UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

Departamento de Bioquímica

Adsorção ótima de bicamada fosfolipídica sobre sílica e reconstituição do reconhecimento receptor-ligante

Sérgio de Paula Moura

Tese de Doutorado

ORIENTADORA: Ana Maria Carmona-Ribeiro

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biocolóides
do Departamento de Bioquímica do IQUSP

SÃO PAULO
2006

Aos meus pais,
Lucinéa Maria de Paula Moura e
Geraldo Gomes de Moura.
Obrigado pelo amor e liberdade!

*"Não quero passar pelo mundo,
sem deixar nenhum rastro,
quero deixar pegadas que não
apaguem nunca, quero ser
lembrado, preciso ser querido,
sou bom, sou desesperado."*

Em memória de um grande amigo,
Ângelo A.C. Bezerra.
Os bons nunca são esquecidos!

As seis fases de um projeto:

1. *Entusiasmo*
2. *Desilusão*
3. *Pânico*
4. *Busca pelo culpado*
5. *Punição dos inocentes*
6. *Elogios e honras aos não-participantes*

da Lei de Murphy

Teoria é quando se sabe tudo e nada funciona.

Prática é quando tudo funciona e ninguém sabe porque.

Neste projeto freqüentemente se conjugaram Teoria e Prática,
nada funcionava e ninguém sabia porque.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro pela orientação, oportunidade e paciência.

Ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina e sua equipe pela realização dos experimentos de fluorescência.

À Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri e equipe pelo fornecimento das partículas poliméricas e pelo apoio logístico.

Aos amigos conquistados em cinco anos de pesquisa no Laboratório de Biocolóides em especial a Cláudia Conti Medugno, Débora Braga Vieira, Edla Moraes de Abreu Pereira e Nilton Lincopan que ficaram ao meu lado todo esse tempo. Por todo o seu apoio e carinho já têm lugar seguro em meu coração.

Aos amigos Caio Dimisson da Silveira, Felipe Manoel Correia, Fernando Perecin Araujo e Luis Fernando Pacheco Otalora que vieram e se foram, mas nunca serão esquecidos.

Aos colegas Alliny Ferreira Naves, Cecília Sobral, Heloísa Rosa e Thiago Lacerda dos Santos e a todos os alunos, professores e funcionários do Instituto de Química da USP que me engrandeceram nesta jornada de conhecimento.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

De maneira muito especial a Suely Aparecida Cossote Bezerra por quem tenho grande admiração e carinho profundo. Agradeço pela fé e esperança a mim transmitidas.

RESUMO

Moura, S.P. *Adsorção ótima de bicamada fosfolipídica sobre sílica e reconstituição do reconhecimento receptor-ligante* [tese] São Paulo; Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2006. 148p.

Este projeto teve como objetivo geral continuar a avaliar a adequação de anfifílicos que se agregam em solução aquosa formando bicamadas, para recobrir superfícies de sílica. Em paralelo, foi objetivada a reconstituição do reconhecimento receptor-ligante, tendo como modelo o monosialogangliosídio GM1 e a enterotoxina do vibrião da cólera. Os resultados obtidos poderão se mostrar de grande valor em aplicações práticas que envolvem a construção de sistemas de detecção e quantificação de substâncias ou moléculas específicas. A adsorção e estabilidade de bicamadas contendo fosfatidilcolina (PC) ou misturas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e dipalmitoilfosfatidilcolna (DPPC) sobre a superfície de nanopartículas de sílica foi estudada através de isotermas de adsorção por dosagem do fosfato inorgânico, análises de sedimentação por imagens fotográficas e medidas dos diâmetros médios (D_z) e potenciais-zeta (ζ) de partículas por espectroscopia de correlação de fótons. Foram avaliadas as afinidades entre as bicamadas e a superfície das nanopartículas e a estabilidade do sistema em função da força iônica, do pH e da concentração adicionada de lipídio. A afinidade das bicamadas pela superfície da sílica apresentou uma correlação com as forças de van der Waals e as pontes de hidrogênio que se formam entre os grupos químicos do anfifílico e aqueles de superfície da sílica. A formação de uma única bicamada lipídica de PC sobre a sílica foi detectada, o que levou à estabilidade coloidal do sistema particulado. As bicamadas mistas de DPPC/DODAB por sua vez apresentaram uma afinidade decrescente pela sílica com a elevação da porcentagem de DODAB na bicamada. Os dados de isoterma e de ζ das partículas sugerem uma separação física entre o DPPC e o DODAB. O conjunto otimizado partícula de sílica/bicamada de PC (partícula biomimética) foi assim utilizado para promover a incorporação do GM1 micelar nas bicamadas, medida por fluorescência com a utilização da sonda GM1 pireno, seguida do reconhecimento e ligação da toxina da cólera (CT) ao complexo formado. A transferência do GM1 das micelas para as partículas se mostrou dependente da disponibilidade de bicamadas adsorvidas nestas e da ausência de bicamadas não-adsorvidas, livres em dispersão. Para avaliar a ligação da toxina da cólera às partículas biomiméticas foram calculadas isotermas de adsorção a partir da dosagem de proteína não ligada que resta no sobrenadante. A ligação específica da CT na presença de bicamadas de PC e GM1 foi de 67% em massa do total da proteína adicionada, revelando uma ligação positiva entre receptor e ligante. A estequiometria revela que a proporção molar PC: GM1: CT é de 300: 5: 1 respectivamente. A proporção de 1 CT: 5 GM1 está de acordo com a literatura onde experimentos de difração de raios-X mostram a estrutura tridimensional do pentâmero CTB_5 ligado a cinco unidades de pentasacarídeo do GM1.

Palavras-chave: adsorção de bicamadas, AEROSIL-OX 50, fosfolipídios, biosensores, toxina da cólera, GM1.

ABSTRACT

Moura, S.P. *Optimum adsorption of phospholipid bilayer on silica and reconstitution of receptor function* [thesis] São Paulo; "Instituto de Química, Universidade de São Paulo", 2006. 148p.

The general objective of this project was to continue evaluating the suitability of amphiphiles that aggregate in aqueous solution forming bilayers, to cover surfaces of silica. A secondary objective pursued was to promote the reconstitution of the receptor-ligand function, having as a model the monosialoganglioside GM1 and the enterotoxin of the choleric vibrio. The results may prove to be valuable in pure research or practical applications for sensing and detection of biomolecules. The adsorption and stability of phosphatidylcholine (PC) bilayers or mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) over surfaces of silica nanoparticles were evaluated through adsorption isotherms by inorganic phosphate dosage, sedimentation analysis by means of photographic images and measurements of hydrodynamic diameter (D_z) and zeta-potentials (ζ) of particles by photon correlation spectroscopy. The affinity between the bilayers and the nanoparticles surfaces and the general system stability were evaluated as a function of ionic strength, pH and added lipid concentration. The affinity showed a correlation with the van der Waals and the hydrogen bridges forces that form between the chemical groups of the amphiphile and the silica surface. The formation of a single lipid PC bilayer over the silica was detected, leading to the colloidal stability of the particulate system. Mixed bilayers of DPPC/DODAB on the other hand showed a decreasing affinity for silica with an increasing DODAB percentage in the bilayer. Data from isotherms and ζ of particles suggests a physical separation of the DPPC and DODAB. The optimized array of silica particle/PC bilayer (biomimetic particles) was thus used to promote the incorporation of micellar GM1 into the bilayers, measured by fluorescence with a GM1 pirene probe, followed by the cholera toxin (CT) binding to the resulting array. GM1 transfer from micelles to particles showed dependence on the adsorbed bilayers availability and on the absence of non-adsorbed bilayers, free in the bulk solution. To evaluate CT binding to biomimetic particles adsorption isotherms were calculated from the dosage of unbound protein remaining in the supernatant. Specific binding of CT in the presence of PC and GM1 bilayer was 67% mass of total protein added, indicating a positive binding between receptor and ligand. Stoichiometry revealed that the molar proportion PC: GM1: CT is 300: 5: 1 respectively. The proportion of 1 CT: 5 GM1 is in good agreement with data in the literature where X-ray diffraction tests show the 3-dimensional structure of the CTB_5 pentamer bound to five units of the pentasaccharide GM1.

Keywords: bilayer adsorption, AEROSIL-OX 50, phospholipids, biosensors, cholera toxin, GM1.

ÍNDICE

NOTAÇÕES E ABREVIAÇÕES MAIS COMUNS iii
ÍNDICE DE TABELAS iv
ÍNDICE DE FIGURAS v

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL 1
1.2 SOBRE MEMBRANAS BIOLÓGICAS 3
1.3 OBJETIVOS DE PESQUISA 5
1.4 AUTO-ASSOCIAÇÃO DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS 12
1.4.1 TIPOS DE ANFIFÍLICOS 12
1.4.2 AGREGADOS MOLECULARES E MEMBRANAS-MODELO 12
1.4.3 ANFIFÍLICOS FORMADORES DE BICAMADAS 16
1.5 SUPERFÍCIES DE SiO_2 20
1.5.1 PARTICULADOS 21
1.5.2 AEROSIL OX-50 24
1.6 ADSORÇÃO DE MEMBRANAS-MODELO EM SUPERFÍCIES 25
1.6.1 ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA ADSORÇÃO EM SUPERFÍCIES 25
1.6.2 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO 26
1.6.2.1 TIPOS DE ISOTERMAS 27
1.7 INTRODUÇÃO AO ESPALHAMENTO QUASI-ELÁSTICO DE LUZ 33
1.8 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA FLUORESCÊNCIA 37
1.8.1 INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA 38
1.8.2 ESPECTROS DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA 39

2. MATERIAIS E MÉTODOS 42

2.1 REAGENTES E MATERIAIS 42
2.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS 46
2.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXPERIMENTAIS 47
2.3.1 AGREGADOS SUPRAMOLECULARES DE ANFIFÍLICOS 47
2.3.1.1 PREPARAÇÃO DE FRAGMENTOS DE BICAMADAS DE DODAB 47
2.3.1.2 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES POR INJEÇÃO ETANÓLICA 48
2.3.1.3 PREPARAÇÃO DE MICELAS DE CTAB 49
2.3.2 SÍLICA COLOIDAL 49
2.4 DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANIFIFÍLICOS NAS DISPERSÕES 49
2.4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DODAB POR MICROTITULAÇÃO 49
2.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIO POR DOSAGEM DE FÓSFORO INORGÂNICO 50
2.5 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO 50
2.5.1 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO (D_Z) 50
2.5.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL-ZETA (ζ) 51
2.6 DETERMINAÇÃO DA SSA DA SÍLICA COLOIDAL POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA 52
2.7 INTERAÇÃO ENTRE AGREGADOS ANFIFÍLICOS E AS PARTÍCULAS COLOIDAIS 52
2.7.1 CARACTERIZAÇÃO DA ADSORÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS SOBRE A SÍLICA 53
2.7.1.1 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA FORÇA IÔNICA SOBRE A ADSORÇÃO 53
2.7.1.2 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL POR SEDIMENTAÇÃO 53
2.7.1.3 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL POR MEDIÇÃO DOS D_Z E ζ 54
2.7.1.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA PROPORÇÃO MOLAR DPPC/DODAB SOBRE A ADSORÇÃO 54

2.7.2 Adsorção de PC e DODAB sob o ponto de vista da preparação..... 55
2.7.3 Adsorção de CTAB sobre particulados de sílica..... 56
2.8 Incorporação de GM1 em microesferas de sílica recobertas com PC..... 56
2.8.1 Efeito da concentração inicial de PC e Sílica na incorporação de GM1... 57
2.9 Determinação da concentração de proteína pelo método de Lowry..... 58
2.9.1 Determinação do grau de ligação de CT ao GM1 incorporado..... 59
2.10 Determinação da concentração de proteína por absorbância no UV..... 60
2.10.1 Determinação da adsorção de ACT às partículas poliméricas..... 61

3. Resultados e discussão..... 62

3.1 Deposição de PC sobre a superfície de sílica..... 62
3.1.1 Efeito da força iônica na adsorção..... 62
3.1.2 Efeito da força iônica na estabilidade coloidal das misturas..... 66
3.1.3 Efeito do pH na adsorção e na estabilidade coloidal..... 68
3.1.4 Análise dos diâmetros hidrodinâmicos (D_Z)..... 71
3.2 Outros anfifílicos e particulados coloidais..... 72
3.3 Incorporação de GM1 nas bicamadas de PC adsorvidas sobre a sílica..... 73
3.4 Ligação de CT ao GM1 incorporado nas partículas biomiméticas..... 76
3.5 Estudo da adsorção de DPPC sobre a sílica hidrofílica..... 79
3.5.1 Efeito da força iônica na adsorção de DPPC sobre a sílica..... 79
3.6 Estudo da adsorção de vesículas mistas de DPPC/DODAB sobre a sílica..... 81
3.6.1 Efeito da proporção molar na adsorção..... 82
3.6.2 Análise dos diâmetros hidrodinâmicos (D_Z)..... 83
3.6.3 Análise dos potenciais-zeta (ζ)..... 84
3.6.4 Efeito da proporção molar e da concentração total de anfifílico na estabilidade coloidal das partículas..... 89
3.7 Adsorção de ACT em partículas de PMMA/CMC..... 91

4. Conclusões..... 94

5. Perspectivas..... 96

6. Referências bibliográficas..... 97

Curriculum vitae
Trabalhos Publicados
Trabalhos Apresentados em Congressos

NOTAÇÕES E ABREVIAÇÕES MAIS COMUNS

ACT – antitoxina da cólera

AEROSIL OX-50 – nanopartículas de sílica hidrofílica

BSA – albumina sérica bovina

CT – toxina da cólera

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

DODAB – brometo de dioctadecildimetilamônio

DPPC – dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPC/DODAB – preparações coloidais mistas de DPPC e DODAB

$\mathbf{D_z}$ – diâmetro hidrodinâmico médio ou diâmetro efetivo

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

GM1 – monosialogangliosídio GM1

GM1py – monosialogangliosídio GM1 pireno

PC – fosfatidilcolina

PMMA/CMC – polimetilmetacrilato/carboximetilcelulose

PSA – poliestireno amidina

PSS – poliestireno sulfato

SSA – área superficial específica

ζ – potencial-zeta

% DODAB – proporção molar de DODAB em vesículas de DPPC/DODAB

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.2 – Exemplos de agregados supramoleculares de anfifílicos [Israelachvili, 1992]: *página 15*

Tabela 2.8 – Protocolos de interação de vesículas de PC com partículas de sílica seguida de incorporação de GM1*. A incorporação é calculada segundo a Equação 2.8.1.1: *página 58*

Tabela 2.9 – Protocolos de interação de vesículas de PC, partículas de sílica, micelas de GM1 e moléculas de CT: *página 60*

Tabela 2.10 – Protocolo de interação de partículas de PMMA/CMC com moléculas de ACT: *página 61*

Tabela 3.1 – Efeito da força iônica nos parâmetros de adsorção de PC a partir de vesículas sobre a sílica (1 mg/ml). Os parâmetros k e $(x/m)_{máx}$ foram calculados das isotermas de adsorção da Figura 3.1.1.1: *página 64*

Tabela 3.2 – Constantes de afinidade e adsorção máxima, obtidas por linearizações de isotermas realizadas em pesquisas de anos anteriores [Rapuano, 2000], na adsorção de vesículas de PC sobre a sílica hidrofílica, em tampão TRIS-HCl 10 mM e pH 7.4: *página 64*

Tabela 3.3 – Efeito do pH nos parâmetros de adsorção do PC de vesículas na sílica (1 mg/ml) a 10 mM de força iônica. Os parâmetros k e $(x/m)_{máx}$ foram calculados das isotermas de adsorção da Figura 3.1.2.1. *Parâmetros calculados em trabalhos anteriores por Rapuano & Carmona-Ribeiro, 2000: *página 69*

Tabela 3.4 – D_z e ζ de sílica a 0,1 mg/ml, PSS e PSA a $2{,}59.10^{12}$ ppml em presença de dispersões de DODAB e PC aquoso ou etanólico e CTAB aquoso a 1 mM de concentração dos anfifílicos: *página 72*

Tabela 3.5 – Ligações específicas e não-específicas de CT a partículas. Os controles para as ligações não-específicas, sílica ou sílica/PC, devem ser comparados com a amostra teste sílica/PC/GM1: *página 76*

Tabela 3.6 – D_z e ζ da sílica, DPPC e misturas DPPC/DODAB em 1 mM de NaCl, pH 6,3, 25 ºC: *página 81*

Tabela 3.7 – D_z e ζ de interações de sílica com vesículas mistas a 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB em 1 mM NaCl, pH 6,3, 25 ºC: *página 85*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1 – Exemplo de biofuncionalização de uma superfície sólida. O receptor é o monosialogangliosídio GM1, um glicolípide, o qual se insere na bicamada lipídica depositada sobre uma superfície sólida (substrato), e é reconhecido pela toxina da cólera [Carmona-Ribeiro, 2001]: *página 2*

Figura 1.1.2 – Uma seqüência de deposição de vesículas lipídicas esféricas em sílica hidrofílica acompanhada com o uso de um microscópio de força atômica [Jass et al., 2000]: *página 3*

Figura 1.2.1 – Esquema tridimensional de secção transversal de uma membrana biológica. As proteínas (em vermelho ou laranja) de diferentes tamanhos e formas e com diferentes grupos funcionais (verde), se encontram mergulhadas em uma bicamada fluida de lipídios (azul ou amarelo). (fonte: National Institute of Standards and Technology – NIST; figura eletrônica de domínio público como indicado pelo NIST): *página 3*

Figura 1.3.1– Ilustração da toxina da cólera se ligando a 5 gangliosídios GM1 (em branco) na superfície de uma célula [Merrit et al., 1994]: *página 7*

Figura 1.4.3.1 – O GM1, apesar de possuir duas cadeias hidrocarbônicas, é formador de micelas pois possui uma cabeça polar oligossacarídica volumosa em relação ao volume dessas cadeias hidrocarbônicas. O PC por sua vez, graças à sua forma cilíndrica, auto-associa-se formando bicamadas: *página 16*

Figura 1.5.1 – Silanol e siloxano, principais grupos encontrados na superfície de SiO_2: *página 21*

Figura 1.5.1.1 – Dissociação dos grupos silanóis na superfície das partículas AEROSIL: *página 22*

Figura 1.5.1.2 – Densidade superficial de carga em função do pH para SiO_2 em 4 diferentes concentrações de KCl [Tadros & Lyklema, 1968] (A); dupla-camada elétrica ao redor de uma partícula negativamente carregada, definição de potencial-zeta (ζ) (B): *página 23*

Figura 1.5.2.1 – Microscopia de transmissão eletrônica (TEM) de AEROSIL OX-50: *página 24*

Figura 1.5.2.2 – Representação da formação de pontes de hidrogênio entre partículas (A) e aglomeração dos agregados em uma rede tridimensional macroscópica (B): *página 24*

Figura 1.6.2.1.1 – Sistema de classificação de Isotermas: *página 27*

Figura 1.7.1 – Sistema óptico utilizado na medição do ζ: *página 36*

Figura 1.8.1 – Espectro de emissão de fluorescência do GM1Py: (A) em micelas puras de GM1Py (linha sólida) e bicamadas de PC (linha pontilhada) a 0,5 μM em água pura a 330 nm de excitação [Sonnino et al., 1986]; (B) em micelas de GM1 a 2 μM em água pura a 345 nm de excitação: *página 40*

Figura 2.5.1.1 – Relatório de medição do D_z de partículas de sílica a 0.5 mg/ml em 1 mM de KCl obtido no ZetaPlus: *página 51*

Figura 2.5.2.1 – Relatório padrão de medição do ζ de partículas de sílica em 1 mM de KCl obtido no ZetaPlus: *página 52*

Figura 3.1.1.1 – Isotermas de adsorção de PC a partir de vesículas pequenas sobre sílica hidrofílica (1 mg/ml) com 0,1 (A), 1 (B), 10 (C), 100 (D), 150 mM de NaCl (E) a pH 6,3 e 140 mM de NaCl com 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 em (F), todas feitas a 25 ºC e em interações de uma hora: *página 62*

Figura 3.1.1.2 – Linearização de uma isoterma de adsorção que obedece ao modelo Langmuir (isoterma da Figura 3.1.1.1C, exibida no gráfico menor): *página 63*

Figura 3.1.2.1 – Misturas de partículas de sílica com vesículas de PC em tubos de interação a 1 mg/ml de sílica, 0,3 mM de PC, pH 6,3, 25 ºC e 0,5 ou 48 horas de tempo de interação após agitação, em uma faixa de concentração de NaCl. As fotos superiores mostram os respectivos controles de sílica sem vesículas de PC: *página 66*

Figura 3.1.3.1 – Isotermas de adsorção de PC a partir de vesículas sobre sílica (1 mg/ml) em 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 (A) ou 10 mM de NaCl a pH 6,3 (B): *página 69*

Figura 3.1.3.2 – Fotografias de 1 mg/ml de sílica com PC a 25 °C após 1 h de interação; pH 6,3 em 150 mM de NaCl nos tubos de cima e pH 7,4 em 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl nos tubos de baixo, em 0,01, 0,1 e 0,7 mM de PC: *página 70*

Figura 3.1.4.1 – Efeito da concentração de PC adicionado à mistura no diâmetro médio (D_z) da sílica a 0,1 mg/ml em 0 (□), 100 mM (△) de NaCl a pH 6,3 e 140 mM de NaCl com 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 (○). Interação de uma hora a 25 ºC: *página 72*

Figura 3.3.1 – Espectro de fluorescência de GM1Py 7% em 5 μM de GM1 total em 10 mM TRIS-HCl e 140 mM NaCl a pH 7.4, 25 ºC. A sonda se encontra incorporada em (A) micelas de GM1 e (B) vesículas de PC a 0.3 mM: *página 74*

Figura 3.3.2 – Efeito da concentração de partículas de sílica (A) ou de vesículas de PC (B) na incorporação de GM1 (%) em 0,5 μM de GM1 total a 10 mM TRIS-HCl e 140 mM NaCl a pH 7,4, 25 ºC. Em (A) a concentração fixada de PC foi de 0,3 mM e em (B) a concentração de sílica foi de 1 mg/ml: *página 75*

Figura 3.4.1 – Efeito da massa de CT adicionado na ligação do CT a partículas biomiméticas em 1 mg/ml de sílica, 0,3 mM de PC e 5 mM de GM1 em 10 mM de TRIS-HCl e 140 mM de NaCl a pH 7,4, 25 ºC: *página 77*

Figura 3.4.2 – Representação esquemática de moléculas de CT ligadas a uma partícula de sílica recoberta por uma bicamada de PC incorporada com receptores GM1: *página 77*

Figura 3.5.1.1 – Isotermas de adsorção de DPPC sobre sílica (1 mg/ml) com 0 (A), 1 (B), 10 (C), 100 (D) e 150 mM (E) de NaCl, pH 6,3, a 25 ºC, após interações de uma hora. O pontilhado em 40.10^{17} moléculas de DPPC/m^2 de sílica representa a adsorção esperada para a deposição de uma bicamada de DPPC na sílica, tomando 0,5 nm^2 como a área da cabeça polar

de cada molécula de DPPC adsorvida: *página 80*

Figura 3.6.1.1 – Isotermas de adsorção para vesículas mistas sobre sílica (1 mg/ml) a 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB em 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC: *página 82*

Figura 3.6.2.1 – Efeito da concentração de anfifílico adicionado no D_z da sílica (0,1 mg/ml) em 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) e 20% (F) de DODAB em proporção molar, a 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC. Interação de uma hora entre vesículas e partículas: *página 83*

Figura 3.6.3.1 – Efeito da concentração de anfifílico adicionado no ζ da sílica a 0,1 mg/ml em 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) e 20% (F) de DODAB em proporção molar, a 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC. Interação de uma hora entre vesículas e partículas: *página 84*

Figura 3.6.3.2 – Comparação da variação do ζ das vesículas mistas (A) e das interações de partículas com vesículas mistas (B) em função da % DODAB a partir dos dados das Tabelas 3.6 e 3.7: *página 86*

Figura 3.6.3.3 – Sobreposição das variações de Dz e ζ em interações de sílica (0,1 mg/ml) com vesículas mistas em função da concentração total de anfifílico em 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) e 20 % (F) de DODAB a partir dos gráficos das Figuras 3.6.2.1. e 3.6.3.1. As linhas pontilhadas verticais no centro dos gráficos representam a concentração total de anfifílico necessária para recobrir a sílica com uma única bicamada: *página 88*

Figura 3.6.4.1 – Misturas de sílica (1 mg/ml) com vesículas mistas em quatro proporções molares diferentes (0, 1, 2, 10 e 20% de DODAB) após 1 hora de interação, em 1 mM de NaCl, pH 6.3 e 25 ºC: *página 90*

Figura 3.7.1 – Efeito da ACT adicionada na adsorção de ACT à partículas poliméricas de PMMA/CMC (Np = $7{,}9.10^9$ ppml) em 10 mM TRIS-HCl, 140 mM NaCl a pH 7,4 e 25ºC: *página 91*

1 – Introdução

1.1 – Introdução Geral

A deposição de bicamadas ou de vesículas de fosfolipídios ou de anfifílicos sintéticos em superfícies sólidas foi inicialmente descrita em alguns estudos de adsorção de lipossomos na argila [Murase & Gonda, 1982] ou asbestos [Jaurand et al., 1983], ou através de referências incidentais à adsorção de lipossomos em colunas de filtração em gel [Huang, 1969] ou a filtros de membrana [Schullery & Garzaniti, 1974].

