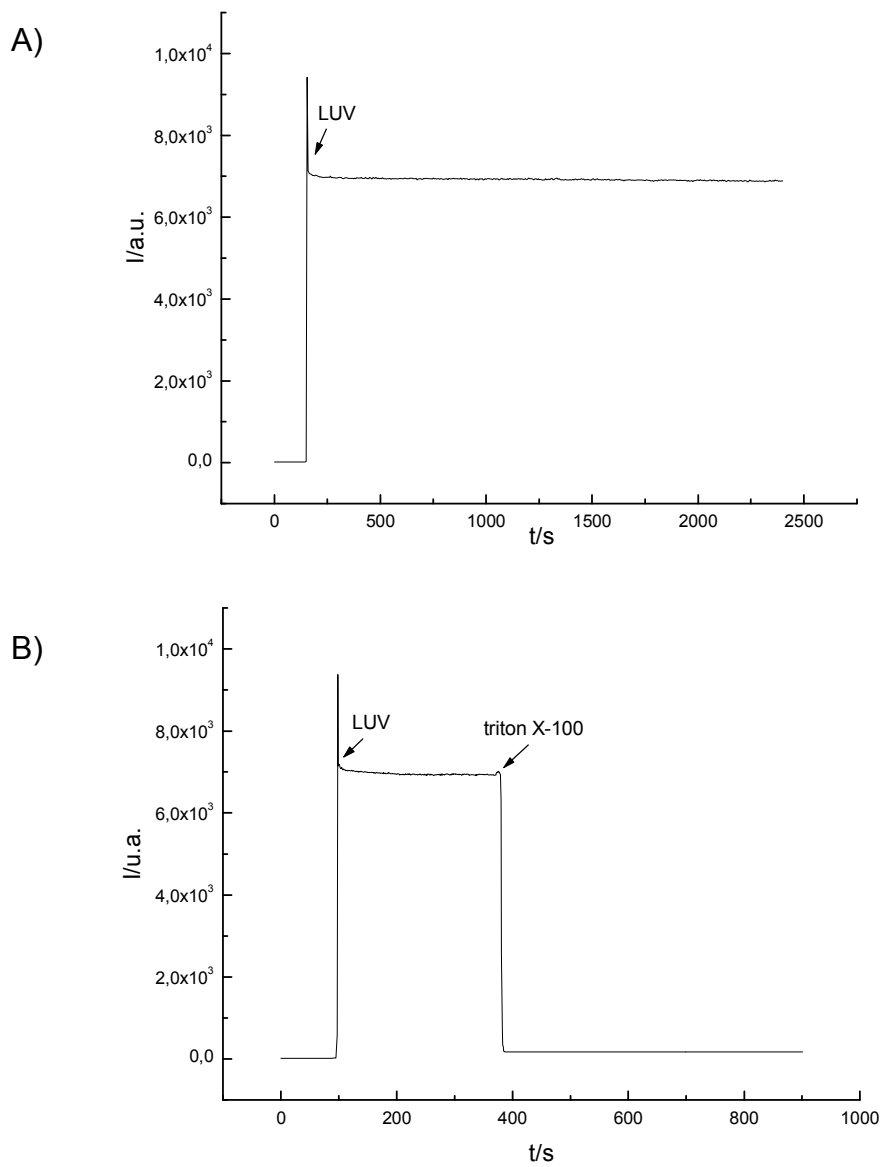


Figura 28. Gráficos de intensidade de fluorescência por tempo ($\lambda_{\text{exc.}}$ 370nm, λ_{emi} 400nm). A) Monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno de LUVs. A suspensão apresenta $[\text{DOPC}] = 4,2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. B) Adição de alíquota de suspensão de triton X-100 em suspensão de LUVs.

O item A da figura 28 demonstra a estabilidade da intensidade de fluorescência do meio interno de LUVs. Esta estabilidade pôde ser confirmada, como apresentado no item B da figura 28, pela alta concentração de triton X-100 necessária para o total rompimento das vesículas (triton X-100:DOPC ~1:1 em mol) e conseqüente intensidade mínima de fluorescência da suspensão. A aplicação na suspensão de triton X-100 em relações triton X-100:DOPC ~0,01 em mol (SOT et al., 2002) não teve nenhum efeito imediato na intensidade de fluorescência da suspensão. A presença de gradiente de açúcares não impôs qualquer diferença nos resultados apresentados na figura 28.

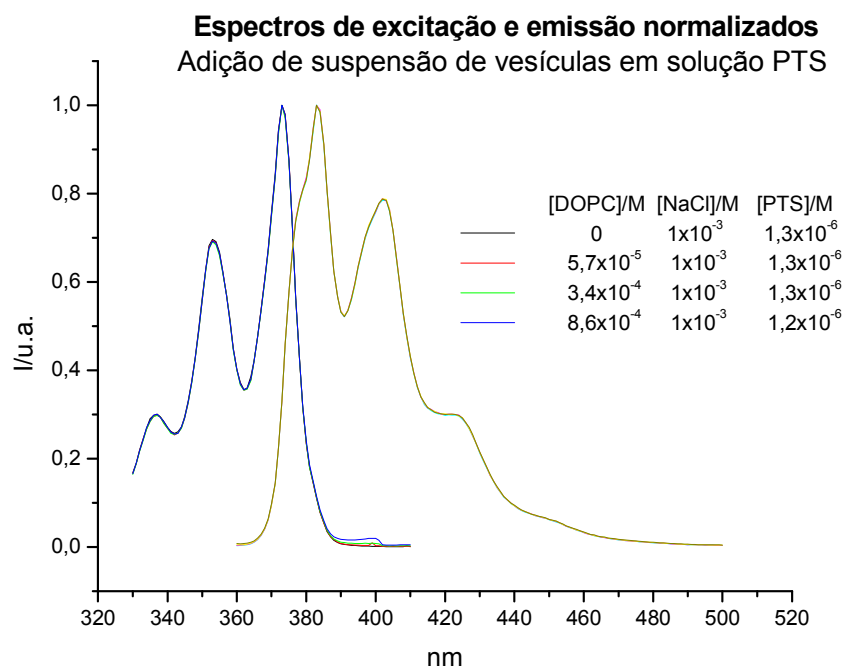
Suspensões de LUVs irradiadas em cubetas de 0,1mm de espessura mostraram a mesma estabilidade de intensidade de fluorescência apresentada em volumes maiores.

As interações de PTS-bicamada foram estudadas através de suspensões de LUVs produzidas pela mistura de volumes de:

- suspensão de LUVs de DOPC em solução contendo $[\text{NaCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$;
- soluções contendo PTS e $[\text{NaCl}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

As interações PTS-bicamada foram monitoradas pela obtenção de espectros de excitação e emissão do PTS na presença de LUVs mostrado na figura 29.

A)



B)

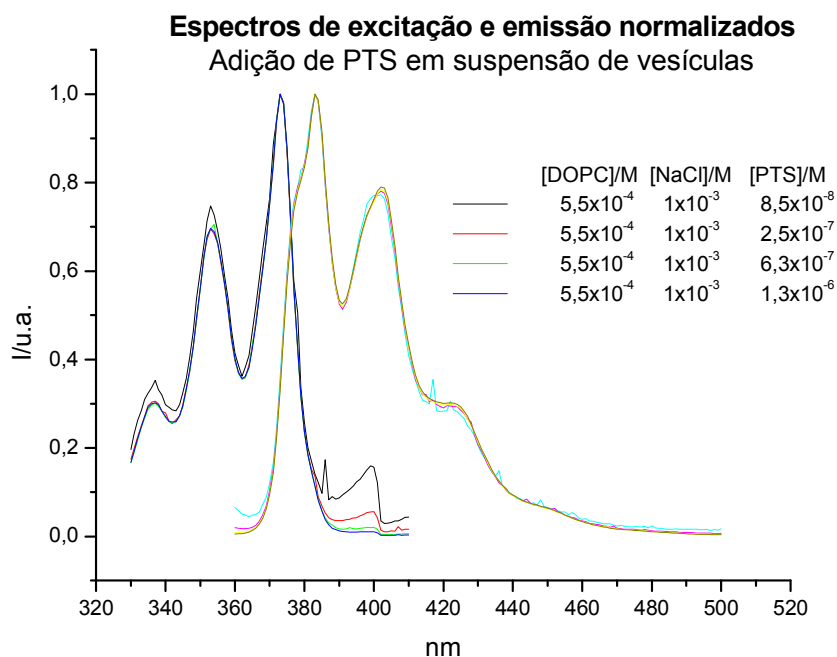


Figura 29. Espectros de excitação (emissão em 420nm) e emissão (excitação em 350nm) de fluorescência normalizados. A) Adição de LUVs de DOPC/NaCl em solução de PTS/NaCl. B) Adição de solução de PTS/NaCl em LUVs de DOPC/NaCl. As concentrações das suspensões estão inseridas nos gráficos.

A figura 29 demonstra que não foram observadas interações entre o PTS e bicamadas de DOPC de LUVs, descartando a participação dessas interações em possíveis processos causadores de inomogeneidades nas bicamadas.

4.10. – Fotoquímica do PTS em “xerogéis” de açúcares

Processos fotoquímicos do PTS puderam ser observados em soluções contendo PTS submetidas a altas concentrações de açúcares.

Inicialmente, suspensões de GUVs (vide suspensões definidas em RESULTADOS) depositadas em lâminas de vidro foram deixadas em repouso por períodos que variaram de horas a dias, promovendo por secagem a concentração dos açúcares presentes no meio. A suspensão depositada na lâmina, após esse período de secagem, adquiriu um aspecto vítreo, que será aqui chamado livremente por “xerogel”.

A figura 30 apresenta GUVs que resistiram ao processo de formação do “xerogel”.