Considerando as características de partícula coloidal apresentadas por vesículas e as propriedades das interfaces sólido-líquido, pode-se antever que a deposição de vesículas anfifílicas carregadas eletricamente seria determinada inicialmente pela interação entre as duplas camadas elétricas associadas às vesículas e à superfície sólida e por uma força eletrodinâmica de dispersão (van der Waals) entre as vesículas e o sólido. Como as vesículas não são estruturas sempre rígidas, dependendo do tamanho, da natureza química dos monômeros ou composição do meio de preparação elas podem sofrer distorção, agregação, ruptura ou fusão. A deposição de vesículas em superfícies sólidas, como nanopartículas, pode eventualmente originar um ou uma combinação desses processos.

Superfícies cobertas com biomoléculas em geral são importantes para a biotecnologia moderna e ciências da vida. Por exemplo, processos usando nanopartículas superficialmente ativadas incluem cromatografia líquida [Leonard, 1997], separação magnética [Bucak et al., 2003], e sistemas de detecção múltiplas baseadas em biochips [Cutler, 2003]. Esses são exemplos de tecnologias onde a associação controlada e otimizada de biomoléculas em superfícies sólidas tem um papel crucial nas finalidades práticas destas. O uso de partículas de escala nanométrica em biotecnologia vem levantando um grande interesse na comunidade científica por suas numerosas possibilidades de aplicação ao combinar o chamado mundo dos

materiais, com suas avançadas tecnologias de propriedades diversas, e o mundo biológico, com suas elaboradas arquiteturas moleculares, propriedades únicas e funções orgânicas.

A fim de reproduzir em condições controladas de laboratório a estrutura natural das membranas biológicas e melhor compreender seu funcionamento, diversos grupos de pesquisa atualmente trabalham no desenvolvimento de tecnologias que visam a biofuncionalização de uma superfície através da imobilização de biomoléculas especializadas em associação com membranas lipídicas depositadas. Essas moléculas podem ser de natureza protéica como canais iônicos [Graneli et al., 2003], peptídeos sinalizadores [Lee et al., 2001] e transportadores de moléculas [Klee et al., 1992; Sugao et al., 1995], ou de natureza não-protéica como moléculas lipídicas modificadas com grupos adicionais [Buranda et al., 2003] ou gangliosídios incorporados à membrana como ilustrado na Figura 1.1.1 [Carmona-Ribeiro, 2001].

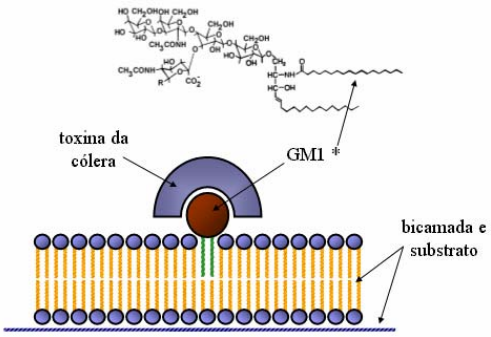


Figura 1.1.1 – Exemplo de biofuncionalização de uma superfície sólida. O receptor é o monosialogangliosídio GM1, um glicolípide, o qual se insere na bicamada lipídica depositada sobre uma superfície sólida (substrato), e é reconhecido pela toxina da cólera [Carmona-Ribeiro, 2001]

Vários tipos de técnicas estão sendo atualmente empregadas para caracterizar a deposição de bicamadas lipídicas como modelos de membranas biológicas em superfícies sólidas. Desde simulações virtuais do comportamento, estrutura e estabilidade de bicamadas anfifílicas [Shillcock & Lipowsky, 2002] até a um acompanhamento em tempo real da deposição de vesículas e da formação de bicamadas em superfícies feito por microscopia de

força atômica (AFM) [Cremer & Boxer, 1999; Leonenko et al., 2000; Reviakine & Brisson, 2000; Jass et al., 2000], microbalança de cristal de quartzo (QCM-D) ou ressonância de plasmons de superfície (SPR) [Keller et al., 2000].

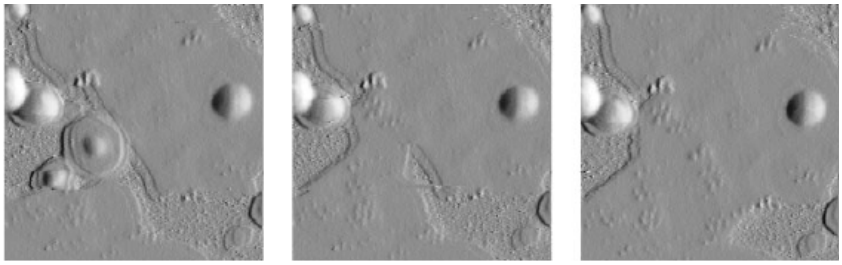


Figura 1.1.2 – Uma seqüência de deposição de vesículas lipídicas esféricas em sílica hidrofílica acompanhada com o uso de um microscópio de força atômica [Jass et al., 2000].

1.2 – Sobre Membranas Biológicas

Uma membrana biológica pode ser definida como qualquer tecido separatório que atua como barreira compartimentalizante dentro ou ao redor de uma célula. É quase sempre feita de uma bicamada de lipídios, na maioria fosfolipídios, glicolipídios e colesterol, associados de maneira semifluida com moléculas de proteína que se encontram mergulhadas na bicamada (Figura 1.2.1).

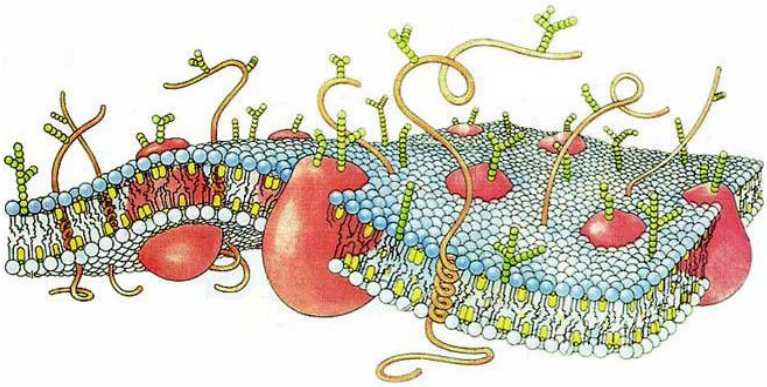


Figura 1.2.1 – Esquema tridimensional de secção transversal de uma membrana biológica. As proteínas (em vermelho ou laranja) de diferentes tamanhos e formas e com diferentes grupos funcionais (verde), se encontram mergulhadas em uma bicamada fluida de lipídios (azul ou amarelo). (fonte: National Institute of Standards and Technology – NIST; figura eletrônica de domínio público como indicado pelo NIST).

As membranas geralmente delimitam espaços ou compartimentos fechados nos quais as células podem manter ambientes químicos ou bioquímicos que diferem do exterior. Além da membrana plasmática que separa a célula do ambiente externo, a maioria das organelas celulares, como a mitocôndria e o núcleo, é definida por tais estruturas.

As proteínas associadas à bicamada lipídica possuem em sua maioria elevado peso molecular e são pouco solúveis em água, necessitando de um microambiente hidrofóbico-hidrofílico adequado para adquirir sua conformação funcional. Esse microambiente ideal é oferecido pela bicamada lipídica que compõe a matriz da membrana celular. Essas proteínas possuem diversas funções celulares e conferem à membrana biológica grande parte de sua versatilidade funcional.

São as proteínas de membrana responsáveis por processos como a permeabilidade seletiva de moléculas, a adesão e estruturação celular e a transdução de sinais externos [Gennis, 1989], atuando neste caso como ligantes e receptores moleculares. A grande vantagem destes receptores, que de maneira mais ampla não são exclusivamente de natureza protéica, é a elevadíssima especificidade com que realizam o reconhecimento biomolecular. Isso se deve ao encaixe estrutural perfeito que ocorre entre a molécula do receptor, localizada na membrana, e a molécula livre do ligante no meio aquoso (Figura 1.1.1). É essa função *receptor-ligante* responsável pela alta sensibilidade química característica das membranas biológicas.

As membranas biológicas são partes essenciais de toda célula, que têm muitas de suas funções vitais diretamente associadas àquelas, e é através delas que as células interagem com o mundo exterior. A habilidade de reproduzir as funções celulares das membranas biológicas, como o reconhecimento *receptor-ligante*, pode resultar no desenvolvimento de tecnologia de ponta na área da biotecnologia.

1.3 – Objetivos de Pesquisa

Este trabalho teve como objetivo geral continuar a avaliar a adequação de anfifílicos tipo dialquil de cadeia longa, que se agregam em solução aquosa formando bicamadas, para a biofuncionalização de superfícies de óxido de silício em diversas condições de força iônica e pH do meio. A gama de aplicações práticas do conhecimento básico a ser gerado aqui é extensa incluindo os usos petroquímicos, farmacotécnicos e em eletrônica de tecnologias de recobrimento por anfifílicos.

Como objetivos secundários nós buscamos a elucidação da função de membrana celular receptor-ligante e a construção de um sensor biomimético para a cólera baseado em nanopartículas biofuncionalizadas, de fácil e rápida preparação para a detecção da toxina da cólera como indicador da presença do vibrião. Um projeto de *kits* de imunoensaios baseado em partículas de sílica teria algumas vantagens sobre aqueles baseados em microesferas de látex (amplamente pesquisados até o momento) como, por exemplo, o menor custo e a maior área superficial, além de outras características intrínsecas vantajosas como a sua transparência óptica, porosidade controlável e inércia química [Mornet, 2005]. Além de que seria vantajosa a imobilização das biomoléculas em superfícies de silício ou óxido de silício, ubíquas em microeletrônica, que atuariam como ponte de ligação entre os componentes biológicos e eletrônicos do aparelho biosensor. É, portanto, relevante definir o uso de nanopartículas de sílica para amplificar o reconhecimento biomolecular, assim o reconhecimento anteriormente detectado em partículas de poliestireno [Sicchierolli & Carmona-Ribeiro, 1995; Sicchierolli & Carmona-Ribeiro, 1996] poderá eventualmente ser otimizado usando sílica recoberta com fosfolipídios ou anfifílicos sintéticos.

O sucesso de qualquer processo de imobilização está em um equilíbrio cuidadoso das forças intermoleculares que dirigem a interação entre as moléculas a serem depositadas e a

camada mais externa da superfície do substrato. A adsorção de agregados moleculares de PC (fosfatidilcolina ou lecitina) ou de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina ou lecitina saturada), fosfolipídios naturais de membrana, sobre a superfície de partículas de sílica foi aqui analisada levando em conta o efeito da força iônica e do pH do meio, no caso das vesículas de DPPC foi considerado também o efeito da proporção molar de DODAB (brometo de dimetildioctadecilamônio) na composição de vesículas mistas. Por serem lipídios naturais de membrana celular, o PC e o DPPC apresentam a vantagem da biocompatibilidade, enquanto que o DODAB, um anfifílico sintético de baixo custo, tem sua biocompatibilidade ainda em fase de comprovação experimental [Carmona-Ribeiro, 2003].

O DPPC, como o DODAB, apresenta temperatura de transição de fase gel-fluido acima de 40 °C, enquanto a do PC se encontra abaixo de 0 ºC. A temperatura de transição de fase é definida como a temperatura necessária para induzir uma mudança no estado físico do lipídio da fase gel ordenada, onde as cadeias hidrocarbônicas se encontram extendidas e empacotadas em seu máximo, à fase líquido-cristalina desordenada, em que as cadeidas estão orientadas aleatoriamente e mais fluídas. Existem vários fatores que afetam diretamente a temperatura de transição incluindo o comprimento da cadeia hidrocarbônica, insaturações, carga, e natureza da cabeça polar. Entre o DODAB, o DPPC e o PC, este último é o único que possui insaturações em seus grupos acil, introduzindo com isso cotovelos nas cadeias hidrocarbônicas o que requer temperaturas inferiores para induzir um empacotamento ordenado. Por isso a temperatura de transição de fase para o PC é menor do que para o DODAB e o DPPC.

Quando se está desenvolvendo uma nova droga, produto ou procedimento, o controle da temperatura de transição de fase de um lipídio pode se tornar uma ferramenta muito útil. A escolha de um lipídio com alta temperatura de transição, onde a vesícula formada iria sempre se encontrar na fase gel, resultaria em um sistema de empacotamento não vazante. Da mesma

maneira, um lipídio com uma temperatura de transição que se localiza entre temperaturas experimentalmente importantes iria fornecer maneiras de liberação de material empacotado à medida que o lipídio passa por sua temperatura de transição de fase e a vesícula se torna vazante. Pareceu conveniente então realizar o estudo de adsorção de vesículas que se encontram à temperatura ambiente em tais estados distintos de fase.

Para caracterizar a interação de vesículas lipídicas de PC e posteriormente de DPPC em superfícies de partículas de sílica, estão sendo empregadas até o momento técnicas ligadas ao espalhamento quasi-elástico de luz para determinação de distribuições de tamanhos e potenciais elétricos de partículas em dispersões aquosas, assim como cinéticas de sedimentação, isotermas de adsorção com o uso da técnica de dosagem de fósforo inorgânico e métodos variados de diálise com membranas de celulose para a remoção de traços de etanol. Todas essas técnicas foram empregadas tendo em vista o efeito da força iônica, do pH e no caso do DPPC e do DODAB também o efeito da proporção molar em vesículas mistas na adsorção sobre partículas de sílica.

Como modelo de membrana celular foi escolhido um par receptor-ligante já bastante caracterizado na literatura, o monosialogangliosídio GM1 e a enterotoxina do vibrião colérico (*Vibrio cholerae*) (Figura 1.3.1).

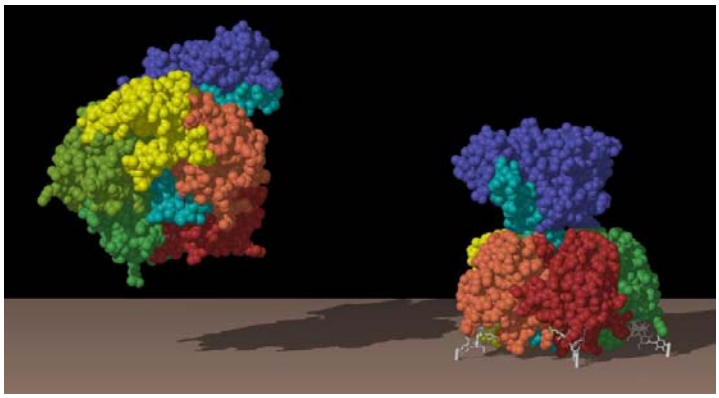


Figura 1.3.1 – Ilustração da toxina da cólera se ligando a 5 gangliosídios GM1 (em branco) na superfície de uma célula [Merrit et al., 1994].

O GM1 é um dos componentes glicoesfingolipídicos pertencentes à densa floresta de oligossacarídeos que se apresenta pela grande maioria das células para o observador externo. Esse gangliosídio se insere naturalmente no interior hidrofóbico de uma bicamada lipídica através de seu componente ceramida, enquanto a sua região hidrofílica permanece exposta para fora da superfície da membrana.

As propriedades dos glicoesfingolipídios, embora de grande importância em processos de reconhecimento celular, não foram até o momento tão profundamente investigadas como foram as dos fosfolipídios. Algumas de suas propriedades de bicamada quando misturados com fosfolipídios foram analisadas [Luckham et al., 1993]. A miscibilidade do GM1, que devido à sua geometria molecular se associa em forma de micelas em solução aquosa [Cantu et al., 1991], com DPPC foi comprovada, indicando que os dois componentes não se separam em duas fases quando misturados.

Outros estudos evidenciam a adsorção espontânea pela membrana plasmática de células intactas de GM1 exógeno adicionado [Moss et al., 1976; Fishman et al., 1978; Schwarzmann et al., 1983] com a maior parte do GM1 inserido na camada externa da membrana plasmática da célula [Miller-Podraza et al., 1982]. Anteriormente, a incorporação de GM1 micelar em partículas de látex recobertas por PC foi descrita em nosso grupo [Sicchierolli & Carmona-Ribeiro, 1995]. A análise quantitativa da incorporação do GM1 em bicamadas de PC adsorvidas na superfície das partículas de sílica foi realizada neste estudo com o uso de moléculas de GM1 ligadas covalentemente através de suas caudas hidrocarbônicas ao pireno, um fluoróforo bem caracterizado de alta eficiência quântica. O espectro de fluorescência do pireno foi estudado para avaliar o perfil de incorporação do GM1 nas membranas em função da concentração de PC ou de sílica adicionados à mistura, em condições de pH e força iônica fisiológicas.

A cólera e as doenças toxigênicas relacionadas são um problema sério em países de Terceiro Mundo e em qualquer lugar onde as reservas de água podem se tornar contaminadas. Os sintomas da cólera são causados pela ação de uma toxina (CT ou $CTAB_5$) que faz parte da família AB_5 de toxinas bacterianas produzidas por um grande número de patógenos, que se aproveitam de carboidratos de superfície celular, como o GM1, para se ligarem e invadirem as células alvo [Karlsson, 1989; Merrit & Hol, 1995]. Tais toxinas são caracterizadas por uma unidade dimérica A, composta de duas subunidades A1 e A2 ligadas entre si por ponte de enxofre, e uma unidade homopentamérica B_5 envolvendo um poro central formado pelas longas α-hélices em cada um dos monômeros B [Cuatrecasas, 1973; Holmgreen et al., 1993; Lencer et al., 1999]. Atualmente se sabe que cada subunidade B do oligômero da toxina da cólera (CTB_5) participa de ligações específicas com uma molécula de GM1 presente na face exterior de paredes celulares [Merrit et al., 1994; 1998], formando uma das interações proteína-carboidrato de maior afinidade de que se tem conhecimento [Turnbull et al., 2004]. O processo de atuação celular da toxina $CTAB_5$ após sua ligação com os receptores GM1 é ainda nebuloso mas foi postulado que após a ligação 1 $CTAB_5$: 5 GM1, ocorre uma clivagem proteolítica e a redução da ponte de enxofre em CTA, quando então o peptídeo A1, a porção catalítica propriamente dita, atravessa a membrana celular através do poro central de CTB_5 e penetra na face citoplasmática [Mekalanos et al., 1979]. Lá ele se liga à adenilato ciclase, obstruindo o seu funcionamento normal e levando a uma reação em cadeia que acarreta finalmente na perda descontrolada de água e íons sódio e cloro no lúmen intestinal (diarréia severa).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, 90% dos pacientes que desenvolvem a cólera apresentam somente diarréia leve e moderada [Rowe-Taitt et al., 2000]. Portanto a cólera é freqüentemente difícil de ser diferenciada de outras diarréias agudas. Em casos não tratados de diarréia colérica, onde a mortalidade pode atingir 50%, a perda de água pode se

dar a taxas de 10 – 20 litros por dia, podendo haver a morte do paciente dentro de 3 – 4 h. Assim, o diagnóstico da cólera deve ser rápido, sensível e tendo em vista as necessidades de países pobres terceiro mundistas, ele deve ser de baixo custo.

Atualmente existem diversas técnicas para se diagnosticar a doença da cólera, sendo as mais tradicionais as que envolvem o isolamento e identificação do organismo causativo a partir dos produtos fecais e vômito. Entretanto a cultura do vibrião pode levar de 8 a 24 horas o que pode significar atraso no diagnóstico. Imunoensaios (ELISAs), cromatografia líquida de alta-pressão (HPLC) e espectrometria de massa podem ser utilizados como alternativa para detectar a presença da toxina CT, o agente causador da doença em si, em amostras de sangue dando resultados mais rápidos e sensíveis. Entretanto tais técnicas envolvem equipamentos caros e mão-de-obra especializada para a preparação das amostras e operação dos aparelhos. Ainda assim um imunoensaio de ELISA por exemplo pode levar de 60 a 90 minutos para ser realizado, o que não se encaixa adequadamente no quesito rapidez de detecção [Ligler et al., 2003].

Técnicas mais recentes visam a detecção de CT sem grandes e complicados métodos de preparação de amostras e assim sem a necessidade de mão-de-obra especializada, com base na ligação específica com o GM1 imobilizado em superfícies biocompatíveis e oticamente ou eletronicamente ativas [Kelly et al., 1999; Larsson et al., 2005; Viswanathan et al., 2006]. Tais técnicas são rápidas, sensíveis, de simples operação e potencialmente transportáveis para regiões de maior necessidade, e é nessa classe em que o atual projeto almeja se encaixar.

Com a utilização de um duplo conjunto, de partículas de sílica recobertas com bicamadas lipídicas mistas (PC/GM1) e de partículas poliméricas de polimetilmetacrilato e carboximetilcelulose (PMMA/CMC) [Castro et al., 2004] recobertas com o anticorpo para a toxina, a antitoxina da cólera (ACT), foi almejada a preparação de um imunoensaio coloidal

para a cólera baseado nas ligações específicas receptor-ligante GM1/CT e antígeno-anticorpo CT/ACT. Partículas de sílica e de polímero sofreriam então uma agregação promovida por estas ligações específicas, em um processo que poderia ser detectado por turbidimetria, retornando o sinal positivo da presença da toxina da cólera nas amostras analisadas.

A imobilização de anticorpos em superfícies sólidas tem sido amplamente pesquisada devido às muitas aplicações em biotecnologia e medicina clínica baseadas em um sistema controlado de reconhecimento molecular. Para que sua capacidade de ligação ao antígeno seja preservada, o anticorpo deve ser adequadamente imobilizado, com as regiões de ligação (F_{ab}) orientadas para o solvente e o fragmento constante (F_c) interagindo com a superfície.

Os vários métodos amplamente utilizados para adsorção e imobilização de anticorpos em superfícies incluem adsorção física [Wadu-Mesthrige et al., 2000], imobilização via seus grupos de enxofre [Vikholm & Albers, 1998], ligação pelo grupo carboidrato no fragmento *Fc* do anticorpo [Shriver-Lake et al., 1997] ou ligação via proteínas já adsorvidas como proteína G e streptavidina [Vijayendran & Leckband, 2001]. Neste projeto foi objetivada de início a adsorção física do ACT na superfície das partículas de PMMA/CMC. Essas partículas são compostas por um núcleo duro de PMMA recoberto por uma camada altamente hidratada de CMC, apresentando assim uma superfície negativa devido aos grupos carboxila dos resíduos de açúcar dissociados [Castro et al., 2004].

A ligação de CT ou ACT a partículas recobertas por bicamadas mistas de PC e GM1 (para CT) e partículas de PMMA/CMC (para ACT), foi estudada em função da concentração de proteína adicionada a misturas de concentrações fixas de sílica, PC, GM1 ou PMMA/CMC em condições de pH e força iônica fisiológicas. A concentração de proteína não ligada foi medida pelo método de Lowry com o reagente de Folin & Ciocalteu [Lowry et al., 1951] e alternativamente pelo método da absorção no ultra-violeta característica das proteínas.

1.4 – Auto-Associação de Moléculas Anfifílicas

1.4.1 – Tipos de anfifílicos

O processo de auto-associação ocorre com estruturas moleculares anfifílicas, ou seja, moléculas que apresentam duas regiões distintas, uma porção hidrofóbica, composta por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas saturadas ou insaturadas, e uma porção hidrofílica, composta por um grupo polar [Kunitake, 1977]. Os anfifílicos podem ser classificados como:

- <u>aniônicos</u>: dodecilsulfato de sódio – $C_{12}H_{25}SO_4^-Na^+$
- <u>catiônicos</u>: brometo de dihexadeciltrimetilamônio – $C_{16}H_{25}N^+Me_3Br^-$
- <u>não-iônicos</u>: monoéter de dodecilhexaoxietileno glicol – $C_{12}H_{25}[OCH_2CH_2]_6OH$
- <u>zwiteriônicos</u>: 3-dimetildodecilamino propano sulfonato – $C_{12}H_{25}N^+(Me)_2(CH_2)_3SO_3^-$

Dentro deste último grupo se incluem muitos lipídios de origem natural, dentre eles os fosfolipídios como o PC, presente nas membranas plasmáticas de células animais. É essencialmente o balanço entre as partes hidrofóbica e hidrofílica da molécula que fornece as propriedades especiais relacionadas à interação com superfícies, levando a denominar tais sistemas de agentes ativos de superfícies, ou simplesmente surfactantes [Ottewill, 1984].

1.4.2 – Agregados moleculares e membranas-modelo

Em função da estrutura peculiar das moléculas anfifílicas, as mesmas quando presentes em solução aquosa sofrem uma auto-organização, podendo dar origem a diferentes estruturas como as micelas, estruturas do tipo bastão, bicamadas, vesículas, fases hexagonais (invertidas ou não), entre outras formas possíveis. Os principais fatores que determinam a auto-associação são as forças de interação de van der Waals, o efeito hidrofóbico, as pontes de hidrogênio, as interações eletrostáticas e o parâmetro de empacotamento crítico ou parâmetro

geométrico [Israelachvili, 1992].

Como se pode imaginar, misturas aquosas de anfifílicos são polimórficas. Isso decorre do fato de as moléculas anfifílicas serem associadas fisicamente, e não quimicamente, de modo que a forma e o tamanho do agregado mudam em resposta a variações nas condições da solução. Assim, dependem de vários parâmetros como composição e concentração dos anfifílicos, temperatura, força iônica e pH da solução [Gennis, 1989; Evans & Wennerström, 1994]. São justamente as estruturas formadas a partir da auto-associação dessas moléculas anfifílicas, que são chamadas de sistemas supramoleculares. Tais agregados são denominados colóides de associação, e como exemplo temos: detergentes, membranas celulares, cristais líquidos de "displays", membranas-modelo, certos polímeros, etc.

Do ponto de vista termodinâmico, a principal força que dirige a formação e estabilização de agregados de anfifílicos hidratados é a chamada interação ou efeito hidrofóbico. Essa força é de natureza entrópica, pois permite uma maior organização das moléculas anfifílicas em forma de agregados, mas às custas de um aumento da entropia da água (solvente), e é resultado de uma coerção ou de uma compressão desfavorável localizada sobre as moléculas de água ao empacotarem em torno de um hidrocarboneto não polar.

Além dos aspectos energético-estruturais, uma série de outras propriedades se origina devido às características coloidais destes agregados supramoleculares. Sistemas como esses, compostos por estruturas de dimensões coloidais como vesículas dispersas em um solvente polar, formam duas fases distintas: a fase dispersa (colóide) e o meio da dispersão (solvente), estando separados por uma interface bem definida [Evans & Wennerström, 1994]. Estas interfaces são geralmente regiões de alta energia livre onde fenômenos de superfície, tais como adsorção e formação de duplas camadas elétricas podem ocorrer.

Foram realizados vários estudos sobre vesículas carregadas de anfifílicos sintéticos, e

sobre a adequação de se aplicar a teoria DLVO desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek, para explicar a estabilidade coloidal dos sistemas em questão [Carmona-Ribeiro & Midmore, 1992; Carmona-Ribeiro, 1992b; Carmona-Ribeiro, 1993a; Carmona-Ribeiro, 1993b]. Além do mais, as interações entre tais estruturas supramoleculares são regidas por forças intermoleculares e de superfície, tais como forças eletrostáticas relativas à dupla camada elétrica, e forças de van der Waals.

O tamanho e forma do agregado de anfifílico são dependentes dos parâmetros moleculares (volume da porção hidrofóbica da molécula, comprimento de cadeia, e área da cabeça polar) e variáveis intensivas (temperatura e força iônica). O modelo de auto-associação de Israelachvili prevê o agregado ótimo para um determinado conjunto de parâmetros moleculares e variáveis intensivas usando um critério de minimização de energia livre para o monômero no agregado [Israelachvili et al., 1977].

Pode-se assumir que a energia livre de auto-associação de surfactantes em soluções diluídas é constituída de três termos [Evans & Wennerström, 1994]. Uma contribuição hidrofóbica devido às cadeias apolares, um termo de superfície atribuído aos grupos polares, e um termo de empacotamento que requer que o interior hidrofóbico do agregado exclua água. Termos de superfície e empacotamento assumem diferentes formas funcionais para cada agregado geométrico específico. A forma que dá o mínimo de energia livre para um determinado conjunto de condições determina a estrutura ótima do agregado.

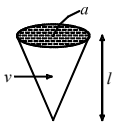
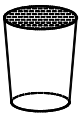
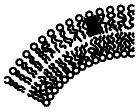
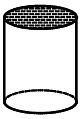
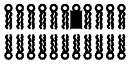
Para soluções diluídas em que interações entre agregados não são importantes, pode-se assumir essas concepções convenientemente no parâmetro geométrico (N_s), que é dado por:

$$N_s = \frac{v}{la_0} \qquad \text{Equação 1.4.2.1}$$

onde, v é o volume da porção hidrofóbica da molécula do surfactante; l é o comprimento da

cadeia apolar e a_0 é a área ótima da cabeça polar. A Tabela 1.4 ilustra a associação entre Ns e os agregados supramoleculares formados. À medida que o parâmetro geométrico aumenta, a estrutura supramolecular formada também aumenta. As interações entre tais unidades estruturais supramoleculares são regidas por forças intermoleculares e de superfície, tais como forças eletrostáticas relativas à dupla camada elétrica, e forças de van der Waals.

Tabela 1.4 – Exemplos de agregados supramoleculares de anfifílicos [Israelachvili, 1992].

Lipídio	N_s	Forma do empacotamento	Estrutura formada
Lipídios de cadeia simples (surfactantes) com área da cabeça polar grande: *SDS em baixa concentração de sal.*	< 1/3	Cone 	Micela esférica
Lipídios de cadeia dupla com área de cabeça polar grande, cadeias fluidas: *Fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina, diexadecilfosfato, sais de dialquildimetilamônio.*	1/2 – 1	Tronco de cone 	Bicamadas flexíveis, vesículas 
Lipídios de dupla cadeia com área de cabeça polar pequena, lipídios aniônicos em alta concentração salina, cadeias saturadas rígidas: *Fosfatidiletanolamina, fosfatidil serina I + Ca^{2+}.*	~1	Cilindro 	Bicamadas planas 

Agregados supramoleculares em forma de vesículas possuem uma temperatura de transição de fase (T_c), abaixo da qual encontram-se na fase gel, que se caracteriza por uma maior rigidez das cadeias hidrocarbônicas, e acima da qual as cadeias estão mais fluídas, com maior liberdade rotacional e menor densidade de empacotamento, estando a bicamada na fase líquido-cristalina.

A transição de fase, observada tanto em membranas-modelo quanto em algumas membranas naturais, depende da carga dos lipídios, da composição molecular da membrana, do número de duplas ligações nas cadeias hidrocarbônicas e da incorporação de outras moléculas na estrutura [Bangham et al., 1967; Eibl & Blume, 1979; Blandamer et al., 1995]. Quanto maior a densidade de empacotamento das cadeias hidrocarbônicas na fase gel, maior

será a temperatura de transição de fase [Lee, 1977].

1.4.3 – Anfifílicos formadores de bicamadas

Bicamadas planares formadas por moléculas de anfifílicos têm uma posição central no estudo de auto-organização, apresentando papel crucial em processos biológicos e industriais [Evans & Wennerström, 1994]. Fosfolipídios são abundantes nas membranas biológicas, constituintes das paredes celulares. Eles derivam de um glicerol esterificado por dois ácidos graxos, enquanto um grupo polar é ligado ao terceiro OH do glicerol, constituindo um triacilglicerol. Nos mamíferos, esse terceiro grupo é fosforilado e então modificado, formando um fosfolipídio. O intervalo típico de comprimento de cadeia hidrocarbônica é de 16 a 18 carbonos e o grau de insaturação tende a aumentar com o aumento do comprimento da cadeia.

Lipídios que formam bicamadas são aqueles que não podem empacotar em estruturas micelares, devido à sua cadeia hidrocarbônica muito volumosa para se ajustar em agregados micelares, enquanto mantêm uma área superficial ótima (Figura 1.4.3.1).

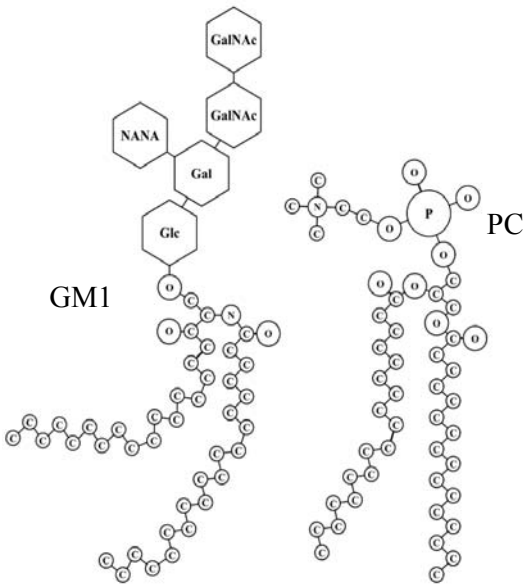


Figura 1.4.3.1 – O GM1, apesar de possuir duas cadeias hidrocarbônicas, é formador de micelas pois possui uma cabeça polar oligossacarídica volumosa em relação ao volume dessas cadeias hidrocarbônicas. O PC por sua vez, graças à sua forma cilíndrica, auto-associa-se formando bicamadas.

Para lipídios formadores de bicamadas, o valor de v/a_0l deve ser próximo de 1, e para que isso ocorra é necessário que a área a_0 do grupo polar e o comprimento da cadeia hidrocarbônica, l, sejam iguais aos valores dos lipídios formadores de micela, e o volume da cadeia hidrocarbônica, v, deve ser cerca de duas vezes aquele dos lipídios formadores de micela (para que v/a_0l esteja entre 1/3 e 1/2). Por essa razão, lipídios com duas cadeias são prováveis formadores de bicamadas, e de fato a maioria deles forma bicamadas. Por exemplo, lisolecitinas formam micelas pequenas, mas não esféricas, enquanto lecitinas com duas cadeias formam bicamadas.

A duplicação da cadeia também afeta outras propriedades do agregado, tanto estáticas como dinâmicas. Primeiro, aumenta a hidrofobicidade do lipídio, que diminui drasticamente sua concentração micelar crítica (CMC), uma medida importante para a caracterização de surfactantes. Se um surfactante é aos poucos adicionado à água, suas moléculas vão se organizando na superfície de maior energia com as caudas hidrofóbicas projetadas para fora da superfície. Quando a superfície não tiver mais espaço para abrigar moléculas adicionais de surfactante, elas irão então começar a formar agregados moleculares no interior do líquido; esses agregados são as micelas. A concentração de surfactante na qual a formação de micelas tem início é conhecida como a concentração micelar crítica (CMC). A CMC de lipídios formadores de micelas está por volta de 10^{-2} a 10^{-5} M enquanto a de lipídios formadores de bicamadas está entre 10^{-6} e 10^{-10} M.

Segundo, a duplicação da cadeia aumenta o tempo de residência, τ_R, das moléculas dentro do agregado. Para lipídios formadores de micelas, o tempo de residência é aproximadamente 10^{-4} s, enquanto que para lipídios formadores de bicamadas este tempo é de aproximadamente 10^{4} s [Israelachvili, 1992].

Em uma situação ideal, a bicamada se estenderia indefinidamente na direção lateral.

Na realidade, amostras finitas, como fragmentos de membrana, mostram defeitos hidrofóbicos nas bordas, e bicamadas tendem a fechar sobre si mesmas, formando estruturas conhecidas como lipossomos ou vesículas [Evans & Wennerström, 1994]. Vesículas são bicamadas fechadas que delimitam um compartimento aquoso interno e outro externo. São úteis como modelos de membrana. As vesículas, em sua maioria, são termodinamicamente instáveis e as propriedades físicas e funcionais das dispersões destas dependem do método de preparação [Evans & Wennerström, 1994]. Como exemplos temos:

- Sonicação em banho, que forma vesículas multilamelares [Kunitake et al., 1977].
- Sonicação por tip, que forma vesículas unilamelares pequenas e/ou fragmentos de membranas [Mortara et al., 1978; Kano et al., 1979; Pansu et al., 1990; Carmona-Ribeiro et al., 1991].
- Vaporização clorofórmica, que gera vesículas unilamelares grandes [Carmona-Ribeiro & Chaimovich, 1983; Carmona-Ribeiro et al., 1984].
- Injeção etanólica seguida de diálise para eliminação do etanol, que forma vesículas unilamelares pequenas [Batzri & Korn, 1973].
- Injeção etérea, que forma vesículas unilamelares grandes [Deamer & Bangham, 1976].

O volume capturado por uma vesícula é definido como o volume englobado por mol de anfifílico expresso em litros por mol (l/mol). Esse parâmetro cresce com o diâmetro da vesícula [Carmona-Ribeiro, 1992a]. O tamanho das vesículas pode ser determinado por microscopia eletrônica ou por espectroscopia de correlação fotônica. Depois de preparadas pelo método da injeção etanólica seguida de diálise, vesículas de fosfatidilcolina se encontram em dispersão coloidal e apresentam cerca de 70 nm de diâmetro hidrodinâmico.

Em pesquisa e aplicações de lipossomos o termo estabilidade é usado vagamente e não é freqüentemente bem definido. A definição geral de estabilidade contém vários aspectos que podem ser definidos separadamente, mas freqüentemente agem sinergicamente. A estabilidade física é o aspecto que envolve preservação da estrutura e volume interno do lipossomo, de seu tamanho e forma. Tanto a preservação do tamanho, quanto a encapsulação depende das propriedades mecânicas da bicamada e termodinâmicas dos sistemas. Vesículas são termodinamicamente instáveis porque a membrana é simetricamente curvada, e a baixa energia de conformação das membranas é, em geral, planar [Lasic, 1994].

Os mecanismos de degradação de lipídios mais comuns são a oxidação e a hidrólise. Em geral, a cabeça polar é muito mais estável que a cadeia hidrocarbônica. As cadeias hidrocarbônicas insaturadas são objetos de oxidação, em uma reação radicular que em último caso resulta na quebra das cadeias ou, em caso de duplas ligações adjacentes, na formação de peróxidos cíclicos [Lasic, 1994].

Agregação é o primeiro passo na fusão de vesículas e depende da estabilidade termodinâmica da amostra e da presença de substâncias fusogênicas. Fusão é praticamente um processo irreversível enquanto agregação pode ser reversível. Fusão seguida de propagação de bicamadas de fosfolipídios sobre superfícies de vidro foram investigadas em função do pH e da força iônica [Cremer & Boxer, 1999], sendo observado que fusão de vesículas negativas sobre o suporte negativo é favorecida por alta força iônica e baixo pH. Enquanto que para vesículas neutras ou positivamente carregadas ocorre a fusão sobre a superfície adsorvente em qualquer condição. Isso sugere que as interações de van der Waals e eletrostática governam o processo de fusão.

Há muitas forças atrativas e repulsivas que agem entre partículas coloidais. A força de atração de van der Waals age entre todas as partículas separadas por um meio que tenham

propriedades de polarização diferentes. Partículas que possuem a mesma carga experimentam uma repulsão eletrostática. Essas duas forças são a base da teoria de DLVO da estabilidade de partículas. Em muitos casos, no entanto, essa teoria pode não predizer a estabilidade de lipossomos.

Para elucidar por que suspensões coloidais têm uma menor estabilidade que a esperada, forças atrativas adicionais entre as partículas coloidais, como a atração hidrofóbica ou atração correlação íon-íon foram introduzidas [Helm et al., 1989; Carmona-Ribeiro, 1992a; Jeon et al., 1991]. A origem de algumas dessas forças não é ainda bem conhecida, e são ainda controversas. A força de hidratação como sendo repulsiva foi questionada e uma força repulsiva de protusão, uma repulsão estérica causada pelo movimento vertical das cabeças polares foi proposta [Israelachvili & Wennerström, 1990].

A situação é ainda menos clara com respeito à força atrativa hidrofóbica entre dois lipossomos. Qualitativamente, no entanto, essa atração pode ser explicada como uma conseqüência da perturbação da estrutura da água. Predominantemente, densidade superficial de carga, potencial-zeta, distribuição de tamanho e homogeneidade, assim como força iônica e pH do meio determinam a estabilidade coloidal *in vitro* [Lasic, 1994].

1.5 – Superfícies de SiO_2

O dióxido de silício, óxido de silício ou simplesmente sílica (SiO_2) pode se apresentar tanto no estado cristalino quanto no estado amorfo. No estado cristalino ele ocorre em diferentes formas, mas todas possuem átomos de silício ligados cada um a quatro átomos de oxigênio por meio de uma ligação simples Si-O formando uma estrutura tetraédrica com o átomo de silício no centro e os átomos de oxigênio nas pontas do tetraedro. A estrutura tridimensional resultante desse tipo de ligação forma uma rede cristalina estável e não volátil.

De todas as ligações que o silício forma, a ligação Si-O tem uma energia de ligação maior que qualquer outra, com exceção da ligação Si-F. Não é surpreendente então que a química do silício seja dominada por compostos contendo ligações Si-O, e que o SiO_2 seja uma substância quimicamente estável. O óxido de silício constitui aproximadamente 55% da superfície terrestre e é encontrado em todas as plantas e animais. Ele ocorre em muitas formas na natureza, dentre elas estão a areia, o sílex (pedra de isqueiro), ágata, jaspe, ônix e quartzo [Mortimer, 1971]. Dois grupos funcionais podem ser encontrados em superfícies de sílica: os silanóis e os siloxanos. Um caráter hidrofílico deve ser atribuído aos grupos silanóis, isto é, esses grupos atraem água e são responsáveis pela alta molhabilidade característica da sílica hidrofílica pela água. Em contraste, os grupos siloxanos são quimicamente inertes.

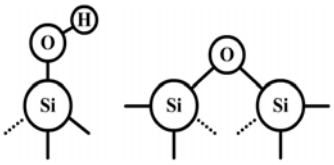


Figura 1.5.1 – Silanol e siloxano, principais grupos encontrados na superfície de SiO_2.

1.5.1 – Particulados

Os particulados de sílica possuem grande área específica, sendo que suas propriedades dependem da química de superfície de sua fase sólida. São usados como catalisadores, para processamento mineral, como cerâmicas e adsorventes, e ainda, para fabricação de agentes espessantes em sistemas orgânicos, como tintas, elastômeros, e graxas lubrificantes. Podem ser obtidos por diversos modos:

- Arco sílica – a sílica é produzida por redução da areia de quartzo com coque em um forno arco elétrico e subseqüente oxidação do SiO formado.

- Processo de plasma – a sílica é formada por meio de gases ionizados.

- Sílica precipitada – sílica que é formada durante a conversão de vidro de silício com ácido sulfúrico.

- AEROSIL – a sílica é produzida por processos de hidrolise em altas temperaturas.

Os dois primeiros métodos de preparação não têm importância técnica, quando comparados com os dois outros métodos [DEGUSSA, 1993].

O processo AEROSIL, isto é, a síntese industrial em larga escala de AEROSIL, pode ser descrito como uma hidrólise em chama contínua de tetracloreto de silício ($SiCl_4$). Durante esse processo, $SiCl_4$ é convertido à fase gasosa em temperaturas por volta de 1000 °C e então reage espontaneamente e quantitativamente em uma chama de oxigênio e hidrogênio, formando água intermediariamente e produzindo o dióxido de silício na forma de um fino particulado branco. O único subproduto é cloreto de hidrogênio gasoso que é separado do material AEROSIL sólido:

$$2H_2 + O_2 + SiCl_4 \rightarrow SiO_2 + 4HCl$$

Variando a concentração dos reagentes, a temperatura da chama, e o tempo de residência da sílica na câmara de combustão, é possível variar o tamanho das partículas, a distribuição de tamanho das partículas, a área superficial específica, e as propriedades das superfícies de sílica dentro de limites amplos. Ao final do processo, a sílica pirogênica possui em sua superfície grupos silanóis (Figura 1.5.1), que lhe conferem características hidrofílicas.

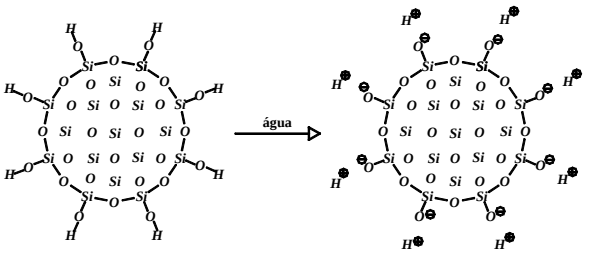


Figura 1.5.1.1 – Dissociação dos grupos silanóis na superfície das partículas AEROSIL.

AEROSIL é um ácido muito fraco (o equilíbrio químico da Figura 1.5.1.1 está deslocado para a esquerda). Em uma dispersão aquosa de SiO_2 a uma concentração de 0,15 mg/ml, um pH de 6,1 é encontrado. Entretanto, a determinação do valor de pH é perturbada pela presença de aglomerados no caso de uma dispersão de AEROSIL. Em alguns casos a medição é feita somente após centrifugação, aonde valores maiores de pH são encontrados [DEGUSSA, 1993]. Esse fenômeno é chamado de efeito de suspensão, e nos limites levemente ácidos (pH 4,5 – 7) pode resultar em diferenças consideráveis entre a dispersão e a solução (± 2 unidades de pH). Essas discrepâncias são atribuídas às partículas de sílica negativamente carregadas e ao conseqüente aumento no número de transporte dos contra-íons positivos na dispersão [Lee et al., 1989].

Como os grupos silanóis podem liberar prótons para o meio aquoso, uma superfície sólida carregada negativamente é criada. Entretanto, já que todo o sistema de dispersão é eletricamente neutro, esse efeito é compensado nos sítios de carga superficial negativa por contra-íons positivos. Enquanto a primeira camada de carga é fixa, o potencial elétrico ao redor da partícula na área de uma segunda camada difusa de contra-cargas diminui lentamente. Essa queda da voltagem é conhecida como o potencial-zeta (ζ) (Figura 1.5.1.2B).

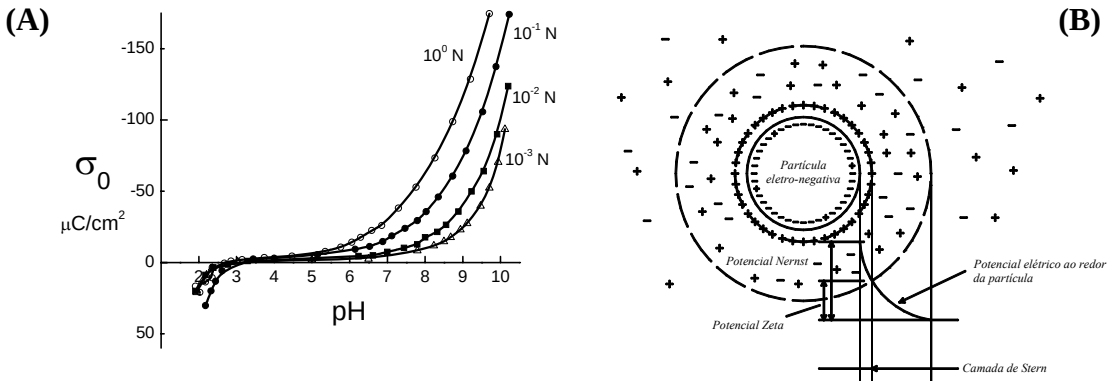


Figura 1.5.1.2 – Densidade superficial de carga em função do pH para SiO_2 em 4 diferentes concentrações de KCl [Tadros & Lyklema, 1968] (A); dupla-camada elétrica ao redor de uma partícula negativamente carregada, definição de potencial-zeta (ζ) (B).