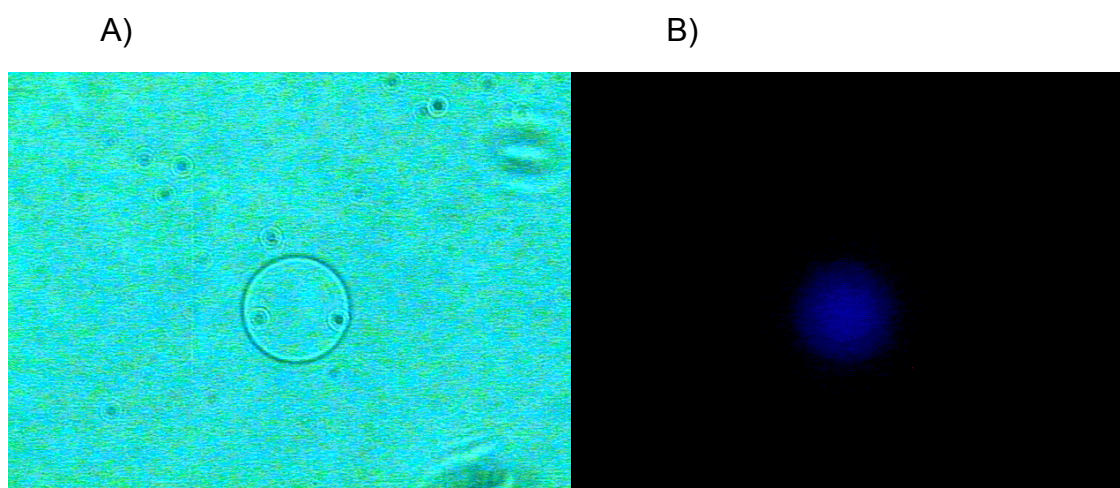
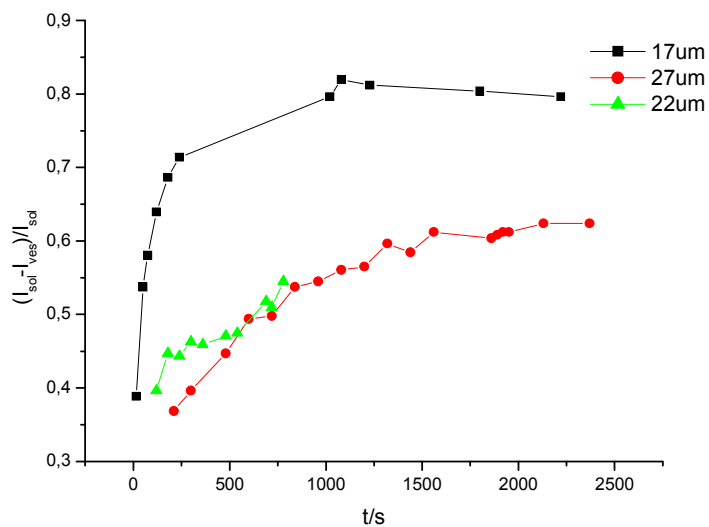


Figura 30: GUV em xerogel fotografada: A) sob contraste de fase e B) sob irradiação de excitação de PTS.

A estabilidade da GUV apresentada na figura 30 pode ser conferida pela manutenção do PTS em seu meio interno.

O monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs presentes no “xerogel” apresentou um inesperado aumento na intensidade de fluorescência destas GUVs, observado na figura 31.

A)



B)

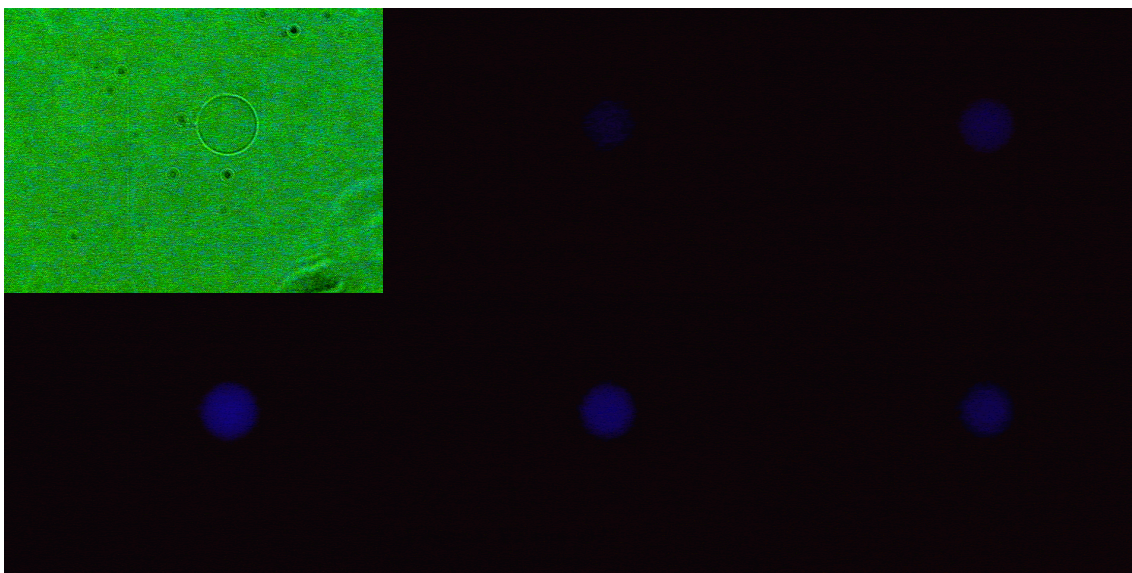


Figura 31. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs em “xerogéis”. A) Representação gráfica do aumento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs sob irradiação UV constante. O diâmetro das diferentes GUVs analisadas está inserido no gráfico. B) GUV em “xerogel” fotografada sob contraste de fase e sob irradiação de excitação de PTS. No sentido horário, a partir da foto no canto superior esquerdo: aumento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV.

A figura 32 demonstra que o aumento da intensidade de fluorescência do meio interno das GUVs também foi observado no meio externo das GUVs.



Figura 32. GUV em “xerogel” fotografada sob constante irradiação de excitação de PTS (imagens em escala de cinzas). A partir da esquerda observa-se um aumento da intensidade de fluorescência do meio interno e externo à GUV.

A figura 33 mostra a irradiação no microscópio de um “xerogel” de sacarose/PTS com objetiva de 40x e posterior observação da área com objetiva de 10x:

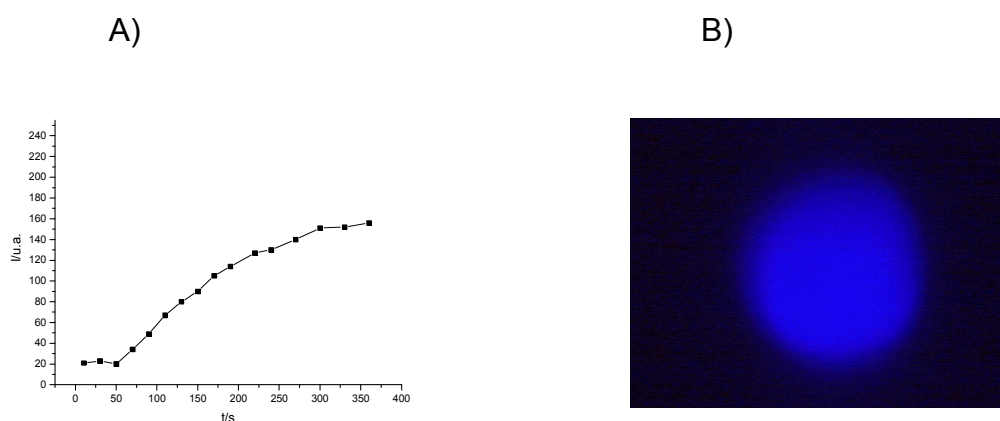


Figura 33. Irradiação de xerogel de PTS em sacarose com radiação UV constante em objetiva 40x. A) Representação gráfica do aumento da intensidade de fluorescência da área irradiada. b) Após 10 min de irradiação, observação do mesmo campo com objetiva 10x. A área irradiada pela objetiva de 40x apresenta um forte aumento na intensidade de fluorescência (mancha azul observada).

A figura 34 apresenta espectros de excitação e emissão de “xerogel” de PTS em sacarose durante processo de irradiação da amostra.

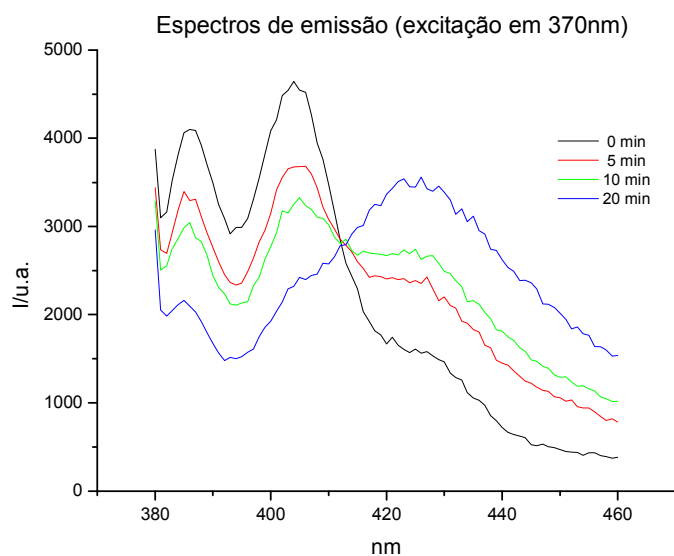
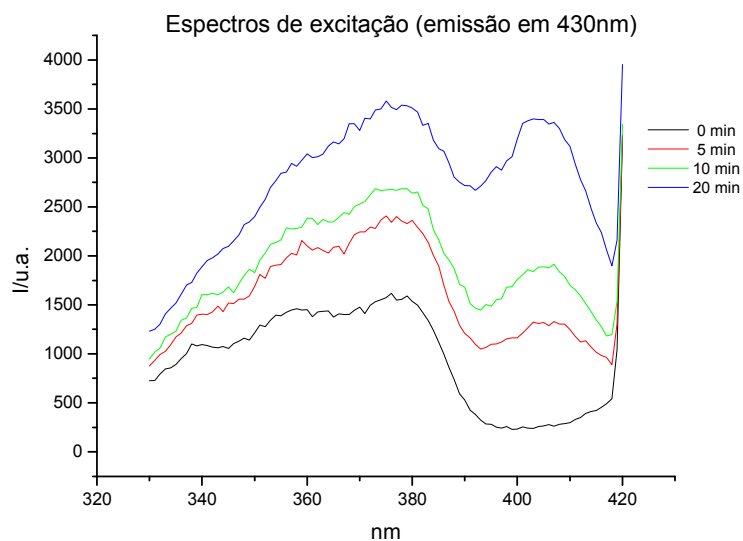


Figura 34. Espectros de excitação e de emissão de “xerogel” de PTS em sacarose durante irradiação constante em 370nm. Os tempos médios de irradiação do gel estão inseridos nos gráficos.