1.5.2 – AEROSIL OX-50

A sílica utilizada neste trabalho foi a AEROSIL OX-50 (Figura 1.5.2.1), produzida pela DEGUSSA S/A. Esta sílica possui caráter hidrofílico. Com área superficial, obtida pelo método de BET, de 50 ± 15 m^2/g, diâmetro médio de partícula de 40 nm e porcentagem de SiO_2 superior a 99,8% [DEGUSSA, 1993].

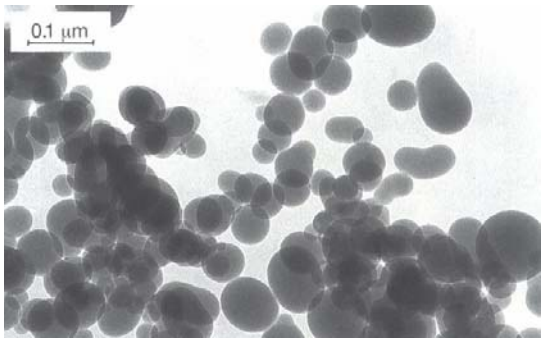


Figura 1.5.2.1 – Microscopia de transmissão eletrônica (TEM) de AEROSIL OX-50.

Este tipo de sílica possui baixa superfície específica e ligeira tendência a aglomerar. Essa aglomeração é resultado principalmente da tendência dos grupos silanóis superficiais de partículas vizinhas a formarem pontes de hidrogênio entre si mesmas como na Figura 1.5.2.2A. Essa agregação pode resultar na formação de aglomerados macroscópicos de particulados formando uma estrutura de rede tridimensional temporária, reversível até certo ponto por agitação (Figura 1.5.2.2B).

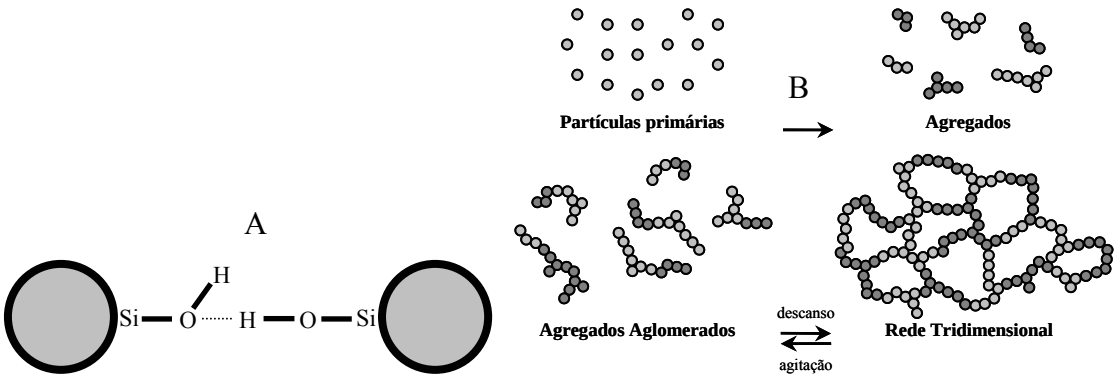


Figura 1.5.2.2 – Representação da formação de pontes de hidrogênio entre partículas (A) e aglomeração dos agregados em uma rede tridimensional macroscópica (B).

1.6 Adsorção de Membranas-Modelo em Superfícies

1.6.1 – Aspectos físico-químicos da adsorção em superfícies

Primeiramente é conveniente fazer algumas definições gerais sobre superfícies e sobre o fenômeno de adsorção. As superfícies das fases têm um comportamento diferente do que apresenta a parte interior das próprias fases, por causa das rápidas mudanças estruturais que devem ocorrer nas fronteiras das fases e suas vizinhanças. Os arranjos de ligação de equilíbrio são rompidos, nascendo ai uma energia de excesso associada à superfície (isto é, energia de superfície), que é medida em energia por unidade de área.

Essa energia em excesso pode ser minimizada se área superficial for minimizada. A energia de superfície pode ser diminuída pela segregação de vários componentes na direção da superfície ou em direção contrária, em um comportamento conhecido como adsorção. A teoria da adsorção é amplamente empregada em vários sistemas, e estabelece que havendo um contato molecular suficientemente íntimo na interface separando dois meios ou fases, os materiais vão aderir a esta devido a forças intermoleculares e interatômicas. Essas forças podem ser divididas em duas classes distintas:

Adsorção Física ou Fisissorção:

- Forças entre o adsorbato e adsorvente sem formação de compostos.
- Interações não orientadas e não especificas.
- Envolve baixas energias de interação (300 a 3.000 $J.mol^{-1}$).
- Facilmente reversível, o material dessorvido é o mesmo que foi adsorvido.
- Exemplo típico: Adsorção de nitrogênio (N_2) sobre óxido de silício.

Adsorção Química ou Quimissorção:

- Forças de natureza química que levam à formação de compostos.
- Altas energias de interação (40.000 a 400.000 $J.mol^{-1}$)
- Dificilmente reversível, muitas vezes reações químicas levam à dessorção de material diferente do que foi adsorvido.
- A adsorção não mais ocorre quando a superfície está completamente coberta por uma monocamada do material adsorvido.
- Exemplo típico: adsorção de oxigênio (O_2) sobre carvão.

O fenômeno da adsorção de várias espécies, particularmente os anfifílicos, pode ocorrer em interfaces ar-liquido, liquido-liquido, e sólido-liquido. Para este trabalho irá se considerar o caso da adsorção na interface sólido-liquido. Fisicamente, uma interface é caracterizada principalmente pela energia livre interfacial ou tensão, que é resultado da orientação das moléculas que constituem a interface. Estas e outras propriedades interfaciais das membranas podem ser largamente compreendidas com base nos termos físico-químicos que as governam [Wängneurud & Jönsson, 1994; Li & Ruckestein, 1996; Sharma et al., 1996]. Neste trabalho, a formação de bicamadas ou de monocamadas sobre uma superfície sólida ocorre pela interação de vesículas com a superfície. Pode-se concluir então que o tipo de adsorção que será considerado que efetivamente está ocorrendo neste sistema é a adsorção física.

1.6.2 – Isotermas de adsorção

O contato de uma substância tensoativa diluída em solução aquosa com uma grande superfície adsorvente, poderá levar a uma adsorção extensiva com uma redução contínua na

concentração da solução. Para se ter uma superfície grande para adsorção, o sólido – que é chamado de adsorvente – deve ser finamente dividido. A partir de dados analíticos que descrevem a mudança de concentração na solução, assim como o conhecimento da quantidade total de sólido da solução equilibrada, é possível determinar a quantidade de soluto adsorvido, que é chamado de adsorbato, por unidade de peso do sólido. Se a área específica do sólido é conhecida, então os resultados podem ser expressos como quantidade adsorvida por unidade de área. Esses estudos são geralmente conduzidos a temperatura constante, e os resultados, que relacionam a quantidade de material adsorvido com a concentração de equilíbrio em solução, definem uma isoterma de adsorção [Hiemenz, 1986].

1.6.2.1 – Tipos de isotermas

Isotermas para adsorção de solutos orgânicos são divididas em quatro classes principais, de acordo com a natureza do coeficiente angular da porção inicial da curva (Figura 1.6.2.1.1).

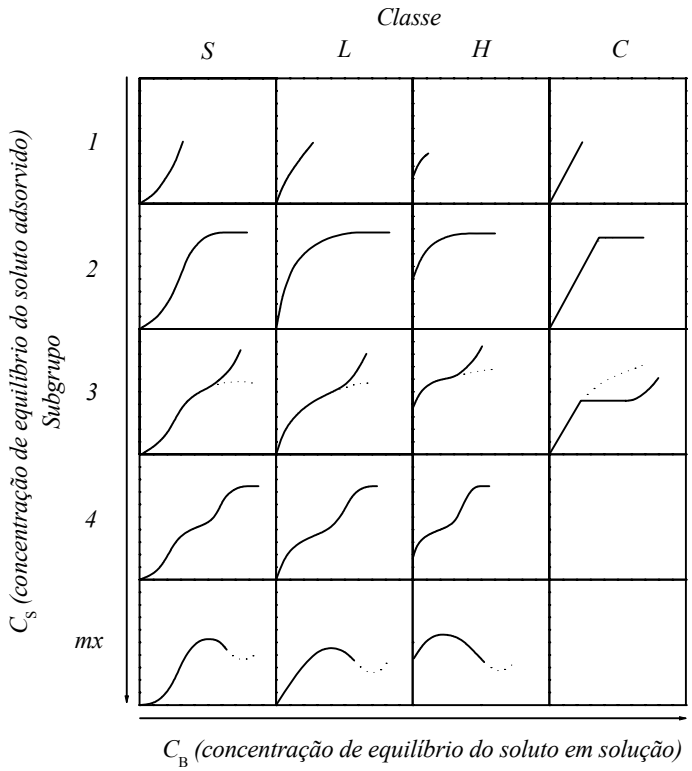


Figura 1.6.2.1.1 – Sistema de classificação de Isotermas.

- Curvas S, indicativas de orientação vertical de moléculas do adsorbato na superfície.

- Curvas L, isotermas normais ou de "Langmuir", usualmente indicativas de adsorbatos "deitados" sobre a superfície, ou às vezes, adsorbatos iônicos orientados verticalmente com atração intermolecular particularmente forte.

- Curvas H ("alta afinidade"; começando de um valor positivo no eixo de concentração adsorvida sobre o sólido), freqüentemente resultado da adsorção de solutos como micelas iônicas, ou de troca iônica de alta-afinidade com íons de baixa-afinidade.

- Curvas C ("partição constante"), curva linear, resultando da adsorção de solutos que adsorvem no sólido mais rapidamente do que o solvente [Giles et a., 1960].

Os subgrupos destas classes estão arranjados de acordo com a forma das curvas depois do ponto de origem e da posição do platô. Assim, se as moléculas do soluto que estão adsorvidas na nova superfície apresentam baixa atração por mais moléculas, a curva apresenta um longo platô. Se as moléculas que estão adsorvidas na superfície apresentam alta afinidade por mais soluto, a curva cresce continuamente e não apresenta platô.

A inclinação inicial depende da velocidade de mudança do sítio de adsorção com aumento no soluto adsorvido. Para haver adsorção de uma dada quantidade adicional do soluto, a concentração deste deve ser aumentada. Na parte inicial das curvas S, no entanto, a condição oposta é aplicada, e quanto mais soluto já está adsorvido, mais fácil serão adsorvidas quantidades adicionais. Isso implica em uma associação lado a lado entre as moléculas adsorvidas ou adsorção cooperativa. Na prática, a curva S usualmente aparece quando três condições são preenchidas: a molécula do soluto (a) é monofuncional, (b) tem moderada

atração intermolecular, causando o empacotamento vertical na camada adsorvida e (c) encontra forte competição, pelos sítios do substrato, a partir de moléculas do solvente ou de outras espécies adsorvidas. Essa isoterma aparentemente indica a tendência de moléculas de adsorbatos se associarem, ao invés de se manterem em unidades isoladas.

As curvas L são as mais conhecidas; na verdade a curva L2 ocorre em provavelmente na maioria dos casos de adsorção a partir de soluções diluídas. Nas curvas L, a curvatura inicial mostra que quanto mais sítios são preenchidos torna-se mais difícil a adsorção de moléculas do soluto em novos sítios. Isso implica que as moléculas adsorvidas não estão verticalmente orientadas, ou que não existe uma forte competição do solvente. Os tipos de sistemas que apresentam este tipo de curva de fato preenchem essas condições, possuindo as seguintes características: (i) as moléculas adsorvidas são preferencialmente adsorvidas deitadas; (ii) se adsorvidas verticalmente as moléculas sofrem uma pequena competição pelo solvente. Exemplos de (ii) são: (a) sistemas com solutos e substratos altamente polares, (b) sistemas com substâncias iônicas monofuncionais com atração intermolecular muito forte. É possível que nesses casos (sistemas b), os íons adsorvidos possam se associar em aglomerados muito grandes antes da adsorção acontecer.

As curvas H são um caso especial da curva L, em que o soluto tem tão alta afinidade pela superfície, que em soluções diluídas é completamente adsorvido, ou pelo menos, não permanece em quantidades mensuráveis na solução remanescente. A parte inicial da isoterma é vertical. As espécies adsorvidas são freqüentemente unidades grandes como micelas e bicamadas iônicas ou moléculas poliméricas, mas às vezes elas são íons aparentemente simples que trocam com outros íons de afinidade muito menor pela superfície. Para altíssimas afinidades, a curva é uma linha horizontal.

Nas curvas C, os sítios de adsorção mantêm-se constantes em todas as concentrações

até a saturação. A curva C é caracterizada por partição constante do soluto entre solução e substrato, diretamente até a adsorção máxima possível, onde há uma mudança abrupta no platô horizontal. As condições que favorecem o aparecimento de curva C são: (a) um substrato poroso com moléculas flexíveis e regiões com diferentes graus de cristalinidade, e um soluto com (b) mais alta afinidade pelo substrato do que pelo solvente e com (c) melhor poder de penetração, em virtude da condição (b) e da geometria molecular, nas regiões cristalinas do substrato.

Fundamentalmente, a linearidade mostra que os números de sítios para adsorção mantêm-se constantes; isto é, quanto mais soluto é adsorvido, mais sítios devem ser criados. Uma isoterma linear indica que o soluto está adsorvendo em regiões inacessíveis ao solvente, ou seja, há excesso de sítios disponíveis para a adsorção.

Um dos tipos mais comuns é a isoterma de Langmuir, importante por ser facilmente entendida teoricamente, e largamente aplicada aos mais diferentes dados experimentais. Uma das fórmulas deste modelo pode ser expressa por:

$$x_2^S = \frac{ka_2^b}{ka_2^b + 1} \qquad \text{Equação 1.6.2.1.1}$$

onde x_2^S é a fração molar do soluto na superfície, a_2^b é a atividade do soluto na solução, e k é uma constante. Tal isoterma decorre do fato de se considerar a adsorção do soluto segundo a Equação 1.6.2.1.2.

$$\text{Solvente}_{\text{adsorvido}} + \text{Soluto}_{\text{em solução}} \rightarrow \text{Soluto}_{\text{adsorvido}} + \text{Solvente}_{\text{em solução}} \qquad \text{Equação 1.6.2.1.2}$$

A constante de equilíbrio para essa reação pode ser definida como:

$$k = \frac{a_2^s a_1^b}{a_1^s a_2^b}$$ Equação 1.6.2.1.3

Nesta teoria é suposto que uma solução em que ambos solvente (componente 1) e soluto (componente 2) têm moléculas que ocupam a mesma área ao adsorverem à superfície. Assumindo que a solução na superfície bidimensional é ideal, podemos substituir atividade na superfície por fração molar na superfície x^s definida como:

$$k = \frac{x_2^s a_1^b}{x_1^s a_2^b}$$ Equação 1.6.2.1.4

Uma forma equivalente da equação de Langmuir expressa em variáveis ligeiramente diferentes é obtida multiplicando ambos x_1^s e x_2^s na Equação 1.6.2.1.1 pela área total da superfície. Como foi postulado que tanto o solvente como o soluto ocupam áreas iguais sobre a superfície, então, $x_i^s A$ é igual à fração da superfície ocupada pelo componente *i*, θ_i. Desde que $\theta_1 + \theta_2 = 1$, a relação θ_1 / θ_2 rearranja da mesma maneira que x_2^s / x_1^s para dar:

$$\theta_2^S = \frac{ka_2^b}{ka_2^b + 1}$$ Equação 1.6.2.1.5

Nesta forma a equação de Langmuir mostra como a fração dos sítios de adsorção da superfície ocupada pelo soluto aumenta com a atividade do soluto em soluções com concentrações crescentes.

A adsorção de DODAB sobre sílica hidrofílica a partir de vesículas pequenas em solução aquosa é geralmente representada por isotermas de adsorção de alta afinidade [Tadros & Lyklema, 1968; Milonjić, 1987]. Esta alta afinidade entre DODAB e sílica é compatível

com a formação de par iônico entre os grupos silanóis dissociados da sílica e os grupos amônio quaternário do DODAB.

Em geral este tipo de isoterma é obtido quando o adsorbato tem tão alta afinidade que, em soluções diluídas, é completamente adsorvido, ou pelo menos quantidades remanescentes na solução não são mensuráveis. Assim, a parte inicial de todas estas isotermas é vertical. Contudo, com o aumento da concentração de DODAB, a quantidade adsorvida diminui em todos os casos.

Este efeito resulta da associação do adsorbato em solução [Giles et al., 1960], isto é, aumentando a concentração de DODAB a interação vesícula/vesícula em solução aumenta mais rapidamente que a atração pela sílica. Isto ocorre, pois vesículas de DODAB sonicadas interagem entre si devido à sua preferência por menor curvatura, presença de fragmentos de bicamadas, tendência a formar lipossomos multilamelares, tendência a fundir, etc. [Carmona-Ribeiro, 1992a].

A adsorção de PC sobre partículas de sílica hidrofílica a partir de vesículas pequenas em água é geralmente representada por isotermas de muito baixa afinidade [Rapuano, 2000], próprias de adsorventes e adsorbatos que pouco interagem entre si. Ao contrário do DODAB, o PC não possui uma cabeça polar com carga líquida positiva, o que elimina a presença de forças eletrostáticas entre a superfície negativamente carregada da sílica e o fosfolipídio neutro. Assim, em baixas concentrações de PC não ocorre uma adsorção significativa de PC sobre a superfície da sílica permanecendo vesículas e partículas isoladas na dispersão aquosa. Somente com a elevação da concentração do lipídio é que a interação aumenta e se inicia a adsorção sobre a sílica.

A medição direta das forças físicas que ocorrem entre partículas coloidais e bicamadas lipídicas poderia fornecer dados importantes para se determinar o mecanismo de adesão entre

várias partículas biológicas e membranas celulares, entretanto são escassos os estudos que têm quantificado as forças de interação entre uma única partícula coloidal ou biológica e uma superfície lipídica. Modelos quantitativos que são empregados para prever forças de adesão entre partículas coloidais, como a teoria de DLVO, são incapazes de fornecer uma predição adequada das forças de interação entre superfícies não-ideais por não levarem em conta todas as possíveis variáveis que levam ao comportamento não-ideal [Sharp et al., 2006].

1.7 – Introdução ao espalhamento quasi-elástico de luz

A luz pode ser tratada como uma onda eletromagnética. O campo eletromagnético oscilante induz oscilações dos elétrons das partículas. Essas alterações de oscilação formam a origem da luz espalhada. Ao longo dos anos, muitas das características da luz espalhada foram usadas para determinar o tamanho de partículas. Como por exemplo:

- Mudanças na intensidade média em função do ângulo.
- Mudanças na polarização.
- Mudanças no comprimento de onda.
- Flutuações em volta da intensidade média.

Este último fenômeno é a base do espalhamento de luz quase-elástico (Quasi-Elastic Light Scattering – QELS) e ocorre da seguinte maneira: imagine um detector de luz fixado em um ângulo qualquer em relação à direção do feixe de luz incidente e a uma distância fixa do volume espalhador aonde há um grande número de partículas dispersas. Luz espalhada por cada partícula alcança o detector. Como as partículas pequenas estão se movendo no líquido aleatoriamente, realizando movimentos brownianos difusos, a distância que as ondas de luz espalhadas viajam até o detector varia em função do tempo. Ondas eletromagnéticas exibem

efeitos de interferência. As ondas espalhadas podem interferir construtivamente ou destrutivamente dependo da distância que viaja ao detector, resultando em uma intensidade média com flutuações sobrepostas.

Os tempos de decaimento das flutuações estão relacionados às constantes de difusão e, conseqüentemente, aos tamanhos das partículas. Partículas pequenas se movendo rapidamente causam um decaimento mais rápido das flutuações do que partículas grandes se movendo mais lentamente. Os tempos de decaimento destas flutuações podem ser determinados pela análise da freqüência (que usa um analisador de espectro) ou pela análise do tempo (que usa um correlator).

O correlator oferece geralmente o meio mais eficiente para este tipo de medida [Brookhaven, 1995]. Sua função de autocorrelação é formada pela média dos produtos das intensidades espalhadas medidas em pequenos intervalos de tempo, comparados com o tempo necessário para a flutuação voltar ou decair ao valor médio de intensidade espalhada.

Há um grande número de técnicas utilizadas para se medir o tamanho de uma partícula, mas a técnica que utiliza o espalhamento de luz oferece muito mais vantagens: versatilidade, velocidade, medição de pequenos tamanhos e medidas de tempo independente da densidade da partícula e total preservação de amostra. A técnica envolve a espectroscopia de correlação de fóton (PCS) de espalhamento quasi-elástico de luz (QELS) e se baseia nas flutuações da intensidade da luz espalhada. A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) envolve determinações da autocorrelação da flutuação de intensidade média de luz espalhada, devida ao movimento browniano das partículas na dispersão, em função do tempo. Como já foi dito, partículas pequenas se movem mais rápido e causam um decaimento mais acentuado das flutuações do que as partículas grandes. O coeficiente de difusão translacional (D) está relacionado ao raio hidrodinâmico médio (R) das partículas pela

equação de Stokes-Einstein. [Hanus & Ploehn, 1999].

A função de autocorrelação $g^{(2)}(t)$ é uma função do tempo. Seu decaimento está descrito por uma exponencial com constante de decaimento Γ_R sendo esta última proporcional ao coeficiente de difusão D_R da partícula.

$$g^{(2)}(t) = \sum_R G_R exp(-\Gamma_R 2) \qquad \text{Equação 1.7.1}$$

A partir da função de autocorrelação pode-se obter o coeficiente de difusão, o qual está relacionado ao raio hidrodinâmico R pela equação de Stokes-Einstein (equação 1.7.3):

$$\Gamma_R = K^2 D_R \qquad \text{Equação 1.7.2}$$

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R} \qquad \text{Equação 1.7.3}$$

onde K é a constante de Boltzmann, T temperatura absoluta, η viscosidade do solvente e R raio hidrodinâmico médio.

As partículas que estão dispersas num líquido freqüentemente têm carga elétrica na sua superfície. Os possíveis mecanismos de obtenção dessas cargas são a ionização, a adsorção de íons e a dissolução iônica. Se aplicarmos um campo elétrico nestas partículas, elas se moverão para o pólo positivo ou para o pólo negativo do campo aplicado, em um processo conhecido como eletroforese. O sentido que elas tomam é uma indicação do sinal da carga que carregam. A velocidade com que elas se movem é proporcional ao valor da carga. Assim nós necessitamos medir o sentido e a velocidade das partículas sob a influência de um campo elétrico conhecido, para que então possamos calcular a mobilidade eletroforética, que é o movimento da superfície carregada mais os íons a ela ligados, e o seu ζ com esses dados.

Ao se aplicar um campo pulsado de baixa intensidade em uma solução líquida contendo partículas carregadas, teremos essas partículas se movendo ora para um lado ora para outro, sem um deslocamento espacial bruto. Ao incidir um feixe de luz laser no líquido teremos o efeito de espalhamento de luz. A freqüência de luz espalhada que chega ao detector seria ajustada por efeito Doppler e teria um valor proporcional à velocidade das partículas, que por sua vez será proporcional à sua carga. Infelizmente na prática, essas mudanças de freqüência são da ordem de 100 Hz.

Lembrando-se que a freqüência do laser é da ordem de 10^{14} Hz, uma mudança de 10^{2} é completamente impossível de se detectar. Para contornar essa dificuldade, o aparelho se aproveita do fenômeno físico conhecido como *heterodyning ótico*, que envolve a criação de uma nova freqüência de onda resultante da união de duas ondas iniciais com freqüências distintas dentro de um sistema ótico não-linear.

Como mostra a Figura 1.7.1, uma parcela do feixe é desviada por um sistema ótico não linear, modulada a 250 Hz e combinada em um aglutinador com o feixe espalhado que emerge da amostra líquida.