O aparecimento de máximos de excitação ~410nm e de emissão ~430nm mostram claramente o surgimento de subprodutos fotoquímicos no “xerogel” gerados por irradiação.

O aumento da fluorescência observado por microscopia é devido ao aumento da emissão na região >420nm observado no espectro de emissão após irradiação.

Embora tenham sido observadas reações fotoquímicas nos “xerogéis” de PTS e sacarose, estes mesmos indicadores de tais reações não são observados em soluções ou suspensões de açúcares apresentando concentrações $\leq 1\text{mol/L}$, usualmente utilizadas em experimentos de estabilidade de GUVs.

4.11. – Estabilidade apresentada por GUVs

Uma melhor compreensão dos fluxos gerados durante os decaimentos de intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs foi alcançada através de suspensões produzidas pela mistura dos itens descritos abaixo:

- suspensão de GUVs de DOPC eletroformadas em solução contendo $[PTS]=1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e $[sac]=1 \text{ mol/L}$;
- suspensão de LUVs de DOPC contendo NBD-PC em solução contendo $[PTS]=1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e $[sac]=1 \text{ mol/L}$;
- solução contendo $[MV]=2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e $[gli]=1 \text{ mol/L}$.

A figura 35 apresenta o monitoramento de uma GUV na suspensão acima descrita.

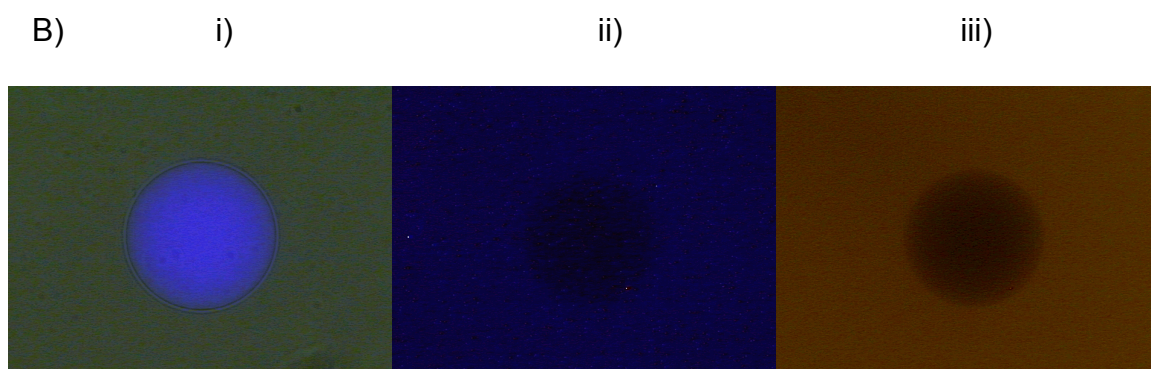
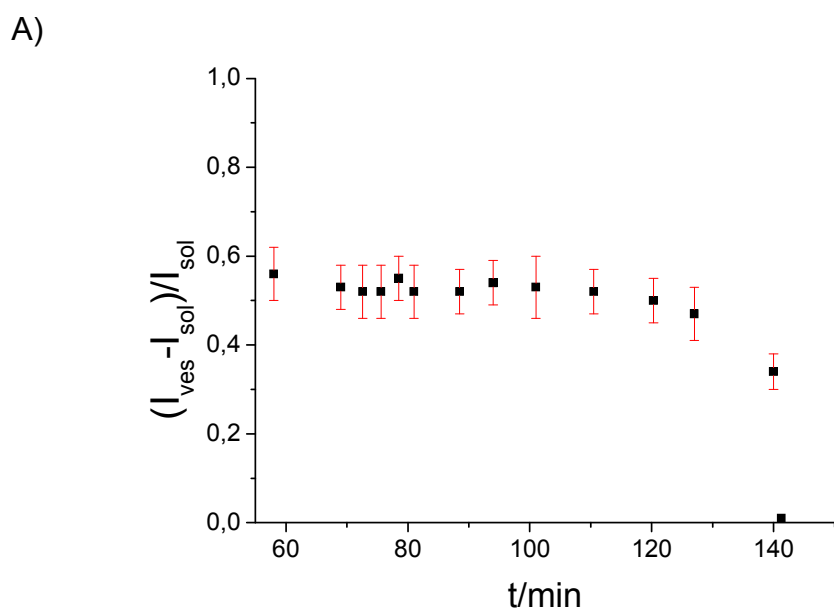


Figura 35. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUV A) Representação gráfica da intensidade de fluorescência do meio interno de GUV. B) Observação da GUV apresentada no gráfico A. i) e ii) Intensidade de fluorescência antes e depois do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV (campo fotografado sob irradiação de excitação de PTS). iii) Intensidade de fluorescência depois do decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV (campo sob irradiação de excitação de NBD). Nas fotos ii) e iii) a área da vesícula aparece como um círculo mais escuro.

A GUV apresentada na figura 35 apresentou uma estabilidade da intensidade de fluorescência do meio interno por 120 minutos, sob constante irradiação UV. Após este período de monitoração constante, a vesícula apresentou um decaimento total da intensidade do meio interno.

Entretanto, a figura 35 demonstra claramente que embora a GUV tenha apresentado um decaimento total da fluorescência do meio interno, esta ainda mantém a capacidade de separação do meio interno e externo,

não permitindo que as LUVs de DOPC/NBD-PC contendo PTS internamente penetrem em seu interior.

Pode ser observado na figura 35, que a fluorescência do NBD contido na bicamada das LUVs não é observada na área interna da GUV, o mesmo acontecendo com a fluorescência do PTS do meio interno das LUVs não sendo observada na área interna da GUV.

A figura 35 apresenta pela primeira vez que após um período de grande estabilidade de intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs, o decaimento pode ter se dado por modelos de poros transientes, com possíveis diâmetros menores que os diâmetros das LUVs, impedindo assim a entrada destas no volume da vesícula gigante.

Pode ser especulado da mesma forma um impedimento na entrada de qualquer material no volume da GUV promovido pela saída do material interno impulsionado pela pressão de Laplace. No entanto, algum material externo à vesícula gigante parece ter sido internalizado dada a total perda de fluorescência do PTS inicialmente internalizado e uma perda quase total do contraste de fase imposto pelo inicial gradiente de açúcares. Talvez pelos coeficientes de difusão de moléculas de açúcar e do MV serem maiores que os das vesículas extrudadas, a internalização destas últimas não tenha sido eficiente. De qualquer forma demonstrou-se uma mudança drástica e reversível na permeabilidade das vesículas gigantes. O mecanismo inferido pode ser compatível ao de um poro transiente.

As figuras 36 a 39 apresentam GUVs demonstrando grande estabilidade na manutenção da intensidade de fluorescência do meio interno sob irradiação UV constante.

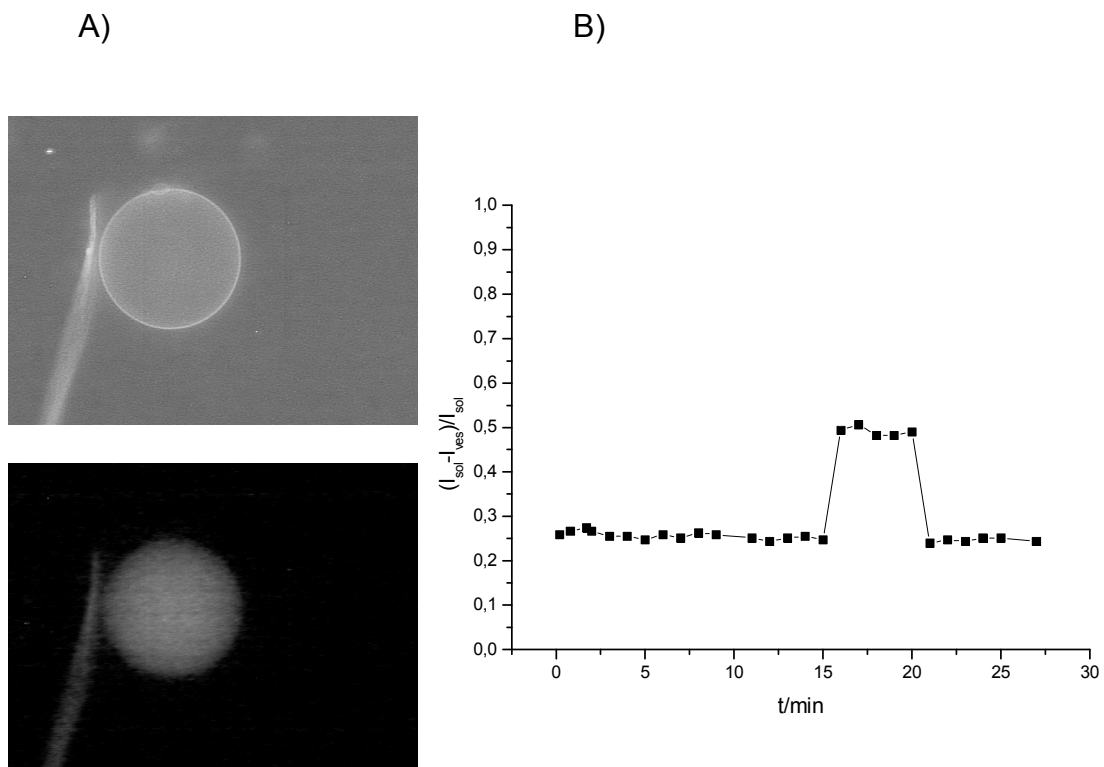
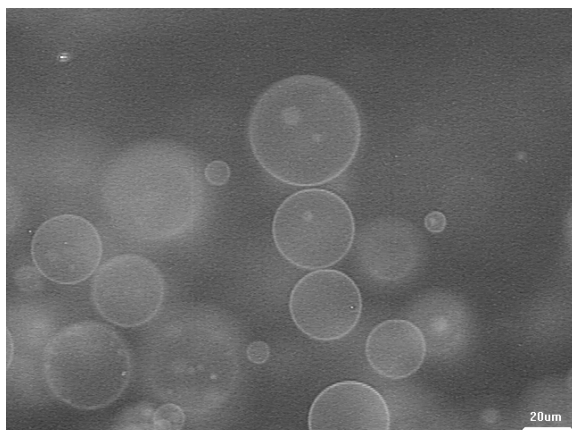


Figura 36. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUV (contendo NBD-PC na bicamada). A) Foto superior: campo sob irradiação de excitação de NBD. Foto inferior: campo sob irradiação de excitação de PTS. Fotos em escala de cinzas. B) Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV visualizada nas fotos do item A. Entre 15 e 20 minutos a sensibilidade da câmera CCD foi aumentada. A haste observada nas fotos é um fio de algodão. O diâmetro da vesícula é de $40\mu\text{m}$.

A)



B)

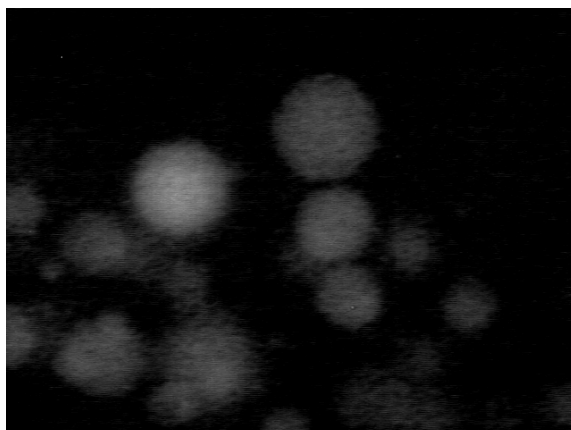
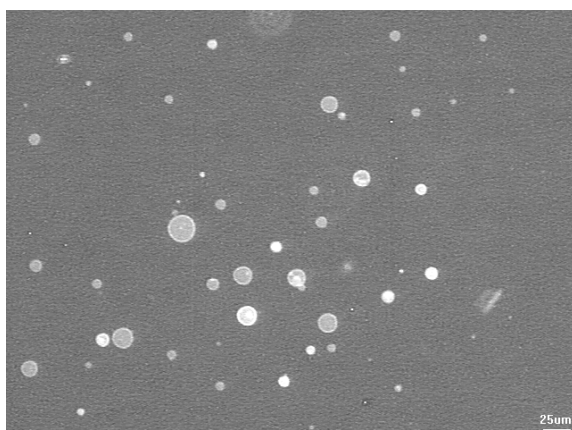


Figura 37. Estabilidade de GUVs. GUVs de DOPC/NBD-PC após várias horas em suspensão. A) Campo sob irradiação de excitação de NBD. B) Campo sob irradiação de excitação de PTS. Fotos em escala de cinzas. A barra de escala é igual para as duas fotos.

A)



B)

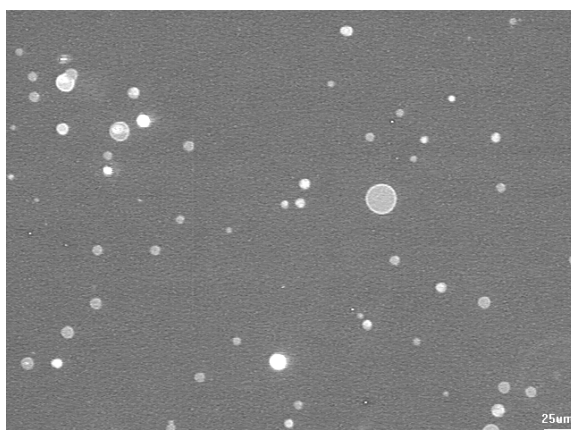


Figura 38. Estabilidade de GUVs. GUVs de DOPC/NBD-PC após cinco horas em suspensão. Fotos em escala de cinzas, obtidas de campos sob irradiação de excitação de NBD. A barra de escala é igual para as duas fotos. Praticamente todas as vesículas apresentam fluorescência de PTS no meio interno.

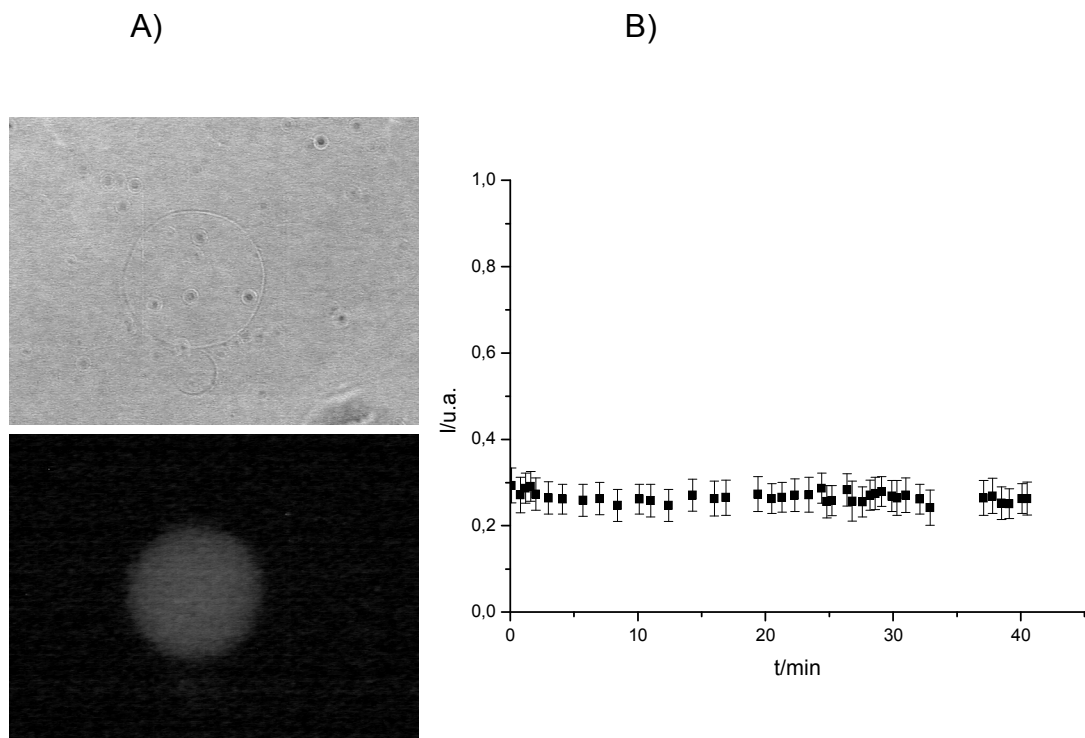


Figura 39. Intensidade de fluorescência do meio interno de GUV (contendo NBD-PC na bicamada). Fotos obtidas após 4 dias na suspensão. A GUV flutua fortemente. A) Foto superior: campo sob contraste de fase. Foto inferior: campo sob irradiação de excitação de PTS. Fotos em escala de cinzas. B) Representação gráfica do monitoramento da intensidade de fluorescência do meio interno da GUV visualizada nas fotos do item A.

Conforme apresentado nas figuras 36 a 39, as GUVs podem ser extremamente estáveis em suas capacidades de internalização. Entretanto ainda é bastante rudimentar a interpretação de quando a vesícula apresentará esta estabilidade.

5 – DISCUSSÃO

Os resultados dos monitoramentos de suspensões de GUVs eletroformadas através de técnicas de microscopia foram compilados e discutidos nesta seção sob o modelo de poros transientes apresentado na INTRODUÇÃO.

O modelo de poros transientes se baseia num aumento na tensão da bicamada, podendo esta ser gerada de vários modos. Uma vez a bicamada tensionada, poros seriam abertos para relaxação desta tensão, com concomitante efluxo da solução internalizada pela GUV, modelada pela pressão de Laplace. A bicamada da GUV é relaxada pela diminuição do volume interno e submetida ao fechamento do poro guiado pela tensão de linha, minimizando o componente energético de curvatura dos lipídios nas bordas do poro.

Os resultados experimentais apresentados neste trabalho representam diferentes etapas do processo de poros transientes criados em bicamadas lipídicas de GUVs e serão abordados a seguir.

Troca de massa entre meios interno e externo das GUVs

Conforme apresentado no item 4.1., GUVs de mesmo diâmetro apresentam intensidades de fluorescência do meio interno diferentes entre si, evidenciando trocas de massa entre os meios interno e externo. Caso não houvesse nenhum tipo de troca entre os meios, seria esperado que GUVs de mesmo diâmetro, considerando a forma esférica, apresentassem intensidades de fluorescência de fluoróforos no meio interno similares, sendo essas intensidades maiores para GUVs de maior diâmetro. Devido à impermeabilidade das GUVs, como veremos a seguir, a troca de massa entre os meios interno e externo das GUVs acontece durante o tempo em que os poros transientes permanecem abertos.

Possibilidade de fluxos unilaterais

O modelo de poros transientes contempla a possibilidade da existência de fluxos unilaterais (efluxos) do meio interno das GUVs para o meio externo. Conforme apresentado no item 4.5., GUVs monitoradas com a presença de PTS no meio externo não permitiram a entrada do PTS para o meio interno. Duas observações são possíveis a partir deste resultado: (i) a GUV monitorada não ter apresentado poros transientes durante o período experimental e (ii) a GUV ter apresentado poros transientes, porém com o fluxo unilateral (efluxo) devido à tensão da bicamada. As duas observações podem ser consideradas etapas do processo de poros transientes.