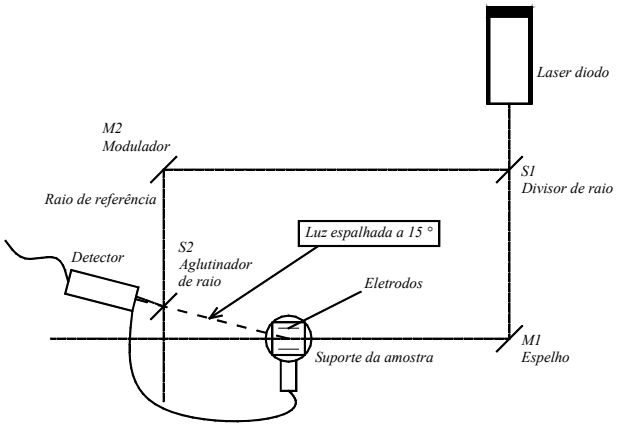


Figura 1.7.1 – Sistema óptico utilizado na medição do ζ.

O feixe resultante no aglutinador teria então freqüência proporcional aos 250 Hz do feixe referência. Conseqüentemente, na ausência de um campo elétrico, um espectro de

potência do sinal do detector teria um pico mais pronunciado em 250 Hz. Agora é fácil de detectar uma mudança de 100 Hz para 250 Hz.

A eletrônica-óptica está arranjada de tal modo que se o ajuste resultante for menor do que 250 Hz, o sinal do ζ é negativo e vice-versa [Brookhaven, 1997]. Esta propriedade física de todas as ondas é freqüentemente utilizada na eletrônica para produzir freqüências de onda baixas o suficiente mas que possam ser eficientemente processadas por aparelhos eletrônicos convencionais.

1.8 – Princípios básicos da fluorescência

Quando uma molécula absorve um fóton de luz, um elétron do orbital HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Verifica-se então, um relaxamento para o nível vibracional fundamental do estado excitado através da conversão interna (processo não radiativo) e, então, o retorno para o estado eletrônico fundamental com a emissão de luz, processo denominado *fluorescência*. A fluorescência é o processo de perda da energia de excitação através da emissão de radiação luminosa quando a molécula passa do estado excitado para o estado fundamental sem mudança de spin eletrônico. Este processo resulta de uma transição singleto-singleto.

Entretanto, existem vários outros processos que também contribuem para a perda de energia do estado excitado, como o *cruzamento intersistemas*: responsável pela fosforescência, resulta também da emissão de luz, porém, através de uma transição com mudança de spin eletrônico, como por exemplo, uma transição tripleto-singleto; a *conversão interna*: onde a energia de excitação é perdida por colisão do fluoróforo com o solvente; e a *supressão de fluorescência*: resultado da desativação do estado excitado devido às colisões das moléculas do fluoróforo no estado excitado com as moléculas do supressor ou de

formação de complexos com solutos moleculares capazes de reduzir o tempo de vida do estado excitado ou manter o complexo no estado fundamental provocando a supressão de fluorescência [Lakowicz, 1983].

1.8.1 – Introdução à espectroscopia de emissão de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência está estreitamente relacionada com a espectroscopia de absorção óptica. Vários fatores têm contribuído para que esta técnica seja muito utilizada, entre eles a possibilidade de se trabalhar com soluções extremamente diluídas (10^{-7} a 10^{-5} M). Também, a alta sensibilidade desta técnica é uma conseqüência do tempo relativamente longo (10^{-9} a 10^{-6} s) que uma molécula fluorescente permanece no estado excitado. A absorção óptica, por exemplo, é um processo que ocorre em um período relativamente curto, da ordem de 10^{-15} segundos, e nesta escala de tempo a molécula e o meio são efetivamente estáticos.

Durante o fenômeno da fluorescência onde a molécula permanece excitada em intervalos de tempo de μs a ns, vários processos podem ocorrer, como: reações de protonação e deprotonação, mudanças conformacionais em proteínas, reorientação do cromóforo, etc. A medida da intensidade da fluorescência permite a determinação qualitativa e quantitativa de traços de muitas espécies orgânicas e inorgânicas; é uma técnica muito útil principalmente para sistemas biológicos [Cantor, 1980; Lakowicz, 1983].

Devido a pouca disponibilidade de fluoróforos naturais, muitas das aplicações da técnica de fluorescência na bioquímica e na biofísica envolvem a adição de uma sonda fluorescente ao sistema. Estas sondas podem ser ligadas covalentemente ao sistema, como no caso do monosialogangliosídio GM1 marcado com pireno, e fornecer informações a respeito do microambiente em que a mesma se encontra ou servir como um marcador para dosagem de concentrações de GM1 em soluções muito diluídas, como no caso do presente trabalho de

incorporação em bicamadas lipídicas de PC.

Sondas de fluorescência têm sido usadas para fornecer informações sobre a formação de domínios hidrofóbicos [Damas et al., 1997; Fischer et al., 1998]. Como o espectro de fluorescência depende das propriedades físicas (como a polaridade, densidade, etc.) dos seus arredores, fluoróforos podem ser utilizados para sondar as características locais de soluções poliméricas. As intensidades de fluorescência para vários estados vibrônicos do monômero de pireno mostram uma forte dependência do solvente. A relação de intensidades entre os picos de seu espectro de fluorescência está altamente relacionada à polaridade do ambiente local da sonda [Kalyanasundaram & Thomas, 1977] e foi muito utilizada para investigar propriedades associativas de polímeros [Damas et al., 1997; Fischer et al., 1998].

O equipamento padrão utilizado para as medidas dos espectros de fluorescência é conhecido como fluorímetro. A luz de uma lâmpada de alta intensidade, tipicamente uma lâmpada de xenônio de alta pressão, é enviada a um monocromador (usualmente de grade) e focado sobre uma cubeta de quartzo (contendo a amostra). A luz fluorescente emitida ortogonalmente à direção da luz incidente é analisada por um segundo monocromador e então focada sobre uma fotomultiplicadora; subsequëntemente o sinal ou espectro é registrado ou gravado por algum dispositivo específico, ou usualmente enviado a uma interface com computador para uma melhor análise do mesmo.

1.8.2 – Espectros de excitação e emissão de fluorescência

A conversão interna entre os singletos de energia mais alta, tal como $S_3 \rightarrow S_1$ é muito mais rápida que a taxa de decaimento $S_1 \rightarrow S_0$. A relaxação vibracional dos níveis vibracionais excitados de cada estado eletrônico é mais rápida que a emissão do fóton. Portanto toda a fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$) observada é normalmente originária do nível

vibracional fundamental do singleto excitado.

Desta observação chega-se a algumas implicações importantes. O espectro de luz emitida deve ser independente do comprimento de onda de excitação. Todos os espectros de fluorescência estarão deslocados para comprimentos de onda maiores (menor energia) que a banda de absorção (deslocamento de Stokes) [Lakowicz, 1983]. A forma da banda de emissão será aproximadamente uma imagem especular da banda de absorção cujo máximo está centrado em comprimentos de onda maiores que o da banda de absorção.

Os espectros de fluorescência são obtidos pela excitação de uma amostra em um determinado comprimento de onda e variando-se o monocromador de emissão para se produzir um espectro de *emissão* (Figura 1.8.1), ou inversamente, fixando-se o monocromador de emissão e variando-se o monocromador de excitação para se produzir um espectro de *excitação*.

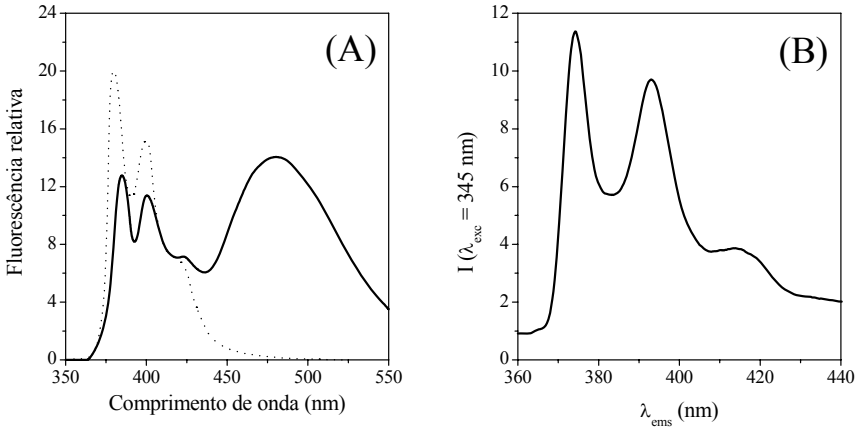


Figura 1.8.1 – Espectro de emissão de fluorescência do GM1Py: (A) em micelas puras de GM1Py (linha sólida) e bicamadas de PC (linha pontilhada) a 0,5 μM em água pura a 330 nm de excitação [Sonnino et al., 1986]; (B) em micelas de GM1 a 2 μM em água pura a 345 nm de excitação.

A presença de GM1Py (0,5 μM) em solvente aquoso é geralmente caracterizada por um pico de fluorescência em 480 nm de emissão para 330 nm de excitação [Picking et al., 1995]. Este pico reflete elevado grau de proximidade entre os grupos pirênicos contidos nas

caudas hidrocarbônicas dos gangliosídios, indicando que eles se encontram organizados na forma de micelas.

Em contrapartida, quando o GM1Py se encontra como monômero em solução etanólica, ocorre a perda do pico de 480 nm e uma elevação dos picos em 380 e 398 nm, um perfil espectral típico de grupos pirênicos que se encontram mais distantes entre si (Figura 1.8.1A). Este perfil também é encontrado quando o GM1Py se encontra incorporado em bicamadas de PC, e ele se assemelha à conversão de excímeros de moléculas de pireno à sua forma monomérica [Sonnino et al., 1986].

No presente estudo foram obtidos espectros de fluorescência para misturas micelares de GM1 e GM1Py semelhantes em perfil aos obtidos para essas moléculas incorporadas em bicamadas relatados na literatura. Isso é indicativo da ausência de formação de excímeros de GM1Py nestas micelas mistas, assim como nas bicamadas. Os picos máximos de emissão de fluorescência para as misturas de GM1 e GM1Py se encontram a 374 e 393 nm, com uma excitação de 345 nm (Figura 1.8.1B), que estão relacionados aos relatados pela literatura.

O espectro de excitação é geralmente determinado pela estrutura vibracional do primeiro estado excitado, desde que a excitação usualmente ocorra do mais baixo nível vibracional do estado fundamental S_0. O espectro de emissão, por outro lado, é determinado pela estrutura vibracional do estado fundamental, desde que a desexcitação da fluorescência usualmente ocorra do mais baixo nível vibracional do estado excitado. Como as estruturas vibracionais do estado fundamental e excitado são similares, os espectros de excitação e emissão deveriam idealmente ser imagens especulares entre si, com o espectro de emissão sendo deslocado para comprimento de onda maior. Na prática, uma perfeita simetria não é observada visto que a desexcitação muitas vezes ocorre por mecanismos não radiativos [Lakowicz, 1983].

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Reagentes e materiais

Ácido ascórbico p.a. – $C_6H_8O_6$ obtido da MERCK e utilizado para os experimentos de dosagem de fósforo inorgânico.

Ácido clorídrico p.a. – HCl obtido da MERCK e utilizado para ajuste de pH e padronização de titulantes.

Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico dihidratado (EDTA sal dissódico) – $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$ utilizado para a preparação das membranas celulósicas para diálise.

Ácido nítrico p.a. (65%) – HNO_3 obtido da MERCK e utilizado para preparação de solução titulante de $Hg(NO_3)_2$

Ácido perclórico p.a. – $HClO_4$ obtido da Cromato Produtos Químicos LTDA e utilizado para os experimentos de dosagem de fósforo inorgânico.

Água deionizada (Milli-Q) foi utilizada no preparo de todas as soluções utilizadas neste trabalho.

Albumina sérica bovina (BSA) – (97% puro) dessecado obtido da Sigma Chemical Co. para preparar soluções de padrão de proteína.

Anti-toxina da cólera (ACT) – desenvolvida em coelho através da toxina purificada do *Vibrio cholerae* como agente imunogênico, delipidizado, anti-soro total. Foi utilizada sem preparação prévia.

Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) – $C_{19}H_{42}NBr$ obtido da Aldrich Chemical Company e utilizado sem purificação prévia.

Brometo de dimetildioctadecilamônio (DODAB) – $C_{38}H_{80}NBr$ (99,9% puro) obtido da Sigma e utilizado sem purificação prévia.

Carbonato de sódio anidro – Na_2CO_3 obtido da Cinética Química Ltda. Foi utilizado nos experimentos de dosagem de proteína pelo método de Lowry.

Cloreto de potássio p.a. – KCl obtido da MERCK e utilizado para a preparação de soluções salinas de concentração 0,1 mM, 1 mM e 10 mM.

Cloreto de sódio p.a. – NaCl obtido da MERCK e utilizado para preparação de soluções salinas de 1M.

1,5-Difenilcarbazona – $C_{13}H_{12}N_4O$ obtido da MERCK foi utilizado como indicador sensível a íons mercúrio, com os quais forma complexo de cor violeta-azulada, nas reações de titulação de brometo.

Etanol – C_2H_5OH (86% puro) obtido da MERCK.

DL-α-Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) – $C_{40}H_{80}NO_8P$ (99% puro) obtido da Sigma como dessecado e utilizado sem purificações prévias.

L-α-Fosfatidilcolina (PC) – L-α-Lecitina Tipo XIII E extraída da gema de ovo (99% puro) obtido da Sigma como solução etanólica de 100 mg de PC por ml de etanol e utilizado sem purificações prévias. Figura 1.4.3.1.

Sódio dihidrogênio ortofosfato AR – $NaH_2PO_4.2H_2O$ obtido da Fisons Scientific e utilizado para preparar soluções de padrão fosfato.

Hidróxido de sódio p.a. – NaOH obtido da MERCK e utilizado para ajuste de pH e preparação de soluções alcalinas.

Membranas celulósicas fornecidas pela Sigma.

Monosialogangliosídio-GM1 (GM1) – extraído de cérebro bovino (95% puro) obtido da Sigma como liofilizado, foi diluído para 1 mg de GM1 por ml de etanol. Figura 1.4.3.1.

Monosialogangliosídio-GM1 marcado com pireno (GM1Py) – feito a partir de GM1 extraído de cérebro bovino e ácido 10-(1-pireno) decanóico (95% puro) obtido da Sigma liofilizado e posteriormente diluído para 0,1 mg de GM1Py por ml de etanol.

Molibdato de amônio – $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ obtido da MERCK e utilizado para os experimentos de dosagem de fósforo inorgânico.

Nitrato de mercúrio p.a. – $Hg(NO_3)_2$ obtido da MERCK foi utilizado para a preparação de solução titulante de 8,72 mM.

Partículas de poliestireno amidina (PSA) – foram obtidas da Interfacial Dynamics Corp. Estabilizadas eletrostaticamente por grupos amidina carregados positivamente.

Partículas de poliestireno sulfato (PSS) – foram obtidas da Interfacial Dynamics Corp. Estabilizadas eletrostaticamente por grupos sulfato carregados negativamente.

Partículas híbridas de polimetilmetacrilato e carboximetilcelulose (PMMA/CMC) – foram preparadas e cedidas pelo Laboratório de Filmes Poliméricos da Profa. Dra. Denise F. S. Petri, segundo procedimento de polimerização de emulsão com o surfactante catiônico CTAB [Castro et al., 2004] e utilizadas sem preparação prévia. Os D_z e ζ das partículas foram medidos por espalhamento de luz (ver *item 2.5*), sendo de 140 ± 0,5 nm e – 49 ± 1 mV respectivamente. O número médio de partículas (Np) foi calculado com base no diâmetro médio do particulado, no teor de sólido em 1 ml de preparação e na densidade do polímero 1 $g.cm^{-3}$. A área superficial específica das partículas foi calculada matematicamente com base

nestes valores.

Partículas de sílica hidrofílica (AEROSIL OX-50) – foram obtidas da Degussa S/A. A área superficial específica (SSA) foi determinada por titulação potenciométrica em meio de 20% de NaCl com NaOH 0.1 M [Sears, 1956] (ver *item 2.6*) e por adsorção de N_2 (BET) [Hiemenz, 1986; Brunauer et al., 1938; Rapuano, 2000]. As partículas utilizadas possuem área superficial específica de 47 m^2/g, em bom acordo com a área superficial específica fornecida pela Degussa S/A de 50 ± 15 m^2/g. A pequena diferença entre os valores de área superficial específica obtidos por titulação e o valor de área superficial específica fornecida pela Degussa S/A mostra a tendência dessas partículas agregarem. O diâmetro médio das partículas primárias (não agregadas) é de 40 nm segundo dados fornecidos pela Degussa S/A.

Reagente fenólico de Folin & Ciocalteu – obtido da Sigma e utilizado para os experimentos de dosagem de proteína pelo método de Lowry.

Sulfato cúprico pentahidratado – $CuSO_4.5H_2O$ (~99% puro) obtido da Sigma e utilizado para os experimentos de dosagem de proteína pelo método de Lowry.

Tartarato de sódio potássio tetrahidratado – $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ (99% puro) obtido da Sigma e utilizado para os experimentos de dosagem de proteína pelo método de Lowry.

Toxina da cólera (CT) – extraída do *Vibrio cholerae* (95% puro) obtida da Sigma. A toxina consiste de uma subunidade A (27 kDa) rodeada por cinco subunidades B (~12 kDa cada). Pó liofilizado a 10^5-10^6 unidades/mg de proteína, foi diluído em solução tampão de 10 mM TRIS-HCL e 140 mM NaCl a pH 7,4.

Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (TRIS-HCl) – $C_4H_{11}NO_3.HCl$ (99% puro) obtido da Sigma Chemical Company e utilizado para preparação de soluções tampão variadas.

2.2 – Equipamentos utilizados

Agitador magnético

Balança Analítica – com precisão de ± 0,0001 g

Bloco Térmico de Alumínio (Stuart). Utilizado para aquecimento de tubos de ensaio até 180 ºC nos experimentos de dosagem de fósforo.

Câmera digital (HP Photosmart 215).

Centrífugas – uma para eppendorfs de 2 mL e uma para tubos de vidro de 25 mL com velocidades de rotação de 0 a 14.000 rpm e 0 a 20.000 rpm respectivamente e temperaturas de –9 a 40 °C e –10 a 40 °C respectivamente.

Espectrofotômetro (Model Spectrascan 2800 CIBA-CORNING). Aparelho equipado com sistema ótico de feixe duplo de luz monocromática, com fontes de luz à base de deutério (200 nm a 350 nm) e iodeto de tungstênio (350 nm a 1100 nm) com ± 0.5 nm de precisão no comprimento de onda medido e precisão fotométrica de ± 0,005 Abs na escala de 0 a 1 Abs medidos. A reprodutibilidade fotométrica é de ± 0,001 Abs na escala de 0 a 0,5 Abs medidos; e de ± 0,002 Abs na escala de 0,5 a 1,0 Abs medidos.

Espectrofluorímetro (Hitachi F4500). Aparelho acoplado a um computador pessoal para processamento de dados. A fonte de luz é uma lâmpada de Xe de 150 W e o detector um tubo fotomultiplicador R928F. A fenda de excitação (excitation slit) foi ajustada em 2,5 nm e a de emissão (emission slit) em 5,0 nm. O comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi fixado em 345 nm (λ_{exc} do pireno) e a velocidade de varredura do espectro de emissão (Scan Speed) foi ajustada para 15 nm/min.

pHmetro (Corning pH meter 430). Precisão de pH ± 0,01; ± 1 mV; ± 1°C.

Sonicador (Lab-Line Ultra Tip Labsonic System – Modelo 150 com tip de titânio). Aparelho desenvolvido para romper, através da emissão de ondas sonoras de um ultra-tip, as paredes ou membranas celulares de células em experimentos microbiológicos. Aqui ele foi utilizado para formar vesículas e fragmentos de vesículas de anfifílicos pelo mesmo princípio de ultra-som.

ZetaPlus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, NY). Instrumento desenvolvido para o uso com suspensões de partículas ou soluções de macromoléculas. Tamanhos de 10 nm a 30 μm (dependendo da densidade da partícula) e potenciais-zeta de – 150 a + 150 mV podem ser medidos com uma precisão e repetibilidade de ± 2% em ambos os casos. A fonte de luz é um laser de estado sólido de 30 mW e ângulo de detecção de 90º. Os resultados são exibidos em valores modais ou distribuição de tamanho em uma interface Windows de fácil operabilidade.

2.3 – Preparação das soluções experimentais

2.3.1 – Agregados supramoleculares de anfifílicos

2.3.1.1 – Preparação de fragmentos de bicamadas de DODAB

A massa de DODAB calculada para uma concentração final desejada foi pesada em béquer de 50 ml, e sobre ela foram adicionados 50 ml do meio aquoso utilizado. Essa mistura foi então submetida ao ultra-som do sonicador por 15 minutos a uma potência média de 85 W. Terminada a sonicação, água é adicionada (q.s.p. 50 ml) para compensar possíveis perdas por evaporação durante o processo. Feito isso, a amostra é centrifugada em um tubo de vidro para centrífuga de 25 ml por 1 hora a 10.000 g, com o propósito de eliminar partículas residuais de titânio e eventuais vesículas multilamelares que podem ter se formado no processo.

2.3.1.2 – Preparação de vesículas unilamelares por injeção etanólica

Vesículas unilamelares pequenas de PC, DPPC ou mistas de DPPC e DODAB foram preparadas pelo método de injeção etanólica. Uma solução etanólica lipídica inicial de alta concentração é preparada a partir do lipídio original diluído em um volume calculado de etanol. No caso de vesículas de PC a solução etanólica é preparada a partir da solução original obtida do fabricante enquanto que para o DPPC e o DODAB a solução original é preparada pesando-se massas calculadas do anfifílico e diluindo em etanol. Geralmente a concentração inicial do lipídio etanólico é 20 vezes superior à concentração final desejada em meio aquoso. Vesículas mistas de DPPC/DODAB foram preparadas com a mistura de volumes específicos dos anfifílicos para a obtenção das proporções 1, 2, 5, 10 e 20% DODAB.

Uma alíquota da solução etanólica é injetada com uma microseringa de vidro em um béquer contendo um volume do meio aquoso a ser utilizado, água pura ou solução salina, para que a concentração de anfifílicos final desejada seja obtida. Este procedimento é feito com o uso de um agitador magnético sob baixa agitação, enquanto a solução etanólica é injetada cuidadosamente pelas paredes do recipiente para que as vesículas unilamelares fiquem pequenas evitando a formação de multilamelas e outros agregados. No caso do PC a injeção é efetuada à temperatura ambiente e no caso do DPPC ou de misturas de DPPC/DODAB ela é efetuada a 65 ºC, temperatura superior às temperaturas de transição de fase do DPPC e DODAB, para que ocorra a formação de vesículas unilamelares com tamanho pequeno. Após a injeção, o volume final é dialisado em membrana celulósica na presença do mesmo meio aquoso em questão por duas horas, havendo troca do meio após uma hora, para remover os traços de etanol e impedir a interdigitação das bicamadas [Batzri & Korn, 1973].

Após a diálise, as vesículas formadas são centrifugadas a 14.000 rpm e a 15 ºC por uma hora para remover possíveis vesículas multilamelares que tenham sido formadas. No

caso de vesículas puras de PC a dispersão pode ser armazenada a 4 ºC por dois dias antes de ocorrer agregação e formação de multilamelas, mas para vesículas puras de DPPC a dispersão deve ser utilizada no mesmo dia devido à alta instabilidade coloidal das vesículas. Já as vesículas mistas de DPPC/DODAB se mostraram surpreendentemente estáveis podendo ser utilizadas vários dias após preparo.

2.3.1.3 – Preparação de micelas de CTAB

O CTAB micelar foi preparado por diluição da massa calculada de CTAB original para uma concentração final desejada em volume do meio escolhido sob agitação constante, mas mediana, para impedir a formação de grandes volumes de espuma.