Transitoriedade dos poros

Conforme apresentado no item 4.6., GUVs que apresentaram interação entre sua bicamada lipídica e superfície mantiveram a capacidade de manutenção do meio interno mesmo após a perda de área de bicamada. Após o relaxamento da bicamada lipídica através da formação de poros, estes foram selados, mantendo a capacidade de internalização da GUV.

Tamanho limite dos poros

Conforme apresentado no item 4.11., no decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de uma GUV monitorada em meio à LUVs, não foi observada a internalização das LUVs no meio interno da GUV. No modelo de poros transientes, o influxo de LUVs para o meio interno de GUVs é limitado pelo tamanho do poro, menor que 100-120nm (diâmetro hidrodinâmico das LUVs).

Falta de correlação entre os decaimentos da intensidade de fluorescência do meio interno das GUVs

A dificuldade em correlacionar os decaimentos com o tamanho da GUV, tempo de eletroformação, contato com superfície, concentrações de açúcares ou concentração de fluoróforos e supressores no meio é a expressão dos diferentes períodos e fenômenos exigidos para a geração das tensões na bicamada que induzirão a formação dos poros transientes.

Estabilidade de GUVs na manutenção do meio interno

Conforme apresentado no item 4.11., GUVs que apresentam grande estabilidade de manutenção do meio interno, monitorada pela estabilidade da intensidade de fluorescência, podem perder esta estabilidade pela formação de poros transientes causados pelo tensionamento da bicamada lipídica. Entretanto, a existência de GUVs foto-estáveis elimina qualquer teoria de foto-indução no PTS e direciona a foto-indução para a bicamada e suas interações com a superfície e soluções.

Os itens a seguir expressam discussões adicionais sobre os resultados experimentais que corroboram na aplicabilidade do modelo de poros transientes.

5.1. – Estruturas de bicamadas lipídicas de GUVs

Estruturas lipídicas macroscópicas ligadas às GUVs foram observadas com o auxílio de análogos lipídicos fluorescentes conforme apresentado no item 4.7. Estas estruturas podem ser responsáveis por interações com superfícies e com outros agregados lipídicos, podendo agir como geradoras ou relaxadoras de tensão na bicamada. Segundo o modelo de poros transientes (vide INTRODUÇÃO), o aparecimento de poros é função da tensão na bicamada. Possíveis estruturas que ajam no tensionamento ou

relaxamento da bicamada lipídica alterariam de forma expressiva a dinâmica de aparecimento de poros. Desta forma, fenômenos explicados pelo modelo de poros transientes seriam afetados pela dinâmica de aparecimento dos poros na bicamada.

O item 4.7. remete à possíveis estruturas sub-microscópicas existentes e suas relações com a dinâmica dos processos de GUVs modelados por poros transientes e monitorados por microscopia. A diferenciação nos tempos de aparecimento e nas cinéticas de processos podem ser afetadas por um número maior ou menor de estruturas sub-microscópicas adjacentes às GUVs monitoradas.

Processos macroscópicos de mudanças estruturais em bicamadas lipídicas foram apresentados no item 4.8.. GUVs eletroformadas com lipídios de T_c acima da temperatura ambiente e submetidas aos usuais gradientes de açúcares apresentaram um processo de “enrugamento”.

A alteração de permeabilidade na bicamada causada por inhomogeneidades geradas durante o processo de enrugamento são contrastadas com a manutenção do meio interno de algumas GUVs, monitoradas por contraste de fase. De forma similar ao exposto acima, estruturas sub-microscópicas podem estar envolvidas na diferença dos resultados apresentados ou nas cinéticas desses resultados.

5.2. – Decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs: possível foto-indução

Conforme observado no item 4.1., determinadas GUVs apresentaram grande correlação entre a intensidade de irradiação UV e o decaimento da intensidade de fluorescência de seu meio interno.

O fenômeno da foto-indução não pôde ser relacionado com gradientes de densidade, contato entre bicamada e superfície, prévio decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno ou tempo de estabilização na suspensão.

Alguns efeitos descritos (SANDRE et al., 1999; KARATEKIN et al., 2003) da luz em propriedades de bicamadas lipídicas de GUVs, são apresentados e discutidos a seguir:

- A diminuição de superfície de GUVs através de oxidação lipídica;
- A perda lipídica através do efeito dielétrico com o uso de pinças óticas;
- O empacotamento lipídico em estruturas mais estáveis;
- O aparecimento de poros transientes induzidos por iluminação.

A diminuição de superfície pode ser provocada por oxidação lipídica. Produtos de fotooxidação deixariam a bicamada na forma de pequenos agregados e alguns fosfolipídios intactos em estruturas não resolvíveis óticamente, devido a maior solubilidade na fase aquosa e menor peso molecular destes produtos de fotooxidação.

A oxidação lipídica não está descartada como geradora de tensões na bicamada, principalmente por grande parte dos resultados terem sido obtidos por bicamadas de DOPC. Entretanto, como apresentado na seção RESULTADOS, fenômenos observados em bicamadas de DOPC também foram monitorados em bicamadas compostas de lipídios saturados como DMPC e DPPC. Também apresentado na seção RESULTADOS, existem exemplos de GUVs de DOPC que apresentaram alta foto-estabilidade.

Embora possíveis geradores de tensões na bicamada lipídica, a oxidação lipídica não explica *per se* todos os resultados de foto-indução em GUVs.

A perda lipídica imposta à bicamadas através do efeito dielétrico foi proposta por BAR-ZIV et al. (1998). Em razão de este efeito ter sido proposto com o uso de pinças óticas, com o fluxo de fótons muito maior que os utilizados na parte experimental deste trabalho, este fenômeno não deve contribuir de forma intensa na geração de tensões na bicamada das GUVs.

O empacotamento lipídico em estruturas mais estáveis, como fases cúbicas de fosfatidilcolina (KUMMROW e HELFRICH, 1996) foi descrito como possível gerador de tensões laterais na bicamada. Devido a observação destas estruturas não ser possível através da metodologia utilizada neste

trabalho, este fenômeno pode ser considerado como possível gerador de tensão nas bicamadas das GUVs.

O aparecimento de poros transientes induzidos por iluminação em bicamadas de GUVs já foram relatados na literatura (SANDRE et al., 1999; BROCHARD-WYART et al., 2000; KARATEKIN et al., 2003). O período de indução para o aparecimento dos poros variou de minutos a horas, sendo possivelmente determinado pela quantidade e natureza das estruturas lipídicas micro e sub-microscópicas adjacentes às GUVs.

A incorporação de estruturas de finos “fios lipídicos” conectados à GUVs foram descritos na literatura (ROSSIER et al., 2003) como responsáveis pela diferença nos tempos de indução para o aparecimento de poros transientes observada entre diferentes GUVs. Uma vagarosa incorporação de estruturas pode ser resultante de um aumento da tensão de bicamada. Não existindo mais agregados para serem incorporados para aliviar a tensão da bicamada, a GUV se torna perfeitamente esférica, perde suas flutuações e um poro transiente aparece.

Exemplos de estruturas lipídicas adjacentes às GUVs foram apresentadas no item 4.7. e discutidas nesta seção como possíveis geradoras ou relaxadoras de tensões na bicamada.

Todos os efeitos de irradiações em bicamadas lipídicas discutidos neste item podem corroborar para a geração de tensões na bicamada de GUVs. As GUVs apresentando tensões na bicamada lipídica, podem apresentar os processos de decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs pela presença de poros. Desta forma, o modelo de poros transientes também se aplica à estes fenômenos monitorados em GUVs.

5.3. – Aumento da intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs: relação com mudanças morfológicas

O aumento da intensidade de fluorescência apresentado no item 4.2. pode ser explicado por um aumento do caminho ótico analisado devido a mudanças conformacionais transientes e/ou aumento na tensão da bicamada lipídica da GUV.

Mudanças conformacionais transientes, como abordado na introdução, podem ser observadas em GUVs com tensões de bicamada próximas a zero, sendo expressão da degenerescência de estados energéticos das GUVs governados pela energia de curvatura e modelos de elasticidade de diferença de área. Sendo o rendimento quântico do PTS próximo a 1, a intensidade de fluorescência do meio interno das GUVs é uma função da concentração do PTS internalizado e da geometria da GUV.

Definindo o eixo z como perpendicular aos eixos x e y que definem o plano de observação das GUVs, quanto maior a altura da GUV no eixo Z (caminho ótico monitorado), maior a intensidade de fluorescência do meio interno. Desta forma, quaisquer mudanças conformacionais das GUVs que alterem o comprimento da GUV no eixo z provocam mudanças da intensidade da fluorescência do meio interno monitorado.

Tensões na bicamada lipídica podem provocar mudanças morfológicas nas GUVs. A imposição de tensões de bicamada sob restrições de volume constante em GUVs não esféricas conduz a GUV à forma esférica. Como exposto acima, o aumento do comprimento da GUV no eixo z causado pela forma esférica provoca um aumento da intensidade da fluorescência do meio interno monitorado.

Como observado nas figuras do item 4.2. , uma redução da área meridional de GUVs é causada pela forma esférica atingida pela GUV, com conseqüentes aumento do comprimento da GUV no eixo z e aumento da intensidade da fluorescência do meio interno.

Estas tensões na bicamada podem ser geradas por interações entre a bicamada e superfícies ou outros fenômenos que retirem área da bicamada das GUVs.

Aumentos na intensidade de fluorescência do meio interno de GUVs causados pelo aumento do número de moléculas de PTS por volume da GUV (n_{PTS}/V) podem ser descartados.

Esta concentração de PTS no volume interno de uma GUV poderia ser provocada por um fluxo de água do meio interno para o meio externo das GUVs imposto pelo aumento da pressão no meio interno nas seguintes condições:

- desequilíbrio osmótico entre meios interno e externo das GUVs. Passagem de água através da bicamada para equilíbrio osmótico.
- tensões na bicamada lipídica das GUVs suficientes para impor um aumento na pressão interna nas GUVs. A passagem de água através da bicamada diminui o volume interno da GUV, diminuindo a tensão da bicamada.

Os dois mecanismos são improváveis de existir no sistema apresentado pois: (i) as GUVs são analisadas em meios isoosmóticos, garantindo a inexistência de pressões osmóticas entre meios interno e externo das GUVs e (ii) as tensões de bicamada necessárias para a promoção da passagem de água através da bicamada da GUV seriam superiores à tensão de ruptura da bicamada.

5.4. – Manutenção do gradiente de açúcares em GUVs que sofreram decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno

Conforme abordado no item 4.4., GUVs monitoradas que sofreram decaimento total da intensidade de fluorescência do meio interno, apresentavam ainda intenso contraste de fase, indicando não ter ocorrido o equilíbrio das concentrações de açúcares entre meios interno e externo.

A não equalização das concentrações de açúcares durante o período monitorado pode ser interpretada pela diferença entre as concentrações de fluoróforos e supressores ($\sim 10^{-3}$ mol/L) e de açúcares (~ 1 mol/L) entre os

meios interno e externo das GUVs. Em razão destas diferenças de concentrações, o equilíbrio entre fluoróforos e supressores é atingido mais rapidamente e com menor troca de massa do que o necessário para o equilíbrio das concentrações de açúcares.

Segundo o modelo de poros transientes na bicamada lipídica apresentado na INTRODUÇÃO, a troca de massa entre os meios interno e externo das GUVs é possível durante o tempo que o poro permanece aberto.

Os resultados apresentados nas GUVs observadas no item 4.4. indicam dois possíveis processos:

- a tensão da bicamada foi relaxada, a GUV não abre mais poros e se mantém observável por contraste de fase em razão do equilíbrio entre as concentrações de açúcares não ter sido atingido;
- a tensão da bicamada ainda existe, poros transientes na bicamada continuam a existir, porém por ser necessária uma maior troca de massa entre os meios interno e externo, o período de observação da GUV por contraste de fase é maior que por fluorescência do meio interno.

5.5. – Interação bicamada-superfície

O uso do análogo lipídico fluorescente NBD-PC demonstrou que interações bicamada-superfície podem ser a causa do aumento da tensão nas bicamadas lipídicas das GUVs e conseqüente formação de poros transientes conforme modelo apresentado na INTRODUÇÃO.

As interações bicamada-superfície retiram área da bicamada conforme apresentado no item 4.6. Em razão das restrições de área e volume interno constante nas GUVs, qualquer retirada de área de bicamada lipídica impõe uma tensão na bicamada. A tensão desta forma gerada na bicamada pode ser relaxada pela formação de poros transientes e diminuição do volume interno das GUVs pelo fluxo do meio interno para o externo ser maior que o inverso.

Deve ser enfatizado que a interação bicamada-superfície observada no item 4.6. não é causada pela presença do NBD-PC, pois muitas GUVs

contendo NBD-PC em suas bicamadas não apresentam esses padrões de manchas adjacentes à GUV, mesmo após longos períodos de monitoramento.

Devido ao arranjo experimental de monitoramento das GUVs, as interações apresentadas no item 4.6. só puderam ser observadas por se apresentarem em áreas não encobertas pelo diâmetro das GUVs. Quaisquer interações entre as bicamadas de GUVs e superfícies que ocorram em áreas ocultadas pelo diâmetro das GUVs não podem ser visualizadas com a metodologia descrita neste trabalho.

5.6. – Comparação com o modelo biomimético LUV

Alguns fenômenos monitorados em GUVs, como o decaimento da intensidade de fluorescência do meio interno, não foram observados em LUVs.

As LUVs possuem diâmetros menores que as GUVs, o que lhes confere um maior coeficiente de difusão nas suspensões. Em função dos volumes internos, um mesmo gradiente de densidade aplicado à GUVs e LUVs produz nestas últimas um menor coeficiente de sedimentação. Estas características dos dois sistemas, aliado ao método de monitoramento, com as GUVs sendo analisadas individualmente e as LUVs sendo analisadas como suspensões, podem diferenciar os sistemas biomiméticos no que tange a:

- Intensidade de irradiação: O monitoramento da fluorescência de uma GUV é conduzido pela irradiação constante de um campo contendo uma única GUV, sem que a GUV deixe esse campo monitorado. O monitoramento de fluorescência de LUVs tem de ser conduzido num volume de suspensão contendo inúmeras LUVs. Dada a mobilidade das LUVs na suspensão, existe a entrada e saída de LUVs no volume de suspensão monitorado. Deste modo, a intensidade de irradiação sobre a GUV é maior do que sobre uma única LUV.

- Contato bicamada lipídica-superfície: Em razão dos menores volumes internos, as LUVs têm maior mobilidade nas suspensões, menores coeficientes de sedimentação e suas bicamadas estão sujeitas a menores forças resultantes quando em meios contendo gradientes de densidade. Assim, o contato bicamada-superfície é mais favorecido em GUVs.

Desta forma, fenômenos que tiverem suas origens na intensidade de irradiação ou em contatos da bicamada lipídica-superfície podem não ser expressos da mesma maneira nos dois sistemas.

5.7. – Fotoquímica do PTS

Os resultados apresentados no item 4.10., indicam que o PTS em “xerogéis” sofre reações fotoquímicas, provável resultado da concentração das espécies durante o processo de secagem.

Deve ser enfatizado que o PTS não apresentou reações foto-induzidas em nenhum resultado experimental com exceção aos “xerogéis”. O PTS se mostrou fotoquimicamente estável, como previsto pelo alto rendimento quântico de fluorescência em solução e pelos resultados experimentais de GUVs com estabilidade da intensidade de fluorescência do meio interno contendo PTS (item 4.11.)

O PTS também se mostrou fotoquimicamente estável na presença de açúcares (com exceção de sistemas apresentados como “xerogeis”), MV e nas diferentes intensidades fotônicas (fluorímetro e microscópio), cobrindo todos os arranjos experimentais utilizado nas GUVs.

O PTS também não demonstrou nenhuma interação com DOPC, conforme apresentado nos espectros de excitação e emissão do PTS em presença de DOPC (item 4.9).

6 – CONCLUSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização de GUVs para sua utilização como modelo biomimético. Os resultados e discussões apresentados nas seções anteriores podem ser interpretados em conjunto como propriedades intrínsecas das GUVs.

O modelo de poros transientes explica a grande variabilidade dos resultados apresentados. A tensão da bicamada é considerada a maior responsável por esta variabilidade, por ser a força motriz para o processo de abertura de poros.

O modelo de poros transientes explica os resultados como troca de massa entre meios interno e externo das GUVs, possibilidade da existência de fluxos unilaterais em GUVs, transitoriedade dos poros, tamanho limite dos poros e manutenção do meio interno em GUVs após abertura e fechamento de poros.

Este trabalho não elucida completamente os mecanismos de desestabilização e estabilização das GUVs mas traz uma gama de resultados para interpretações que viabilizem a utilização deste modelo em experimentos biomiméticos.

Quais são as origens do aumento de tensão na bicamada, responsável pelo processo de poros transientes, quando prevê-la e como evitá-la são questões propostas para a continuidade deste trabalho. O que desestabiliza as GUVs e como elas são reestabilizadas é de suma importância para a caracterização deste modelo.

7 – APÊNDICE

7.1. – Calorimetria diferencial de varredura

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) mede a capacidade calorífica de excesso dos sistemas lamelares em função da variação da temperatura à pressão constante. Esta técnica pode detectar as transições entre as diferentes fases lamelares apresentadas pelos lipídios (L_{β} , $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$, L_{α})[¶] pela existência de picos de calor específico (C_p). A largura destes picos pode ser associada com a cooperatividade das transições e o pico de maior calor específico é relativo à transição gel – líquido cristalino ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) dada a alta entalpia associada à transição das cadeias alquílicas dos lipídios. Como

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p$$

a integração dos picos fornece a entalpia das transições.

O estudo das temperaturas de transição e pré-transição das diferentes suspensões lipídicas pode indicar uma diferença no empacotamento lipídico entre as diferentes suspensões, sendo detectável por diferenças nas entalpias de transição.

Os dados apresentados na figura 40 são referentes a diferentes amostras de suspensões vesiculares de DMPC em concentrações de 40 $\mu\text{mol/L}$:

[¶] Nomenclatura das fases lamelares. As letras latinas significam o tipo de arranjo cristalino. L corresponde a um arranjo lamelar unidimensional e P a um arranjo oblíquo bidimensional. As letras gregas descrevem a organização das cadeias alquílicas e dos grupos polares. α corresponde ao estado de alta temperatura das cadeias, no estado desordenado, β e β' correspondem às cadeias no estado ordenado, respectivamente paralelas ou inclinadas em relação à normal. Em temperaturas mais baixas, um estado γ pode ser atingido onde os grupos polares se tornam ordenados.