2.3.2 – Sílica coloidal

A massa de sílica calculada para uma concentração final desejada foi pesada em um béquer de 50 ml, e sobre ela foram adicionados 50 ml do meio aquoso a ser utilizado. Essa mistura foi então submetida ao ultra-som do sonicador por 15 minutos a uma potência média de 85 W. Terminada a sonicação, água é adicionada (q.s.p. 50 ml) para compensar possíveis perdas por evaporação durante o processo. As partículas de titânio depositadas não podem ser removidas por centrifugação devido a pouca diferença de tamanho entre elas e as partículas de sílica. Elas devem ser removidas da solução manualmente com o uso de uma pipeta de vidro após decantação [Moura, 2003].

2.4 – Determinações das concentrações dos anfifílicos nas dispersões

2.4.1 – Determinação da concentração de DODAB por microtitulação

Este método foi empregado para dispersões de DODAB em água pura e consiste numa microtitulação da solução em estudo com o titulante nitrato de mercúrio (II) [$Hg(NO_3)_2$] 0,872

mM utilizando-se como indicador a difenilcarbazona [Schales & Schales, 1941], tendo-se o cuidado de adicionar etanol absoluto à dispersão de bicamadas para garantir a completa solubilização do DODAB.

2.4.2 – Determinação da concentração de fosfolipídio por dosagem de fósforo inorgânico

O método da dosagem de fósforo inorgânico [Rouser et al., 1970] foi utilizado para determinar a concentração de PC ou DPPC presente nas dispersões vesiculares preparadas. Neste método alíquotas da solução problema de fosfolipídio (25, 50, 75 e 100 μl) e da solução padrão de NaH_2PO_4 1 mM (0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 μl) são colocados em tubos de ensaio reservados para dosagem de fosfato e então secos em estufa (100 ºC).

Após resfriamento, são adicionados 0,3 ml de ácido perclórico concentrado aos tubos, que são então transferidos aos blocos térmicos dentro de uma capela e aquecidos a 180 ºC por 1 hora, com os tubos tampados com esferas de vidro. Depois disso, espera-se resfriar e adiciona-se aos tubos 1 ml de água Milli-Q e 0,4 ml de molibdato de amônio, agitando-se em seguida. Após isso, adiciona-se 0,4 ml de ácido ascórbico e agita-se novamente. Em seguida, os tubos são colocados em banho de água fervente, fechados com as esferas de vidro, por 5 minutos, e depois levados para a medição da absorbância a 795 nm contra o ponto zero da curva padrão.

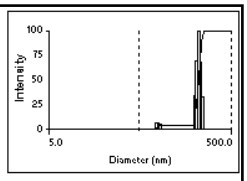
2.5 – Espalhamento de luz dinâmico

2.5.1 – Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (D_z)

Vesículas lipídicas e partículas coloidais foram dimensionadas com o uso da técnica PCS/QELS. Os parâmetros do aparelho devem estar dentro do recomendado pelo fabricante para que uma boa medida seja alcançada, como a ilustrada na Figura 2.5.1.1.

Silica 0.5mg/ml (Combined)

Effective Diameter: 208.2 nm
Polydispersity: 0.148
Avg. Count Rate: 1.0 Mcps
Sample Quality: 9.9/100.00%
Elapsed Time: 00:01:40



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Sample Quality
1	214.7	66.0	0.094	9.2/100.00%
2	210.8	99.0	0.221	9.3/100.00%
3	214.2	46.2	0.047	8.9/100.00%
4	198.2	92.3	0.217	8.7/100.00%
-- 5	213.8	71.2	0.111	8.4/100.00% --
-- 6	208.6	72.2	0.120	9.0/100.00% --
7	202.0	86.3	0.182	9.8/100.00%
-- 8	202.2	101.4	0.251	8.0/100.00% --
-- 9	211.8	92.0	0.189	9.4/100.00% --
-- 10	203.4	63.1	0.096	9.4/100.00% --
Mean	208.0	79.0	0.153	9.0/100.00%
Std. Error	1.9	5.7	0.021	0.2/ 0.00
Combined	208.2	80.2	0.148	9.9/100.00%

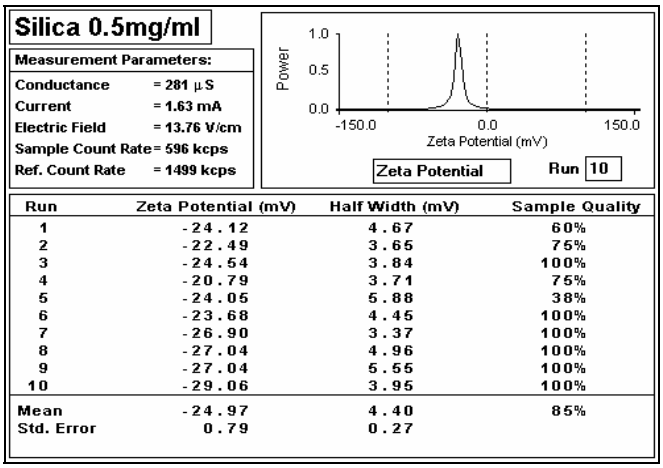
Figura 2.5.1.1 – Relatório de medição do D_z de partículas de sílica a 0.5 mg/ml em 1 mM de KCl obtido no ZetaPlus.

Cada relatório exibe uma série de medições consecutivas realizadas pelo aparelho ZetaPlus, onde com base nas medidas das intensidades espalhadas nos pequenos intervalos de tempo são calculados o diâmetro efetivo ou hidrodinâmico médio (D_z), a largura média da distribuição de partículas e a polidispersidade da dispersão coloidal.

A qualidade da amostra é estimada com base na intensidade do feixe detectado em comparação com a intensidade de um feixe de referência ('Avg. Count Rate' – Figura 2.5.1.1) e seu valor deve estar entre 1 – 2 Mcps para uma qualidade de 10,0/100,00%. O software do aparelho constrói um gráfico geral representando uma distribuição multimodal dos tamanhos de partículas como resultado, onde o eixo X do gráfico representa D_z em nanômetros de uma determinada população de partículas e o eixo Y a intensidade de luz medida para a respectiva população.

2.5.2 – Determinação do potencial-zeta (ζ)

A Figura 2.5.2.1 mostra um exemplo de medições de ζ feitas no ZetaPlus Zeta Potential Analyzer para partículas coloidais de sílica carregadas negativamente em 1 mM de KCl a 25 ºC.



Silica 0.5mg/ml

Measurement Parameters:	
Conductance	= 281 µS
Current	= 1.63 mA
Electric Field	= 13.76 V/cm
Sample Count Rate	= 596 kcps
Ref. Count Rate	= 1499 kcps

Run	Zeta Potential (mV)	Half Width (mV)	Sample Quality
1	-24.12	4.67	60%
2	-22.49	3.65	75%
3	-24.54	3.84	100%
4	-20.79	3.71	75%
5	-24.05	5.88	38%
6	-23.68	4.45	100%
7	-26.90	3.37	100%
8	-27.04	4.96	100%
9	-27.04	5.55	100%
10	-29.06	3.95	100%
Mean	-24.97	4.40	85%
Std. Error	0.79	0.27	

Figura 2.5.2.1 – Relatório padrão de medição do ζ de partículas de sílica em 1 mM de KCl obtido no ZetaPlus.

2.6 – Determinação da SSA da sílica coloidal por titulação potenciométrica

A área superficial específica (SSA) das partículas de sílica coloidal foi determinada pelo método da titulação potenciométrica [Sears Jr., 1956]. Uma solução de 50 ml contendo 1,5 g de sílica coloidal foi preparada em água pura. O pH dessa solução foi ajustado entre 3 e 3,5. A essa solução foram adicionadas 30 g de NaCl e o volume foi completado para 150 ml com água pura. O pH dessa solução foi então ajustado para pH 4 com NaOH. A amostra foi titulada até pH 9. O título é o volume necessário para tal, com o qual foi então calculada a área superficial em m^2/g pela fórmula:

$$SSA = 32.V - 25 \qquad \text{Equação 2.6.1}$$

O valor de SSA para a sílica utilizada foi determinado como sendo de $47 \pm 2\ m^2/g$.

2.7 – Interação entre agregados anfifílicos e as partículas coloidais

A interação entre as vesículas de PC, DPPC ou DPPC/DODAB e as partículas de sílica foi induzida pela adição das dispersão de anfifílicos às partículas em tubos de ensaio ou eppendorfs fechados, seguida de agitação por alguns minutos. Essas interações foram executadas todas à temperatura ambiente (25 °C).

2.7.1 – Caracterização da adsorção de fosfolipídios sobre a sílica

2.7.1.1 – Determinação do efeito da força iônica sobre a adsorção.

Objetivo: determinação da condição experimental para obtenção de uma deposição ótima de bicamada sobre a superfície da sílica hidrofílica.

- Preparação de soluções mãe de vesículas de PC ou DPPC nos respectivos meios;
- preparação de solução mãe de sílica coloidal nas mesmas soluções em que foram preparadas as vesículas;
- misturas de alíquotas das soluções mãe de vesícula e sílica para a obtenção de concentrações finais crescentes de lipídio em uma mesma concentração final de sílica (1 mg/ml). Sendo a área superficial específica da sílica 47 m^2/g, e o volume de cada amostra 1 ml, a área superficial total de sílica por tubo é de 0,047 m^2;
- interação das misturas por 1 hora à temperatura ambiente seguida de centrifugação das amostras a 14.000 rpm por uma hora a 25 ºC e retirada do sobrenadante para determinação da concentração de fosfato.

2.7.1.2 – Determinação da estabilidade coloidal por sedimentação

Objetivo: verificar o grau de estabilidade coloidal da dispersão de sílica em função da concentração de anfifílico, da força iônica, do pH ou da % DODAB com o uso de imagens fotográficas.

- Variação da força iônica e do pH: 0 – 150 mM de NaCl a pH 6,3 e 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4.
- Variação da concentração de PC: 0,01 – 0,7 mM; e DPPC/DODAB: 0 – 1,0 mM.

- Variação da % DODAB: 0 – 20% DODAB;
- todos os tubos de interação continham 1 mg/ml de sílica coloidal preparada nos respectivos meios salinos.

A interação foi realizada através da adição das vesículas à sílica nos respectivos meios salinos e depois de determinados períodos de interação em repouso foram tiradas fotos digitais das séries de tubos.

2.7.1.3 – Determinação da estabilidade coloidal por medição dos D_z e ζ

Objetivo: verificar o grau de estabilidade coloidal do particulado de sílica em função da concentração de anfifílico, da força iônica ou da % DODAB por espalhamento de luz.

- Preparação dos particulados de sílica, vesículas de PC, DPPC e vesículas mistas de DPPC/DODAB nos respectivos meios;
- interação da sílica coloidal com as vesículas por adição de alíquotas calculadas para concentrações finais de sílica de 0,1 mg/ml e concentrações crescentes de anfifílico (0,025 – 1 mM);
- após uma hora de interação em repouso à temperatura ambiente, as soluções foram levadas para a medição dos seus valores de D_z ou ζ no ZetaPlus.

2.7.1.4 – Determinação do efeito da proporção molar DPPC/DODAB sobre a adsorção.

Objetivo: otimização da adsorção de bicamadas neutras de DPPC sobre a sílica com o uso de DODAB.

- Preparação de soluções mãe de vesículas mistas de DPPC/DODAB em 1 mM de NaCl a pH 6,3 nas diferentes proporções molares: 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB.

- preparação de solução mãe de sílica coloidal em 1mM de NaCl a pH 6,3;

- misturas de alíquotas das soluções mãe de vesícula e sílica para a obtenção de concentrações finais crescentes de anfifílico em uma mesma concentração final de sílica (1 mg/ml). Sendo a área superficial específica da sílica 47 m^2/g, e o volume de cada amostra 1 ml, a área superficial total de sílica por tubo é de 0,047 m^2;

- interação das misturas por 1 hora à temperatura ambiente seguida de centrifugação das amostras a 14.000 rpm por uma hora a 25 ºC e retirada do sobrenadante para determinação da concentração de fosfato.

2.7.2 – Adsorção de PC e DODAB sob o ponto de vista da preparação

Objetivo: verificação da eficiência de adsorção dos anfifílicos PC e DODAB sobre a superfície da sílica, do PSS e do PSA através da comparação de dois métodos diferentes de preparação das misturas finais:

1) Injeção de solução etanólica nos particulados: neste método, uma alíquota calculada das soluções etanólicas de $PC_{mãe}$ ou $DODAB_{mãe}$ foi diretamente injetada em um volume determinado de solução coloidal dos particulados de sílica, PSS ou PSA em água pura. As concentrações finais PC_{final} e $DODAB_{final}$ foram ajustadas para 1 mM. A concentração final de sílica foi ajustada em 0,1 mg/ml e o número de partículas das dispersões de látex em $2{,}59.10^{12}$ ppml. A injeção foi feita com uma microseringa sob agitação moderada a 25 °C para o PC e a 50 ºC para o DODAB durante 10 minutos.

2) Adição de dispersão aquosa aos particulados: neste método, as alíquotas eram de vesículas de PC e bicamadas de DODAB já previamente preparadas em água pura. Foram então simplesmente adicionadas às alíquotas equivalentes de dispersões de sílica, PSS ou PSA para todas as concentrações finais iguais às do item anterior.

- Após essas preparações, as amostras foram deixadas para interagir por duas horas em repouso à temperatura ambiente seguidas das leituras dos D_z e ζ dos particulados obtidos.

2.7.3 – Adsorção de CTAB sobre particulados de sílica

Objetivo: comparar a adsorção de um monoalquil catiônico com os derivados dialquil (como o DODAB) à superfície da sílica.

Um volume calculado de uma solução aquosa de CTAB micelar foi adicionado à sílica coloidal para obter as concentrações finais de 1 mM ou 0,1 mM para o CTAB e 0,1 mg/ml para a sílica, em água pura. A interação foi de uma hora e à temperatura ambiente. Ao final os valores de D_z e ζ dos particulados finais foram medidos.

2.8 – Incorporação de GM1 em microesferas de sílica recobertas com PC

Tendo completado a análise da adsorção de bicamadas lipídicas na superfície da sílica coloidal na presença de força iônica e pH fisiológicos, foram então iniciados es estudos de incorporação do receptor GM1 nas bicamadas adsorvidas de PC na superfície das partículas de sílica. A incorporação do GM1 nas bicamadas lipídicas foi acompanhada através do uso de concentrações traço de GM1Py à solução final de GM1. A mistura GM1-GM1Py foi chamada de GM1*.

A incorporação foi realizada por adição simples da solução salina de GM1* em uma

solução já preparada de adsorvente-adsorbato (PC-sílica) nas mesmas condições salinas e deixado para interagir por 30 minutos à temperatura ambiente.

2.8.1 – Efeito da concentração inicial de PC e sílica na incorporação de GM1

Objetivo: verificar o efeito da concentração adicionada de PC ou de sílica sobre a eficiência em porcentagem de incorporação do GM1 nas bicamadas adsorvidas.

- Preparação das soluções mãe de sílica e de PC em 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4;
- interação de 1 mg/ml de sílica com concentrações crescentes de PC (0 – 1,0 mM);
- interações de 0,3 mM de PC com concentrações crescentes de sílica (0 – 2 mg/ml). Os controles devem ser preparados sem a adição de PC ou de sílica como indicado pela Tabela 2.8;
- preparação de GM1* com 7% de GM1Py: foi inicialmente preparada uma solução etanólica de GM1-GM1Py 7% através da adição de 93 μl de $GM1_{original}$ (1 mg/ml) a 70 μl de $GM1Py_{original}$ (0,1 mg/ml). Desta solução etanólica foi retirada alíquota de 55,4 μl e diluída em meio salino de 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 até o volume final de 5,5 ml;
- adição do GM1* às partículas de PC-sílica para concentração final de $GM1_{total}$ (GM1 + GM1Py) de 0,5 μM, e interação por 30 minutos à temperatura ambiente;
- centrifugação das amostras por uma hora a 14.000 rpm e 25 °C para separar o GM1 incorporado ao complexo PC-sílica do GM1 que permaneceu em solução;

- remover o sobrenadante e ler sua intensidade máxima de emissão para a excitação fixa de 345 nm. As cubetas utilizadas foram as de quartzo com quatro faces com capacidade para 1 ml de solução.

A intensidade de fluorescência do GM1 total presente no sobrenadante do controle (I_{total}) menos a intensidade presente no sobrenadante da amostra ($I_{sobrenadante}$) dividido pela intensidade total do controle (I_{total}) foi usada para determinar o GM1 incorporado nas partículas de sílica, ou seja, foi calculada uma fração de incorporação do GM1 total às partículas (I_p) que foi dada por:

$$I_p = (I_{total} - I_{sobrenadante})/I_{total} \qquad \text{Equação 2.8.1.1}$$

Tabela 2.8 – Protocolos de interação de vesículas de PC com partículas de sílica seguida de incorporação de GM1*. A incorporação é calculada segundo a Equação 2.8.1.1.

Concentração fixa de sílica

Nº	$V_{sílica}$ (ml) $C_{inicial}$ = 4	$C_{fin.\ Sílica}$ (mg/ml)	$V_{vesícula}$ (ml) $C_{inicial}$ = 1,45	$C_{fin.\ PC}$ (mM)	R	V_{GM1*} (ml) $C_{inicial}$ = 4	V_{TRIS} (ml)
1	0,250	1,000	0,0769	0,1115	0,500	0,125	0,5481
controle	0,000		0,0769	0,1115		0,125	0,7981
2	0,250	1,000	0,1154	0,1673	0,750	0,125	0,5096
controle	0,000		0,1154	0,1673		0,125	0,7596
3	0,250	1,000	0,1538	0,2231	1,000	0,125	0,4712
controle	0,000		0,1538	0,2231		0,125	0,7212
4	0,250	1,000	0,1923	0,2788	1,250	0,125	0,4327
controle	0,000		0,1923	0,2788		0,125	0,6827
5	0,250	1,000	0,2308	0,3346	1,500	0,125	0,3942
controle	0,000		0,2308	0,3346		0,125	0,6442
6	0,250	1,000	0,2692	0,3904	1,750	0,125	0,3558
controle	0,000		0,2692	0,3904		0,125	0,6058
7	0,250	1,000	0,3077	0,4461	2,000	0,125	0,3173
controle	0,000		0,3077	0,4461		0,125	0,5673
8	0,250	1,000	0,3461	0,5019	2,250	0,125	0,2789
controle	0,000		0,3461	0,5019		0,125	0,5289
9	0,250	1,000	0,3846	0,5577	2,500	0,125	0,2404
controle	0,000		0,3846	0,5577		0,125	0,4904
10	0,250	1,000	0,4231	0,6134	2,750	0,125	0,2019
controle	0,000		0,4231	0,6134		0,125	0,4519
11	0,250	1,000	0,4615	0,6692	3,000	0,125	0,1635
controle	0,000		0,4615	0,6692		0,125	0,4135
12	0,250	1,000	0,6154	0,8923	4,000	0,125	0,0096
controle	0,000		0,6154	0,8923		0,125	0,2596

Concentração fixa de PC

Nº	$V_{sílica}$ (ml) $C_{inicial}$ = 4	$C_{fin.\ Sílica}$ (mg/ml)	$V_{vesícula}$ (ml) $C_{inicial}$ = 1,45	$C_{fin.\ PC}$ (mM)	R	V_{GM1*} (ml) $C_{inicial}$ = 4	V_{TRIS} (ml)
1	0,420	1,681	0,2069	0,3000	0,800	0,125	0,2478
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
2	0,374	1,494	0,2069	0,3000	0,900	0,125	0,2945
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
3	0,336	1,345	0,2069	0,3000	1,000	0,125	0,3319
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
4	0,306	1,223	0,2069	0,3000	1,100	0,125	0,3624
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
5	0,280	1,121	0,2069	0,3000	1,200	0,125	0,3879
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
6	0,259	1,035	0,2069	0,3000	1,300	0,125	0,4095
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
7	0,240	0,961	0,2069	0,3000	1,400	0,125	0,4279
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
8	0,224	0,897	0,2069	0,3000	1,500	0,125	0,4440
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
9	0,210	0,841	0,2069	0,3000	1,600	0,125	0,4580
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
10	0,198	0,791	0,2069	0,3000	1,700	0,125	0,4703
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
11	0,187	0,747	0,2069	0,3000	1,800	0,125	0,4813
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681
12	0,177	0,708	0,2069	0,3000	1,900	0,125	0,4911
controle	0,000		0,2069	0,3000		0,125	0,6681

2.9 – Determinação da concentração de proteína pelo método de Lowry

Em seqüência ao estudo da incorporação de GM1 nas partículas biomiméticas, foram iniciados os experimentos de interação com a toxina da cólera (CT). O grau de ligação da toxina sobre as partículas foi avaliado com a utilização da mesma metodologia aplicada a isotermas de adsorção onde se fixa a concentração da superfície adsorvente e varia a

concentração do soluto adsorbato. A concentração de proteína livre no sobrenadante foi então analisada pelo método de Lowry.

Neste método, 200 μl da solução problema de proteína e das soluções padrão de BSA (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μg de BSA, preparadas no mesmo meio que a solução problema) são separados em tubos eppendorf. Adiciona-se a cada tubo 1 ml de solução alcalina de cobre (10 ml de 2% Na_2CO_3 em NaOH 0,1N e 0,2 ml de 0,5% $CuSO_4.5H_2O$ e 1% tartarato de sódio e potássio em água) agitando-se em seguida e deixando reagir por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois adiciona-se a cada tubo 0,1 ml de reagente de Folin diluído 1: 2 em água, agitando imediatamente em seguida. Após 30 minutos de reação à temperatura ambiente a absorbância das amostras é medida a 750 nm.

2.9.1 – Determinação do grau de ligação de CT ao GM1 incorporado

Objetivo: determinar o grau de ligação de CT às partículas biomiméticas incorporadas com o receptor GM1.

- Preparação das soluções mãe de sílica, de PC e de GM1 em 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4;
- interação de 1 mg/ml de sílica com 0,3 mM de PC em 10 tubos eppendorf em 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4. Interagir por 1 hora a 25 ºC;
- adicionar alíquotas da solução mãe de GM1 para se obter a concentração final de 5 μM aos tubos contendo as partículas biomiméticas. Interagir por 30 minutos a 25 ºC;
- adicionar as alíquotas da solução original de CT 0,5 mg/ml de 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4, aos 10 tubos contendo as partículas biomiméticas

incorporadas com o GM1 para obter as concentrações crescentes de toxina (20 – 200 μg/ml) segundo o protocolo da Tabela 2.9. Interagir por 1 hora a 25 ºC;

- centrifugar a 14.000 rpm por 1 hora para separar a toxina ligada da não ligada;
- retirar 200 μl do sobrenadante de cada tubo e dosar o conteúdo de proteína pelo método de Lowry.

A Tabela 2.9 mostra os protocolos para a interação de partículas biomiméticas incorporadas com GM1 com CT. O grau de ligação de toxina é calculado pela concentração de toxina adicionada contra a concentração de toxina medida no sobrenadante.

Tabela 2.9 – Protocolo de interação de vesículas de PC, partículas de sílica, micelas de GM1 e moléculas de CT.

Cvesc.sil x I Vamostra = 0,25 ml área superficial da sílica 47 m^2/g

Nº	Vsílica (ml) Cin. = 10	Cfin. Sílica (mg/ml)	VPC (ml) Cin. = 1,6	Cfin. PC (mM)	VGM_1 (ml) Cin. = 30	Cfin. GM_1 (μM)	Vtoxina (ml) Cin. = 500	Toxina $_{adic.}$ (mg)	VTRIS (ml)
1	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,010	5,0	0,1265
2	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,020	10,0	0,1165
3	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,030	15,0	0,1065
4	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,040	20,0	0,0965
5	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,050	25,0	0,0865
6	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,060	30,0	0,0765
7	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,070	35,0	0,0665
8	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,080	40,0	0,0565
9	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,090	45,0	0,0465
10	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,042	5,000	0,100	50,0	0,0365
C1	0,025	1,000	0,0000	0,0000	0,000	0,000	0,060	30,0	0,1650
C2	0,025	1,000	0,0469	0,3000	0,000	0,000	0,060	30,0	0,1181

2.10 – Determinação da concentração de proteína por absorbância no UV

O método de dosagem de proteína por absorbância no ultra-violeta foi utilizado para dosagem das concentrações de ACT nas amostras utilizadas. Foram empregadas partículas de PMMA/CMC, preparadas como descrito por Castro *et al.* [Castro et al., 2004], para imobilização das moléculas de ATC. Isotermas de adsorção foram realizadas com concentrações fixas de partícula e a absorbância a 280 nm da proteína no sobrenadante foi dosada diretamente para cada amostra em cubetas de quartzo. O BSA foi utilizado para a construção da curva padrão, e as isotermas foram calculadas com base no número de

partículas (Np) determinado para cada preparação de PMMA/CMC.