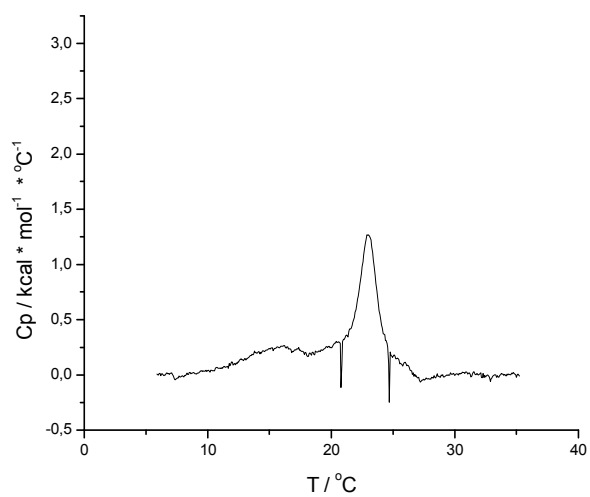
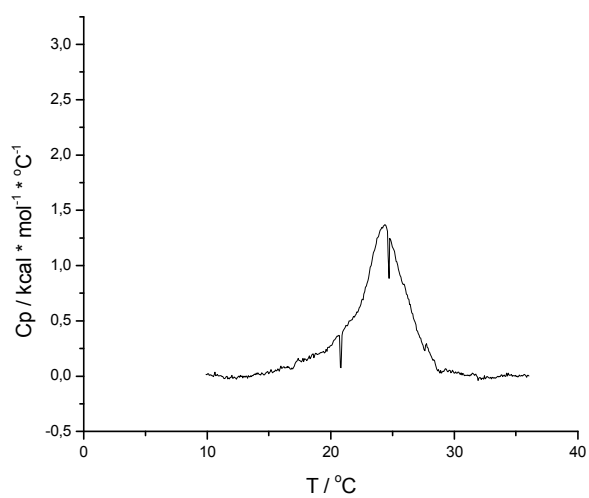
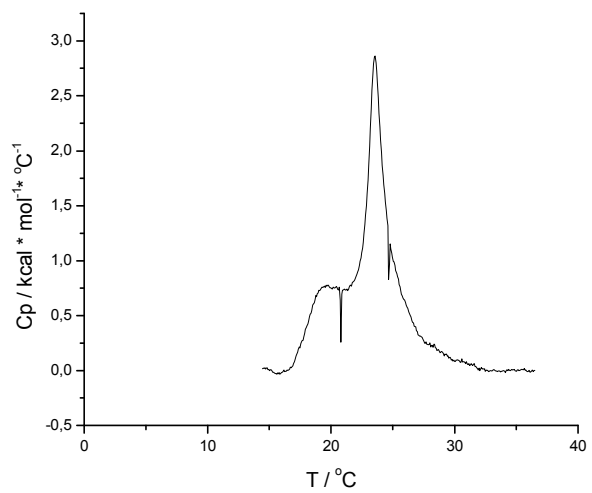


Figura 40. Termogramas de suspensões lipídicas de DMPC obtidas por (de cima para baixo) vortexação de filme de DMPC; extrusão de suspensão vortexada e eletroformação. Velocidade de varredura de 60°C/h .

Os termogramas foram corrigidos pela subtração por termogramas de água pura, determinação de linha de base e posterior subtração do termograma da linha de base gerada.

As temperaturas de transição de fase gel – líquido cristalina observadas nas figuras acima juntamente com as entalpias das transições calculadas pelas integrações das curvas foram respectivamente : 23,5°C e 10,1kcal/mol nas suspensões de vesículas vortexadas, 24,4°C e 6,6kcal/mol nas suspensões de vesículas extrudadas e 22,9°C e 4,7kcal/mol nas suspensões eletroformadas.

A temperatura descrita na literatura (MARSH, 1990) para a transição de fase gel–líquido cristalina do DMPC é $23,5\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ com entalpia de transição de $5,9\pm 0,6$ kcal/mol. A pequena diferença dos dados obtidos em comparação com a literatura deve-se a pequenas variações de concentração no preparo das amostras e dificuldades na determinação da linha de base para a integração.

A suspensão vortexada apresentou uma clara pré-transição em torno de 19°C cuja área não foi descontada na integração da transição principal. Desta forma espera-se que a entalpia da transição principal seja superestimada, justificando a obtenção do valor de entalpia acima do descrito em literatura.

As suspensões extrudadas e eletroformadas apresentaram pré-transições muito mais atenuadas que as suspensões vortexadas, aparecendo em torno de 19°C e 16°C respectivamente.

Devido a produção de uma nova câmara de eletroformação, as concentrações lipídicas de eletroformação sofreram uma diluição aproximada de 20x. Termogramas de suspensões de vesículas de DMPC em água formadas por extrusão e por eletroformação nas mesmas concentrações não mostraram nenhum sinal detectável após a subtração pelos termogramas de água, indicando que as concentrações de lipídios nas amostras se encontram abaixo do limite de detecção do aparelho.

Diferenças de fases apresentadas pelo mesmo lipídio em vesículas de diferentes tamanhos poderiam indicar diferentes estruturas da bicamada nos diferentes modelos, impondo alterações de propriedades nas bicamadas.

Porém, observa-se com a diluição imposta pelas eletroformações que os termogramas se apresentam muito próximos ou inferiores ao limite de detecção do equipamento, tornando os valores de entalpia das transições ou mesmo a detecção de pré-transições de impossível determinação.

Experimentos utilizando vesículas gigantes produzidas via hidratação foram descartados dada a extrema variabilidade das estruturas formadas por este método, variando as formas, tamanhos, e lamelaridade dos agregados formados. Desta forma, optou-se pelo descarte desta técnica dada a extrema diluição das suspensões eletroformadas estudadas e pela dificuldade de interpretação de resultados obtidos com agregados gerados por método de hidratação.

7.2. – Espalhamento de raio-X a baixo ângulo

As bicamadas lipídicas, assim como as diferentes fases lamelares, possuem regiões de diferentes densidades eletrônicas devido a própria estrutura dos lipídios, tendo as cabeças polares devido aos grupamentos fosfato, em geral, densidades eletrônicas maiores que as cadeias hidrocarbônicas. O espalhamento de raio-X é sensível a esse contraste de densidade eletrônica das bicamadas lipídicas com o meio de suspensão.

No choque de fótons com comprimento de onda λ com um elétron, o espalhamento elástico faz com que o elétron seja uma fonte de emissão de fótons com o mesmo comprimento de onda λ . As radiações espalhadas entretanto diferem entre si em fase, devido a diferentes posições dos elétrons na amostra. Tais diferenças de fase alteram a amplitude de onda no detector e logo, refletem a distribuição eletrônica da amostra.

No caso da difração, as unidades espalhadoras se encontram em posições correlacionadas e o espalhamento será completamente construtivo ou destrutivo dependendo da posição 2θ do detector, com o padrão de interferência refletindo o arranjo espacial da densidade eletrônica. As condições necessárias para que haja difração resultam na lei de Bragg:

$$2d \sin(\theta) = n\lambda$$

onde n é um número inteiro, d é a distância interplanar e θ é a metade do ângulo de espalhamento.

Analisando-se a lei de Bragg vemos que para ângulos θ próximos a zero, a condição de difração é satisfeita mesmo se a distância de repetição d for muito maior que λ , permitindo o estudo de distâncias de repetição da ordem de 10 ou 100 distâncias inter-atômicas, como nas estruturas lamelares lipídicas (WIENER et al., 1991; WIENER e WHITE, 1992).

Para a análise do espalhamento causado por bicamadas lipídicas em vesículas considera-se a bicamada plana em relação a sua espessura e o espalhamento é descrito no sentido da espessura das bicamadas pelas diferenças entre a densidade eletrônica da região das cabeças polares, das regiões hidrocarbônicas e da água, onde as vesículas foram suspensas.

Os gráficos de espalhamento são apresentados em função da intensidade de fótons espalhados e do vetor espalhamento q , definido por $4\pi \sin(\theta) / \lambda$ onde 2θ é o ângulo de espalhamento.

Os picos apresentados (q_{max}) indicam a presença de sistemas multilamelares, sendo a distância entre lamelas (d) dada por: $d = 2\pi / q_{max}$. O número de lamelas nessas vesículas pode ser inferido pela intensidade ou largura à meia altura desses picos (NAGLE et al., 1996).

A técnica de espalhamento de raio-X se mostra interessante na determinação da lamelaridade de vesículas gigantes caso a detecção de espalhamento nas baixas concentrações lipídicas em que as vesículas gigantes são formadas seja possível. Desta forma espera-se que vesículas gigantes unilamelares apresentem somente o espalhamento causado pelas vesículas em suspensão, enquanto vesículas multilamelares apresentem os picos de interferência gerados pelas ondas difratadas nas bicamadas.

Para o estabelecimento de padrões de espalhamento e de difração foram analisadas amostras de vesículas vortexadas e extrudadas. Como esperado, a forma da curva de espalhamento das amostras extrudadas é bem diferente das amostras vortexadas, como mostrado na figura 41.

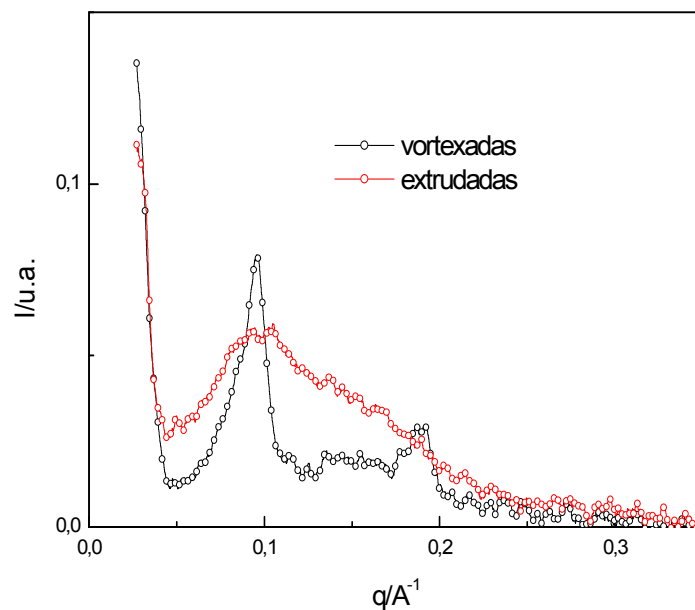


Figura 41. Gráfico de espalhamento de raio-X de vesículas vortexadas e extrudadas em água. Resultados normalizados com o tempo de exposição e subtraídos do espalhamento da água. Concentrações de lecitina igual a $1,3 \times 10^{-2}$ mol/L.

A figura 42 apresenta o perfil de espalhamento de suspensão de vesículas gigantes produzida por eletroformação na concentração tipicamente utilizada ($\sim 3 \mu\text{g/mL}$).