2.10.1 – Determinação da adsorção de ACT às partículas poliméricas

Objetivo: determinar a afinidade e o grau de adsorção de ACT pela superfície das partículas de PMMA/CMC.

- Preparação das soluções mãe de PMMA/CMC e de ACT em 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4;
- adicionar as alíquotas da solução mãe de ACT aos 7 tubos contendo as partículas em tampão com Np fixo, para obter as concentrações crescentes de ACT (50 – 2500 μg/ml) segundo o protocoloflçl da Tabela 2.10. Interagir por 1 hora a 25 ºC;
- centrifugar a 14.000 rpm por 1 hora para separar a ACT ligada da não ligada;
- ler a absorbância do sobrenadante a 278 nm em cubetas de quartzo.

Tabela 2.10 – Protocolo de interação de partículas de PMMA/CMC com moléculas de ACT.

Nº	Vpart. (ml) Cin. = 0.316	Cfin. partic. (E^{11}/ml)	Vanti-tox. (ml) Cin. = 9740	Anti-tox.$_{adic.}$ (μg)	VTRIS (ml)
1	0.500	0.079	0.010	97.4	1.490
2	0.500	0.079	0.025	243.5	1.475
3	0.500	0.079	0.050	487.0	1.450
4	0.500	0.079	0.075	730.5	1.425
5	0.500	0.079	0.100	974.0	1.400
6	0.500	0.079	0.250	2435.0	1.250
7	0.500	0.079	0.500	4870.0	1.000
C1	0.500	0.079	0.000	0.0	1.500
C2	0.000	0.000	0.100	974.0	1.900

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Deposição de PC sobre a superfície de sílica.

3.1.1 – Efeito da força iônica na adsorção.

A Figura 3.1.1.1 mostra isotermas de adsorção típicas para vesículas pequenas de PC sobre partículas de sílica em seis diferentes condições experimentais: 0,1, 1, 10, 100, 150 mM de força iônica a pH 6,3 e 150 mM a pH 7,4.

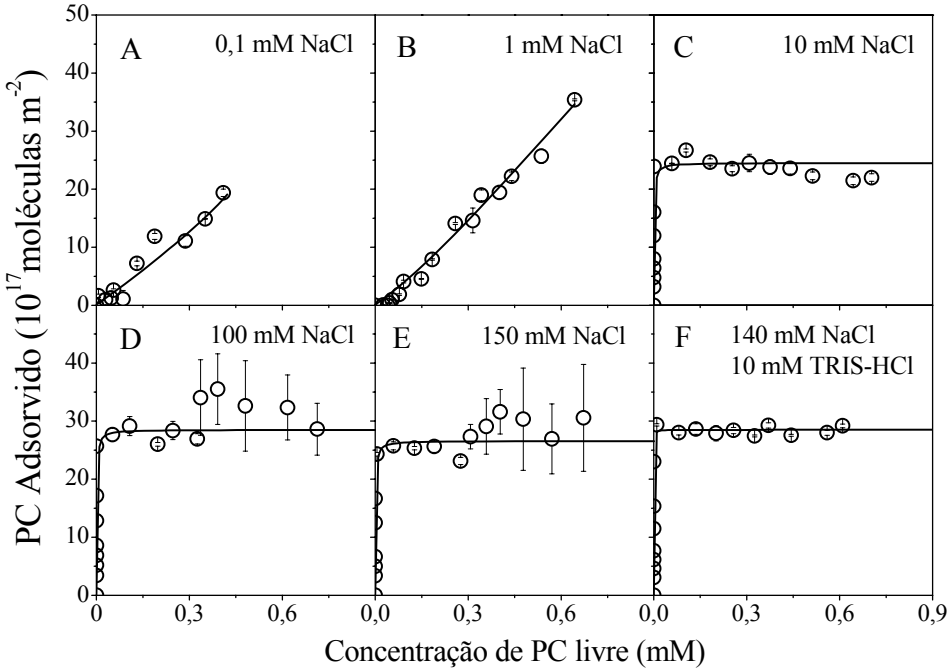


Figura 3.1.1.1 – Isotermas de adsorção de PC a partir de vesículas pequenas sobre sílica hidrofílica (1 mg/ml) com 0,1 (A), 1 (B), 10 (C), 100 (D), 150 mM de NaCl (E) a pH 6,3 e 140 mM de NaCl com 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 em (F), todas feitas a 25 ºC e em interações de uma hora.

A baixas forças iônicas (Figura 3.1.1.1A e B) a adsorção de PC na superfície da sílica foi de baixa afinidade. Em valores de força iônica mais elevados (Figura 3.1.1.1C – F) a adsorção se mostrou de alta afinidade com um platô máximo atingido por volta de 28.10^{17} moléculas de PC adsorvidas por metro quadrado de sílica (Tabela 3.1). De fato, a deposição teoricamente calculada de uma bicamada de PC sobre a superfície de sílica deveria resultar em uma adsorção de $28{,}57.10^{17}$ moléculas de PC por metro quadrado de sílica, valor obtido

através da área ótima da cabeça polar a_0 = 0,7 nm^2 da fosfatidilcolina [Rapuano & Carmona-Ribeiro, 1997], confirmando o valor obtido experimentalmente. A Tabela 3.1 mostra valores máximos de adsorção $(x/m)_{máx}$ e constantes de afinidade *k* entre o PC e a sílica, obtidos através da linearização das isotermas de adsorção da Figura 3.1.1.1C – F [Jackson et al., 1986] seguindo a equação:

$$\frac{c}{x/m} = \frac{c}{(x/m)_{máx}} + \frac{1}{k(x/m)_{máx}} \qquad \text{Equação 3.1.1.1}$$

onde *x/m* é o número de moles de anfifílico adsorvidos em *m* metros quadrados de sílica, *c* é a concentração de anfifílico no sobrenadante e *k* é a constante de afinidade entre o anfifílico e a sílica [Jackson et al., 1986]. A partir do gráfico de *c*/(*x*/*m*) versus *c* (Figura 3.1.1.2) podemos obter a adsorção máxima ($(x/m)_{máx}$) pelo coeficiente angular (B) e a constante de afinidade (*k*) pelo coeficiente linear (A) da reta.

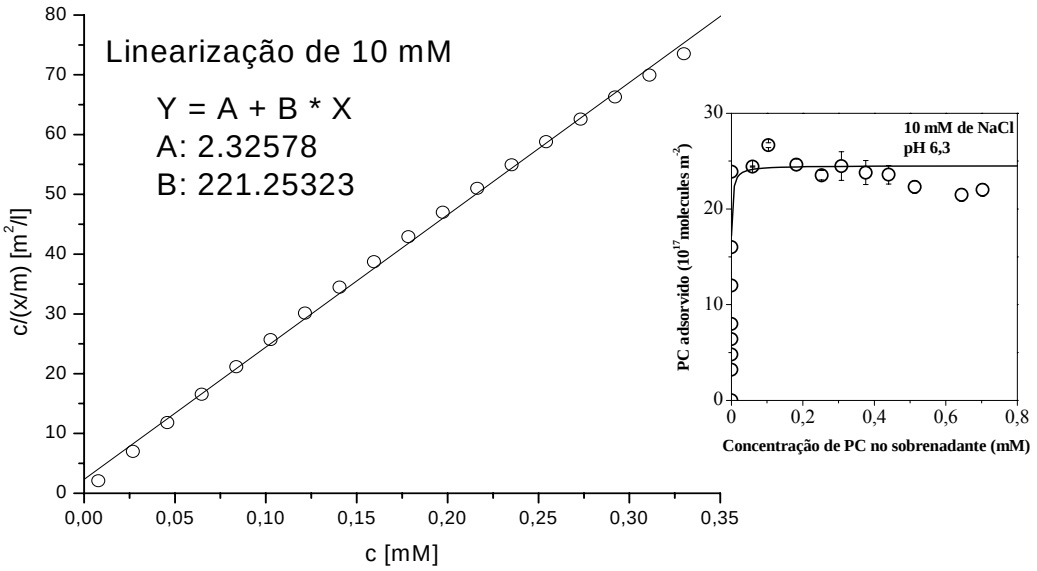


Figura 3.1.1.2 – Linearização de uma isoterma de adsorção que obedece ao modelo Langmuir (isoterma da Figura 3.1.1.1C, exibida no gráfico menor).

A Tabela 3.1 mostra os valores de *k* e $(x/m)_{máx}$ obtidos a partir das linearizações das isotermas de adsorção realizadas neste estudo e mostradas na Figura 3.1.1.1.

Tabela 3.1 – Efeito da força iônica nos parâmetros de adsorção de PC a partir de vesículas sobre a sílica (1 mg/ml). Os parâmetros *k* e $(x/m)_{máx}$ foram calculados das isotermas de adsorção da Figura 3.1.1.1.

Força iônica	pH	Constante de afinidade *k* (10^3 M^{-1})	Máximo de adsorção $(x/m)_{máx}$ (moléculas/m^2)
10 mM NaCl	6,3	95	27,21E+17
100 mM NaCl	6,3	387	29,93E+17
150 mM NaCl	6,3	2594	25,79E+17
140 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl	7,4	21.121	28,50E+17

A elevação da força iônica, de 10 a 150 mM, e do pH, de 6,3 a 7,4, resulta na elevação dos valores de *k*, tornando clara a influência da polaridade do meio e conseqüentemente das forças de van de Waals, pois estas dependem daquela [Mahanty & Ninham, 1976], na atração entre bicamadas de PC e a superfície da sílica. A proximidade entre os valores de $(x/m)_{máx}$ nas forças iônicas em questão, indica que mesmo com a elevação das forças de van der Waals atuando no sistema, não ocorre uma super-deposição do adsorbato na superfície do adsorvente. Logo, o PC se encontra na forma de uma bicamada envolvendo toda a superfície da sílica, um arranjo comprovado por imagens de microscopia crio-eletrônica recentemente relatadas na literatura para diversas vesículas lipídicas e partículas de sílica [Mornet et al., 2005].

Tabela 3.2 – Constantes de afinidade e adsorção máxima, obtidas por linearizações de isotermas realizadas em pesquisas de anos anteriores [Rapuano, 2000], na adsorção de vesículas de PC sobre a sílica hidrofílica, em tampão TRIS-HCl 10 mM e pH 7.4.

Vesícula	Temperatura (ºC)	Constante de afinidade *k* (10^3 M^{-1})	Máximo de adsorção $(x/m)_{máx}$ (moléculas/m^2)	$n_{bicamadas}$
PC	25	20	32,4E+17	28,6
DODAB	42	632	45,4E+17	33,3

A Tabela 3.2 mostra os valores de *k* e $(x/m)_{máx}$ obtidas pelas linearizações das isotermas de adsorção do PC e DODAB sobre a sílica hidrofílica, realizadas em pesquisas anteriores [Rapuano, 2000] em 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4. O valor para a adsorção

esperada para deposição de uma única bicamada ($n_{bicamada}$) também é mostrado.

A partir das Tabelas 3.1 e 3.2 pode-se fazer uma avaliação mais precisa do fenômeno de adsorção de bicamadas de PC sobre a superfície da sílica. Em primeiro lugar, deve-se perceber que para forças iônicas de 10 mM (de NaCl em 3.1 nos experimentos recentes ou de TRIS-HCl em 3.2 nos experimentos antigos), a afinidade se mostrou muito maior nos experimentos realizados mais recentemente. Tal observação faz sentido visto que nos experimentos de interação entre particulados de sílica hidrofílica e anfifílicos formadores de bicamadas realizados por estudantes em anos anteriores, a preparação coloidal da sílica não era realizada através da sonicação da massa pesada em meio aquoso (ver *item 2.3.2*). Ao invés disso, a massa pesada era adicionada ao meio aquoso a ser utilizado e agitado até a obtenção de um sistema estável.

O problema é que os particulados de sílica sofrem um elevado grau de agregação com o tempo, como mostrado na Figura 1.5.2.2, e o simples processo de agitação não é suficiente para colocar a dispersão de sílica em estado coloidal estável, o que acarretava na rápida precipitação de grande parte da massa adicionada à solução. Nem mesmo o processo de sonicação é capaz de evitar isso, entretanto este último se provou mais eficiente em colocar as partículas em estado coloidal suficientemente estável, sem sedimentações nos intervalos de tempos utilizados em nossos experimentos.

Em segundo lugar, deve-se perceber a elevação da constante de afinidade *k* do PC de 95.10^3 M^{-1} em 10 mM de força iônica, para $21.121.10^3$ M^{-1} em 150 mM a pH 7,4 (Figura 3.1.1.1) na Tabela 3.1. Tais valores de afinidade com a sílica nunca haviam sido alcançados para o PC em nosso laboratório, mas com a elevação da força iônica do meio foi possível obter esses resultados, que se mostraram até maiores que a adsorção de DODAB na sílica como visto pela Tabela 3.2. É importante também notar na Tabela 3.1 que as adsorções

máximas $(x/m)_{máx}$ de moléculas de PC na sílica se encontram por volta do valor de adsorção esperado para uma única bicamada de PC adsorvida em um metro quadrado.

O tipo de adsorção observado na Figura 3.1.1.1 para forças iônicas acima de 10 mM é indicativo de alta afinidade e estabilidade da bicamada adsorvida nas faixas de concentração de PC e força iônica estudadas. Isso em comparação com a desorção de bicamadas obtida em trabalhos anteriores onde o estudo da adsorção de bicamadas de DODAB sobre partículas de sílica apresentou isotermas de adsorção com uma forma que é típica de adsorção competitiva [Moura & Carmona-Ribeiro, 2003], levando a um pico máximo seguida de uma queda na adsorção. Essa queda representa a remoção de bicamadas adsorvidas promovida por vesículas em excesso presentes na mistura.

3.1.2 – Efeito da força iônica na estabilidade coloidal das misturas.

A Figura 3.1.2.1 exibe imagens fotográficas de amostras de sílica ou de misturas de sílica e PC.

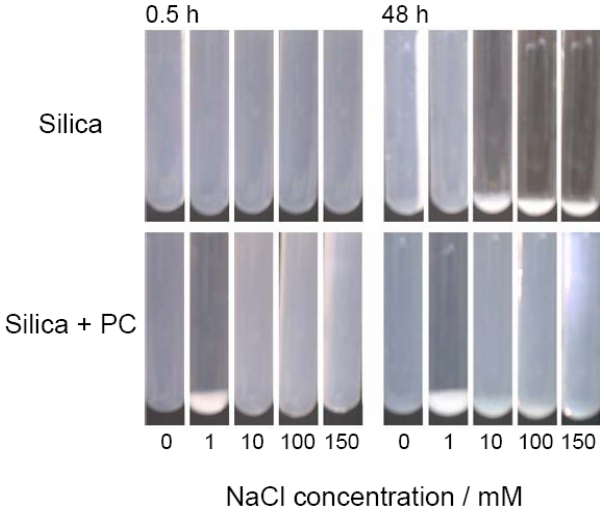


Figura 3.1.2.1 – Misturas de partículas de sílica com vesículas de PC em tubos de interação a 1 mg/ml de sílica, 0,3 mM de PC, pH 6,3, 25 ºC e 0,5 ou 48 horas de tempo de interação após agitação, em uma faixa de concentração de NaCl. As fotos superiores mostram os respectivos controles de sílica sem vesículas de PC.

As concentrações de sílica a 1 mg/ml e PC a 0,3 mM utilizadas no experimento, resultam em uma relação de áreas **R** entre bicamadas e sílica igual a 1,3, calculada pela Equação 3.1.2.1:

$$R = \frac{A_b}{A_s} = \frac{C_{PC} \cdot 6.02 \cdot 10^{23} \cdot 0.7}{C_{sílica} \cdot 2 \cdot 47 \cdot 10^{18}} \qquad \text{Equação 3.1.2.1}$$

onde C_{PC} é a concentração de PC em molar e $C_{sílica}$ a concentração de sílica em mg/ml. Sendo 47 o valor da SSA da sílica em m^2/g calculado por titulação potenciométrica (ver *item 2.6*).

Esse valor de R se encontra um pouco acima do ponto de equivalência entre áreas R = 1, em que a área superficial de sílica exposta é igual à área superficial de bicamadas disponíveis. Isso quer dizer que a concentração de PC que interagiu com a sílica é levemente superior à necessária para a formação de uma única bicamada de PC na superfície da sílica.

As fotografias foram obtidas 0,5 e 48 horas após a interação em 0, 1, 10, 100 e 150 mM de NaCl e pH 6,3. As fotos ilustram situações de extremos como completa sedimentação produzindo sobrenadante transparente (devido à formação de agregados pesados) ou ausência de sedimentação com dispersões de turbidez comparável à da dispersão de sílica em água pura.

Após 0,5 h de interação de sílica com PC houve uma sedimentação de partículas induzida por PC a 1 mM de NaCl enquanto o controle de sílica na ausência de PC permaneceu coloidalmente disperso.

Após 48 horas houve total sedimentação de sílica na ausência de PC a partir de 10 mM de NaCl, um resultado esperado já que a elevação da força iônica resulta na elevação da concentração de contra-íons ao redor das partículas reduzindo assim a repulsão eletrostática interpartícula e promovendo a agregação e a sedimentação, enquanto que na presença de PC a

sedimentação é praticamente ausente nestas mesmas condições de força iônica e de tempo. Portanto, ao longo da faixa de 10 – 150 mM de NaCl, a baixa estabilidade coloidal da sílica foi substancialmente melhorada pela adição de bicamadas de PC revestindo os particulados, permanecendo coloidalmente estáveis por todo o tempo do experimento.

É interessante notar que, em água pura, as misturas de sílica com PC permaneceram coloidalmente estáveis. Possivelmente nessas condições, a 0,3 mM de PC e 1 mg/ml de sílica em água pura, vesículas e partículas pouco ou nada interagiam, com cada componente da mistura ficando disperso e coloidalmente estável por si só. Isso se mostra de acordo com as isotermas de adsorção de baixa afinidade exibidas aqui e em trabalhos anteriores para adsorção de PC em sílica [Rapuano & Carmona-Ribeiro, 1997; Rapuano & Carmona-Ribeiro, 2000], mostrando que em baixas forças iônicas a afinidade do PC pela sílica é baixa.

Elevando a força iônica para 1 mM de NaCl, a estabilidade coloidal para as misturas revelou o surgimento de uma interação mais atrativa, resultante da elevação das forças de van der Waals. Entretanto, esta atração não foi grande o suficiente para promover o rompimento de vesículas e levar a uma completa deposição de bicamada sobre as partículas. Como mostra a Figura 3.1.1.1, a afinidade entre o PC e a sílica em 1 mM de NaCl é baixa. Possivelmente ocorrendo a adesão de algumas vesículas à superfície de sílica, levando então à agregação de partículas e à sedimentação. Com a elevação da força iônica, verifica-se a elevação das forças de van der Waals do meio e a elevação da atração entre os componentes do sistema, fenômeno refletido na estabilidade coloidal dos tubos de 10, 100 e 150 mM de NaCl em misturas de PC e sílica da Figura 3.1.2.1.

3.1.3 – Efeito do pH na adsorção e na estabilidade coloidal.

Com o propósito de verificar se um efeito parecido estaria também ocorrendo com

partículas, foram comparadas isotermas de adsorção de PC a partir de vesículas em sílica a pH 7,4 ou 6,3 em 10 mM de força iônica (Figura 3.1.3.1) e seus parâmetros de adsorção calculados a partir das curvas (Tabela 3.3).

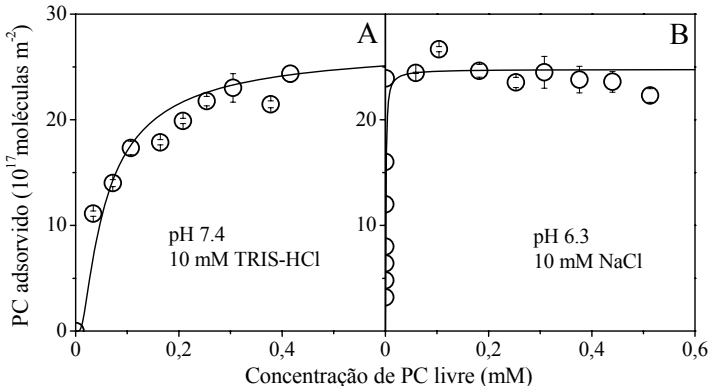


Figura 3.1.3.1 – Isotermas de adsorção de PC a partir de vesículas sobre sílica (1 mg/ml) em 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 (A) ou 10 mM de NaCl a pH 6,3 (B).

Tabela 3.3 – Efeito do pH nos parâmetros de adsorção do PC de vesículas na sílica (1 mg/ml) a 10 mM de força iônica. Os parâmetros *k* e $(x/m)_{máx}$ foram calculados das isotermas de adsorção da Figura 3.1.2.1. *Parâmetros calculados em trabalhos anteriores por Rapuano & Carmona-Ribeiro, 2000.

Força iônica	pH	Constante de afinidade *k* (10^3 M^{-1})	Máximo de adsorção $(x/m)_{máx}$ (moléculas/m^2)
10 mM NaCl	6,3	95	27,21E+17
10 mM TRIS-HCl	7,4	24	24,76E+17
10 mM TRIS-HCl*	7,4*	20*	32,40E+17*

A constante de afinidade *k* entre as vesículas de PC e a sílica foi menor em pH 7,4 do que em pH 6.3, apesar de os máximos de adsorção terem sido similares e consistentes com deposição de uma única bicamada. Esses resultados se mostraram consistentes com imagens fotográficas da estabilização coloidal de partículas de sílica em função da concentração de PC e do pH do meio (exibidas na Figura 3.1.3.2) mostrando o efeito do pH sobre a sedimentação de misturas contendo partículas de sílica hidrofílica e vesículas de PC.

Pode-se constatar o claro efeito estabilizante das bicamadas de PC sobre as dispersões de sílica em ambas as condições de pH. Baixas concentrações de PC (0,01 mM e 0,1 mM)

levam à agregação das partículas em flóculos grandes e conseqüente sedimentação da sílica, enquanto que uma concentração mais elevada de PC (0,7 mM) levou à estabilização coloidal da dispersão.

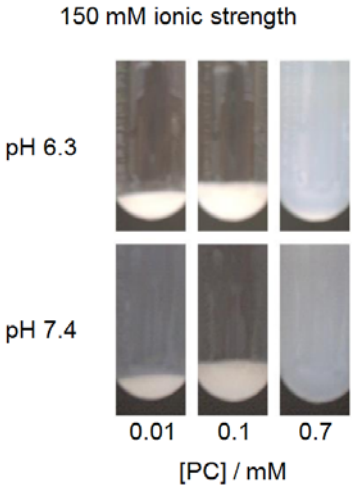


Figura 3.1.3.2 – Fotografias de 1 mg/ml de sílica com PC a 25 °C após 1 h de interação; pH 6,3 em 150 mM de NaCl nos tubos de cima e pH 7,4 em 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl nos tubos de baixo, em 0,01, 0,1 e 0,7 mM de PC.

Assim os resultados até o momento apresentados com partículas sugerem um efeito de pH parecido ao relatado na literatura para substratos planos [Cremer & Boxer, 1999], onde constatou-se que a elevação do pH impede o avanço da bicamada lipídica adsorvida sobre a superfície de waffers planos de sílica [Groves & Boxer, 2002].

A razão para a diminuição da constante de afinidade com a elevação do pH, mostrada na Tabela 3.3, pode estar relacionada com a perda de pontes de hidrogênio cooperativas entre os grupos –P=O na molécula de PC e –O–H na superfície da partícula de sílica. Em pH baixo, a grande freqüência de silanóis não-dissociados na superfície da partícula permitiria ligações de hidrogênio com a molécula de PC; uma interação cooperativa que não ocorreria em valores de pH mais elevados devido à maior freqüência de grupos silanóis dissociados na superfície da sílica.