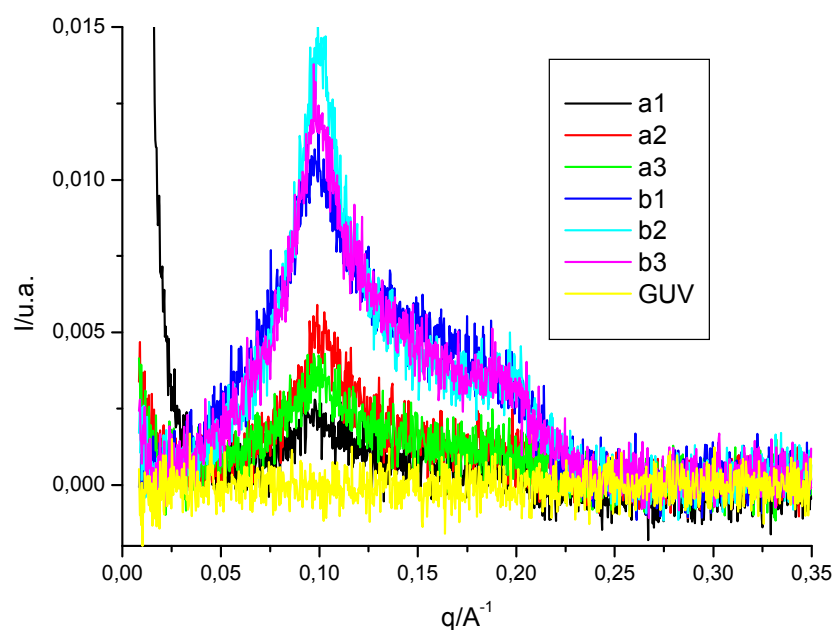


Figura 42: Gráfico de espalhamento de raio-X obtido no LNLS de diferentes suspensões lipídicas formadas por vesículas extrudadas e vesícula eletroformadas. Resultados normalizados pelo tempo de exposição. Observa-se o espalhamento de suspensão típica de GUVs eletroformadas na linha amarela

A suspensão de GUVs não apresentou espalhamento detectável mesmo no LNLS, onde a sensibilidade é a maior esperada. Desta forma, as análises de curvas de espalhamento de raio-X a baixo ângulo foram descartadas no estudo do modelo de GUVs por motivo similar ao descrito no item 7.1., dada a baixa concentrações lipídica nestas suspensões.

8 – REFERÊNCIAS

ANGELOVA, M.I. e DIMITROV, D.S., Liposome electroformation, **Faraday Discussions of the Chemical Society**, 81, 303, 1986.

ANGELOVA, M.I., SOLÉAU, S., MÉLÉARD, P., FAUCON, J.F e BOTHOREL, P., Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications, **Progress in Colloid and Polymer Science**, 89, 127, 1992.

BAGATOLLI, L.A. e GRATTON, E., A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: a two photon fluorescence microscopy study, **Biophysical Journal**, 79, 434, 2000.

BAR-ZIV, R. e MOSES, E., Instability and pearling states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension, **Physical Review Letters**, 73, 1392, 1994.

BAR-ZIV, R., MOSES, E. e NELSON, P., Dynamic excitations in membranes induced by optical tweezers, **Biophysical Journal**, 75, 294, 1998.

BAUMGART, T., HESS, S.T. e WEBB, W.W., Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension, **Nature**, 425, 821, 2003.

BERNARD, A.-L., GUEDEAU-BOUDEVILLE, M.-A., SANDRE, O., PALACIN, S., DI MEGLIO, J.-M. e JULLIEN, L., Permeation through lipid bilayers by adhesion of giant vesicles on decorated surfaces, **Langmuir**, 16, 6801, 2000a.

BERNARD, A.-L., GUEDEAU-BOUDEVILLE, M.-A., JULLIEN, L. e DI MEGLIO, J.-M., Strong adhesion of giant vesicles on surfaces: dynamics and permeability, **Langmuir**, 16, 6809, 2000b.

BROCHARD, F. e LENNON, J.F., Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes, **Le Journal de Physique**, 11, 1035, 1975.

BROCHART-WYART, F., De GENNES, P.G. e SANDRE, O., Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out, **Physica A**, 278, 32, 2000.

DÖBEREINER H-G, EVANS E, KRAUS M, SEIFERT U e WORTIS M, Mapping vesicle shapes into the phase diagram: a comparison of experiment and theory. **Physical Review E**, 55, 4458, 1997.

DOEVEN, M.K., FOLGERING, J.H.A., KRASNIKOV, V., GEERTSMA, E.R., BOGAART, G.v.d. e POOLMAN, B., Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles, **Biophysical Journal**, 88, 1134, 2005.

EVANS, D.F. e WENNERSTRÖM, H., **The Colloidal Domain. Where physics, chemistry, biology and technology meet**, 2^a Edição, Wiley-VCH, 1999.

FAUCON, J.F., MITOV, M.D., MÉLÉARD, P., BIVAS, I. e BOTHOREL, P., Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements, **Journal de Physique**, 50, 2389, 1989.

GIRARD, P., PÉCRÉAUX, J., LENOIR, G., FALSON, P., RIGAUD, J-L. e BASSEREAU, P., A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles, **Biophysical Journal**, 87, 419, 2004.

HELFRICH, W., Bending elasticity of fluid membranes, In: **Giant Vesicles**, Wiley, 2000.

HELFRICH, W., Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments, **Zeitschrift für Naturforschung**, 28c, 693, 1973.

HELFRICH, W., Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems, **Zeitschrift für Naturforschung**, 33a, 305, 1978.

KAHYA, N., PÉCHEUR, E-I., BOEIJ, W.P., WIERSMA, D.A., e HOEKSTRA, D., Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion, **Biophysical Journal**, 81, 1464, 2001.

KAHYA, N., WIERSMA, D.A., POOLMAN, B., e HOEKSTRA, D., Spatial organization of bacteriorhodopsin in model membranes, **Journal of Biological Chemistry**, 277, 39304, 2002.

KARATEKIN, E., SANDRE, O., GUITOUNI, H., BORGHI, N., PUECH, P-H. e BROCHART-WYART, F., Cascades of transient pores in giant vesicles: line tension and transport, **Biophysical Journal**, 84, 1734, 2003.

KORLACH, J., SCHWILLE, P., WEBB, W.W. e FEIGENSON. G.W. Characterization of Lipid Bilayer Phases by Confocal Microscopy and

Fluorescence Correlation Spectroscopy, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96, 8461, 1999.

KUMMROW, M. e HELFRICH, W., Collapse of giant phosphatidylcholine vesicles, **Chemistry and Physics of Lipids**, 79, 147, 1996.

LASIC, D.D., **Liposomes: from physics to applications**, 1^a Edição, Elsevier, 1995.

LIPOWSKY, R. e SEIFERT, U., Adhesion of vesicles, **Physical Review A**, 42, 4768, 1990.

LIPOWSKY, R., The conformation of membranes, **Nature**, 349, 475, 1992

MANNEVILLE, J.B., BASSEREAU, P., LÉVY, D. e DOI, T., Magnification of shape fluctuations of active giant unilamellar vesicles, In: **Giant Vesicles**, Wiley, 2000.

MANNEVILLE, J-B., BASSEREAU, P., RAMASWAMY, S., e PROST, J., Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration, **Physical Review E**, 64, 21908, 2001.

MARCH, D., **CRC Handbook of lipid bilayers**, CRC press, Boca Raton, 1990

MATHIVET, L., CRIBIER, S. e DEVAUX, P.F., Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field, **Biophysical Journal**, 70, 1112, 1996.

MÉLÉARD, P., GERBEAUD, C., BARDUSCO, P., JEANDAINÉ, N., MITOV, M.D., e FERNANDEZ-PUENTE, L., Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles, **Biochimie**, 80, 401, 1998.

MENGER, F.M e KEIPER, J.S., Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models, **Current Opinion in Chemical Biology**, 2, 726, 1998.

MENGER, F.M. e ANGELOVA, M.I., Giant vesicles: imitating the cytological processes of cell membranes, **Accounts of Chemical Research**, 31, 789, 1998.

MIAO L, SEIFERT U, WORTIS M e DÖBEREINER H-G Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity. **Physical Review E**, 49, 5389, 1994.

MICHALET, X. e BENSIMON, D., Observation of stable shapes and conformal diffusion in genus 2 vesicles, **Science**, 269, 666, 1995.

MONTEIRO, A.M.F., ARÊAS, E.P.G., SCHRÖDER, A. e FA, N., Gliadin effect on fluctuation properties of phospholipid giant vesicles, **Colloids and Surfaces B**, 34, 53, 2004.

NAGLE, J.F., ZHANG, R., TRISTAM-NAGLE, S., SUN, W. e PETRACHE, H.I., X-ray structure determination of fully hydrated $L\alpha$ phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers, **Biophysical Journal**, 70, 1419, 1996.

RÄDLER, J.O., FEDER, T.J., STREY, H.H. e SACKMANN, E., Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates, **Physical review E**, 51, 4526, 1995.

ROSSIER, O., CUVELIER, D., BORGHINI, N., PUECH, P-H., DERÉNYI, A., BUGUIN, A., NASSOY, P. e BROCHART-WYART, F., Giant vesicles under flows: extrusion and retraction of tubes, **Langmuir**, 19, 575, 2003.

SACKMANN, E, Physics of vesicles, In: **Structure and Dynamics of Membranes: from cells to vesicles**, vol 1A , North-Holland, 1995.

SANDRE, O., MOREAUX, L. e BROCHART-WYART, F., Dynamics of transient pores in stretched vesicles, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96, 10591, 1999.

SEIFERT, U., Giant vesicles: a theoretical perspective, In: **Giant Vesicles**, Wiley, 2000.

SOT, J., COLLADO, M.I., ARRONDO, J.L.R., ALONSO, A. e GONI, F.M., Triton X-100 resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon, **Langmuir**, 18, 2828, 2002.

TAUPIN, C., DVOLAITZKY, M. e SAUTEREY, C., Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles, **Biochemistry**, 14, 4771, 1975.

WIENER, M.C., KING, G.I. e WHITE, S.H., Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of X-ray

and neutron diffraction data. I. Scaling of neutron data and the distribution of double bonds and water, **Biophysical Journal**, 60, 568, 1991.

WIENER, M.C. e WHITE, S.H., Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of X-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups, **Biophysical Journal**, 61, 428, 1992.