Como mostrado pela Figura 1.5.1.2A, em um dado pH acima do ponto de carga zero, a elevação da força iônica tende a elevar a dissociação dos grupos silanóis e a densidade de carga superficial da sílica [Tadros & Lyklema, 1968]. Portanto, a possibilidade de pontes de hidrogênio entre o fosfolipídio e a sílica também diminuiria com a elevação da força iônica. Apesar dessa diminuição no número de pontes de hidrogênio, as afinidades sofreram uma grande elevação com a elevação da força iônica (Figura 3.1.1.1F ou Tabela 3.1). Isso sugere que acima de 10 mM de força iônica as pontes de hidrogênio talvez não sejam o principal fator determinante de deposição de bicamada em partículas; possivelmente a elevação da atração de van der Waals foi o fator responsável pela otimização da deposição de bicamada.

De fato, a atração de van der Waals entre superfícies deve aumentar com a elevação da força iônica do meio [Mahanty & Ninham, 1976; Israelachvili, 1992]. Uma interpretação físico-química mais detalhada desses resultados pode ser obtida com o aprofundamento do estudo das forças de interação entre as bicamadas lipídicas e a superfície de sílica.

3.1.4 – Análise dos diâmetros hidrodinâmicos (D_z).

Um estudo da variação dos D_z de partículas de sílica na presença de diferentes concentrações de PC (0 – 1 mM) e em três condições de força iônica (0, 100 e 150 mM) é ilustrado pela Figura 3.1.4.1. A figura mostra a elevada agregação dos particulados que ocorre em altas forças iônicas na ausência de bicamadas de PC (△ e ○ em [PC] = 0 mM). Isso ocorre devido ao fenômeno da blindagem dos grupos negativos da sílica por contra-íons do sal levando à aproximação e a agregação das partículas. A elevação da concentração de PC em solução leva a uma diminuição dos tamanhos das partículas de sílica a valores de D_z inferiores aos medidos nas condições iniciais. Assim, houve uma estabilização coloidal de partículas de sílica induzida por deposição de bicamadas de PC.

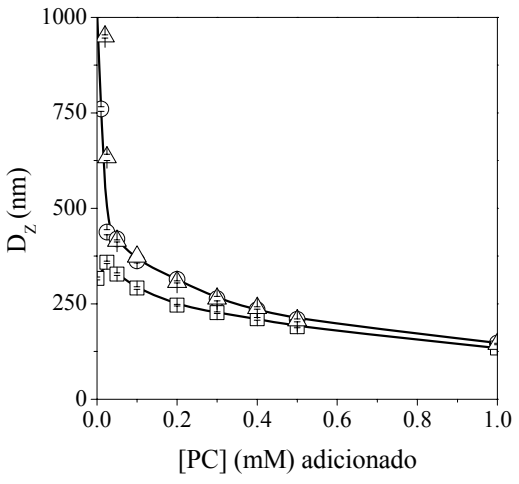


Figura 3.1.4.1 – Efeito da concentração de PC adicionado à mistura no diâmetro médio (D_z) da sílica a 0,1 mg/ml em 0 (□), 100 mM (△) de NaCl a pH 6,3 e 140 mM de NaCl com 10 mM de TRIS-HCl a pH 7,4 (○). Interação de uma hora a 25 ºC.

3.2 – Outros anfifílicos e particulados coloidais.

A Tabela 3.4 mostra os resultados obtidos para o estudo do fenômeno de adsorção de anfifílicos sobre diferentes superfícies, seguindo dois diferentes protocolos: 1) preparação das vesículas e dispersões lipídicas em meio contendo o particulado; 2) mistura de dispersão lipídica e particulado (ver *item 2.7.2*).

Tabela 3.4 – D_z e ζ de sílica a 0,1 mg/ml, PSS e PSA a $2{,}59.10^{12}$ ppml em presença de dispersões de DODAB e PC aquoso ou etanólico e CTAB aquoso a 1 mM de concentração dos anfifílicos.

Partícula / Anfifílico	Sílica ζ (mV)	Sílica D_z (nm)	PSA ζ (mV)	PSA D_z (nm)	PSS ζ (mV)	PSS D_z (nm)
	– 45 ± 3	326 ± 3	38 ± 4	64 ± 0	– 43 ± 4	100 ± 0
DODAB (aquoso)	25 ± 1	246 ± 2	40 ± 1	78 ± 0	47 ± 2	158 ± 1
DODAB (etanólico)	41 ± 1	311 ± 2	43 ± 1	64 ± 0	43 ± 1	139 ± 0
PC (aquoso)	– 18 ± 3	162 ± 2	– 6 ± 3	71 ± 0	– 58 ± 4	104 ± 1
PC (etanólico)	– 12 ± 1	146 ± 2	11 ± 2	63 ± 0	– 50 ± 5	100 ± 0
CTAB (aquoso)	46 ± 3	333 ± 3	-	-	-	-

Os valores de D_z e ζ indicaram algumas variações para as diferentes preparações das amostras. Um maior valor de ζ para $DODAB_{(etanólico)}$ do que para $DODAB_{(aquoso)}$ poderia ser

indicativo de uma maior adsorção de bicamadas de DODAB na sílica no primeiro caso. Entretanto essa elevação de ζ não se reflete na diminuição de D_z. De um jeito ou de outro tais variações foram consideradas experimentalmente pequenas para serem indicativo de uma melhor deposição de bicamadas em um caso do que no outro.Não houveram mudanças significativas para as outras partículas e anfifílicos além dos resultados esperados, o que leva a crer que não existem grandes diferenças sobre o resultado da interação obtido pelos dois métodos de interação empregados. Assim, os dois processos levam ao mesmo resultado final, bicamadas adsorvidas na superfície sólida.

Vale notar que foi obtida carga negativa para os particulados em presença de PC em água pura, o que indica que a superfície sólida das partículas não está recoberta com as bicamadas. De fato, as isotermas de adsorção de PC em forças iônicas menores do que 10 mM revelaram-se de baixa afinidade (Figura 3.1.1.1), havendo possivelmente vesículas livres em dispersão juntamente com partículas de sílica ou vesículas meramente aderidas às partículas ou mesmo uma combinação dos dois estados com algumas vesículas rompidas e adsorvidas nas partículas (ver *item 3.1.2*). Esse último é o mais provável, pois houve diminuição significativa de tamanho do particulado indicando estabilização coloidal do mesmo induzida pelo excesso de vesículas a 1 mM de lipídio.

Ao contrário, para o tensoativo CTAB em concentração ligeiramente acima de sua concentração micelar crítica, apesar da adsorção indicada pela reversão do ζ, não houve estabilização coloidal do particulado representada pela diminuição do D_z.

3.3 – Incorporação de GM1 nas bicamadas de PC adsorvidas sobre a sílica.

A incorporação do monosialogangliosídio GM1 na bicamada de PC adsorvida sobre a superfície da sílica hidrofílica (o sistema sílica/bicamada de PC será a partir de agora referido

apenas como partículas biomiméticas) foi realizada através da medição de fluorescência do equivalente pirênico da molécula de GM1 (GM1Py), em pequenas quantidades adicionadas ao GM1 total, a 140 mM de NaCl e 10 mM de TRIS-HCl, pH 7,4, condições de força iônica e pH fisiológicas. As propriedades fluoróforas do pireno dependem em grande parte do ambiente em que o grupo se encontra, em especial a relação de intensidades entre os picos está relacionada à polaridade do solvente [Kalyanasundaram & Thomas, 1977].

A Figura 3.3.1 mostra os espectros de emissão de fluorescência para o GM1Py em dois ambientes diferentes: micelas de GM1 (Figura 3.3.1A) ou vesículas de PC (Figura 3.3.1B).

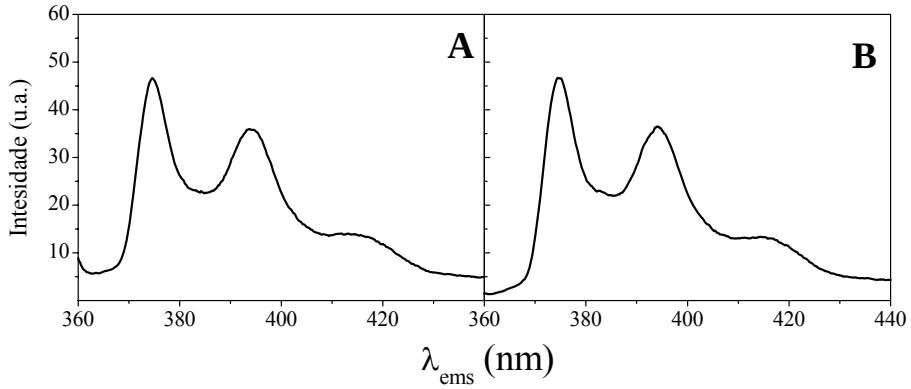


Figura 3.3.1 – Espectro de fluorescência de GM1Py 7% em 5 μM de GM1 total em 10 mM TRIS-HCl e 140 mM NaCl a pH 7.4, 25 ºC. A sonda se encontra incorporada em (A) micelas de GM1 e (B) vesículas de PC a 0.3 mM.

A emissão de fluorescência foi semelhante para os dois ambientes consistente com a semelhança de localização hidrofóbica do grupo pirenil do GM1Py: perto do núcleo da micela de GM1 ou entre as camadas lipídicas da bicamada de PC, ambos ambientes altamente hidrofóbicos.

O máximo de fluorescência em 375 nm foi utilizado para quantificar a incorporação de GM1 na porção lipídica das partículas biomiméticas. A semelhança entre os espectros de

fluorescência do GM1Py 7% em micelas e em bicamadas, característicos da não formação de excímeros de pireno, é um forte indicativo da ausência de formação de domínios de GM1 na bicamada, havendo uma distribuição uniforme do gangliosídio na superfície da partícula.

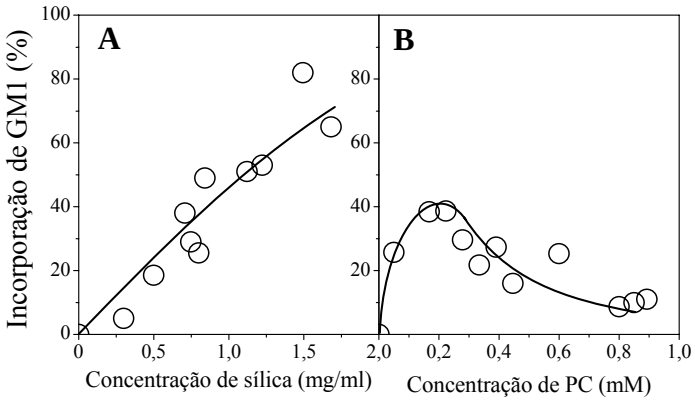


Figura 3.3.2 – Efeito da concentração de partículas de sílica (A) ou de vesículas de PC (B) na incorporação de GM1 (%) em 0,5 μM de GM1 total a 10 mM TRIS-HCl e 140 mM NaCl a pH 7,4, 25 ºC. Em (A) a concentração fixada de PC foi de 0,3 mM e em (B) a concentração de sílica foi de 1 mg/ml.

A Figura 3.3.2A mostra que em 0,3 mM de PC e 0,5 μM de GM1, a incorporação de GM1 em partículas biomiméticas aumenta em função da concentração de partículas de sílica. Considerando que a equivalência de áreas superficiais totais entre vesículas de PC e partículas de sílica ocorreria mais precisamente com 1 mg/ml de sílica e 0,23 mM de PC (valor de PC calculado através da Equação 3.1.2.1), com a elevação da concentração de sílica, a área total de PC nas partículas biomiméticas disponível para a inserção de GM1 deve aumentar linearmente produzindo portanto a dependência quase linear da incorporação de GM1 em função da concentração de sílica adicionada; 0 – 1,5 mg/ml (Figura 3.3.2A).

Em 1 mg/ml de sílica e a 0,5 μM de GM1, a dependência da incorporação de GM1 na concentração de PC apresentou um formato de 'sino' com um máximo por volta de 0,23 mM de PC (Figura 3.3.2B). Acima desta concentração de lipídio, que é precisamente a necessária para o recobrimento de toda a área disponível de sílica com uma única bicamada de PC, a elevação da concentração de lipídio causou uma diminuição na incorporação de GM1 nas

partículas biomiméticas. Essa diminuição ocorreu muito provavelmente devido à distribuição do GM1 em todas as bicamadas disponíveis na mistura, que levou a uma competição entre as bicamadas adsorvidas e as vesículas livres em dispersão. Com a elevação da concentração de vesículas livres o GM1 incorporado nas partículas biomiméticas tende a diminuir de uma maneira progressiva.

3.4 – Ligação de CT ao GM1 incorporado nas partículas biomiméticas.

Com o objetivo de diferenciar ligações específicas de CT às partículas biomiméticas de ligações não-específicas, determinações da ligação de CT foram realizadas na presença e na ausência de GM1 em condições experimentais semelhantes. Esses experimentos revelaram uma ligação de 7% de CT (2 μg) às partículas biomiméticas na ausência de GM1 (Tabela 3.5). A ligação específica, na presença de bicamadas de PC e GM1 incorporado, por outro lado, chegou a 67% do total de CT adicionado (20 μg). Nas partículas de sílica sozinhas, como geralmente observado na literatura [Kondo & Higashitani, 1992; Suh, et al., 2004], houve uma ligação não-específica significativa de 26% (8 μg) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Ligações específicas e não-específicas de CT a partículas. Os controles para as ligações não-específicas, sílica ou sílica/PC, devem ser comparados com a amostra teste sílica/PC/GM1.

Amostra	CT adicionado (μg)	CT ligado		
		(μg)	(%)	(mg/m^2 sílica)
Sílica 1 mg/ml	30	8	26	0,65
Sílica 1 mg/ml / PC 0,3 mM	30	2	7	0,18
Sílica 1 mg/ml / PC 0,3 mM / GM_1 5 μM	30	20	67	1,71

Com 1 mg/ml de sílica, 0,3 mM de PC e 5 μM de GM1, o efeito da concentração de CT adicionado à mistura na ligação de CT ao sistema GM1/partícula biomimética foi uma elevação da massa de CT ligado (Figura 3.4.1A e C) aumentando portanto a porcentagem de ligação de CT (Figura 3.4.1B) até um limite de saturação onde um nível máximo de ligação foi atingido.

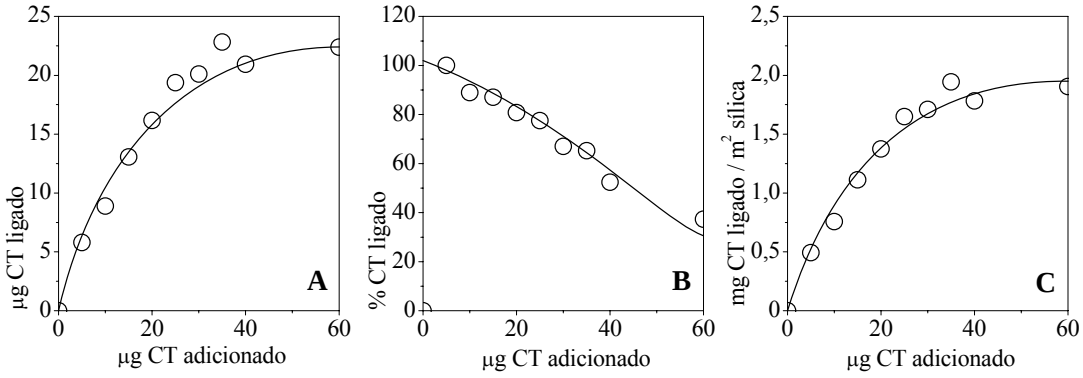


Figura 3.4.1 – Efeito da massa de CT adicionado na ligação do CT a partículas biomiméticas em 1 mg/ml de sílica, 0,3 mM de PC e 5 μM de GM1 em 10 mM de TRIS-HCl e 140 mM de NaCl a pH 7,4, 25 ºC.

A relação de dependência entre o fenômeno de ligação de CT com a massa de CT adicionado atinge um nível de platô por volta de 35 μg de CT adicionado com uma ligação máxima de 2 mg de CT por m^2 de sílica ou 21 – 22 μg de CT ligado. Neste ponto deve-se notar que sob estas condições experimentais houve uma proporção molar no ponto de ligação máximo de CT igual a 1: 5: 300 (CT ligado: GM1: PC). Além disso, as áreas moleculares devem também ser consideradas quando se fala em proporções moleculares. Neste caso essas áreas seriam as projeções no plano do volume de cada molécula orientada. Essas são: 30,2 nm^2 por molécula CT [Miller et al., 2004], 4,0 – 5,3 nm^2 por molécula de GM1 [Luckham et al., 1993; Majewski et al., 2001] e 105 nm^2 por 300 moléculas de PC organizadas em uma bicamada, considerando 0,7 nm^2 para cada molécula de PC. A Figura 3.4.2 oferece uma esquematização da adsorção das três biomoléculas à superfície da sílica.

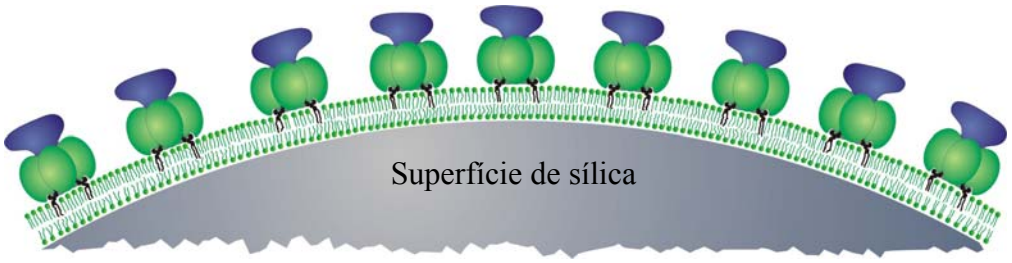


Figura 3.4.2 – Representação esquemática de moléculas de CT ligadas a uma partícula de sílica recoberta por uma bicamada de PC incorporada com receptores GM1.

A proporção molar medida de 1 CT: 5 GM1 se mostrou consistente com dados da literatura já que a mesma proporção molar foi encontrada a partir de determinações de difração de raios-X da estrutura cristalina do pentâmero da toxina da cólera ligada ao grupo pentasacarídeo do receptor GM1 [Merrit et al., 1994]. Difração de raios-X, refletividade de nêutrons e simulações computacionais de Monte Carlo determinaram *in situ* a estrutura e o empacotamento de monocamadas de gangliosídio-fosfolipídio na interface ar-água, confirmando a ausência de separação de fase entre os componentes do sistema ou da formação de domínios laterais nestas misturas lipídicas nas proporções de GM1:lipídio estudadas (5 – 20% de GM1) [Luckham et al., 1993; Majewski et al., 2001]. A técnica de refletividade de nêutrons foi também utilizada na interface ar-líquido para caracterizar a estrutura de monocamadas de lipídio com a toxina da cólera ligada em seu estado nativo ao GM1; a uma resolução de apenas alguns angstroms, a extensão glicol-lipídio do GM1, a orientação de CT ligado e a distância entre a camada de proteína e a camada lipídica foram determinadas [Miller et al., 2004]. Este último trabalho mostrou a partir de simulações que a distribuição randômica de moléculas de GM1 na monocamada lipídica iria se alterar com a ligação de CT, essa ligação restringindo até cinco moléculas de GM1 nos sítios de ligação da proteína. Portanto os ensaios quantitativos se mostraram consistentes com conclusões da literatura para monocamadas de lipídios na interface ar-água.

Partículas de sílica hidrofílica se mostraram mais vantajosas para produzir partículas biomiméticas do que as esferas poliméricas de látex, mais caras, previamente testadas para a reconstituição do mesmo par GM1/CT (receptor/ligante) [Sicchierolli & Carmona-Ribeiro, 1995; 1996]. O problema das microesferas de poliestireno estava relacionado com o baixo recobrimento de partícula por uma bicamada contínua de PC, havendo possivelmente a adesão de vesículas lipídicas inteiras, não rompidas, na superfície da partícula polimérica. Como uma conseqüência de um recobrimento insuficiente de bicamada, adsorção não-específica de PC

na superfície das partículas poliméricas ocorreu levando a uma proporção molar de 1: 1 (GM1: CT) no máximo de ligação com CT, um resultado em discordância com a proporção molar esperada para a ligação GM1/CT de 5: 1.

Os controles da Tabela 3.5 claramente mostram que a ligação não-específica de CT às partículas biomiméticas estava praticamente ausente e isso levou à excelente concordância entre as proporções molares esperadas de ligação GM1/CT e as obtidas experimentalmente. O grande fator que levou à otimização do reconhecimento molecular foi a elevação da afinidade entre a bicamada de PC e a sílica, obtida com a elevação da força iônica e, conseqüentemente, a elevação da atração de van der Waals entre vesículas de PC e partículas de sílica, levando ao recobrimento otimizado com bicamadas (Tabelas 3.1 e 3.3).

3.5 – Estudo da adsorção de DPPC sobre a sílica hidrofílica.

Com o objetivo de se montar uma caracterização mais ampla da adsorção de vesículas e lipossomos sobre a superfície de partículas de sílica hidrofílica, foi realizado um estudo de adsorção de DPPC a partir de vesículas sobre as partículas. Ao contrário do PC que à temperatura ambiente forma bicamadas em estado líquido-cristalino, o DPPC é um lipídio que à temperatura ambiente forma bicamadas que se encontram em estado gel. Frente a isto, foi adequado investigar a interação entre vesículas de DPPC com partículas de sílica, a fim de determinar se ocorre ou não deposição de bicamada lipídica como no caso do PC.

3.5.1 – Efeito da força iônica na adsorção de DPPC sobre a sílica.

A Figura 3.5.1.1 mostra isotermas de adsorção de DPPC em partículas de sílica a 1 mg/ml de sílica em: 0, 1, 10, 100 e 150 mM de NaCl, pH 6,3 a 25 ºC. Comparando dados das Figuras 3.5.1.1 e 3.1.1.1, poder-se-ia concluir que a afinidade do DPPC como adsorbato pela superfície de sílica hidrofílica é de um alto nível em todas as forças iônicas estudadas,

enquanto para o PC a afinidade somente se torna alta quando as forças de van der Waals que atuam no sistema são elevadas pela elevação da força iônica, promovendo uma maior atração entre adsorbato e adsorvente.

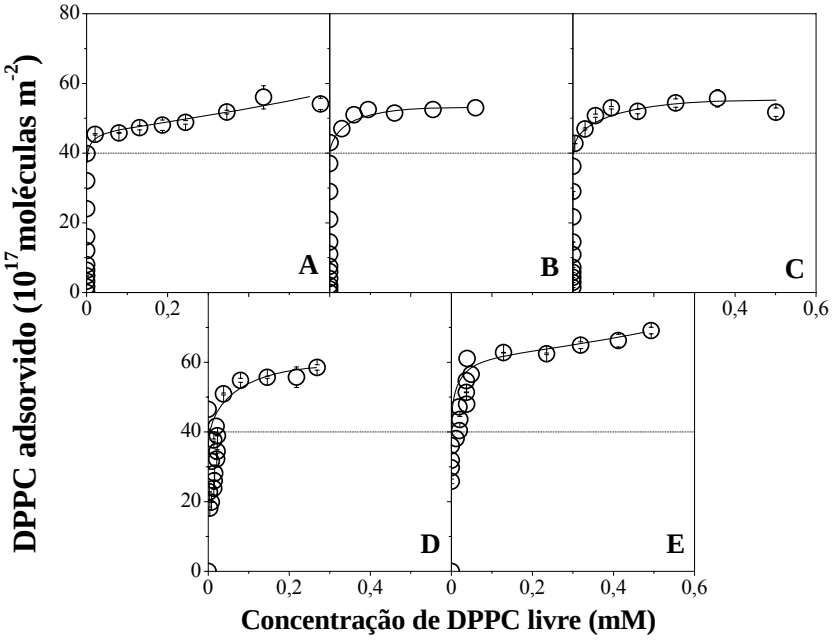


Figura 3.5.1.1 – Isotermas de adsorção de DPPC sobre sílica (1 mg/ml) com 0 (A), 1 (B), 10 (C), 100 (D) e 150 mM (E) de NaCl, pH 6,3, a 25 ºC, após interações de uma hora. O pontilhado em 40.10^{17} moléculas de DPPC/m^2 de sílica representa a adsorção esperada para a deposição de uma bicamada de DPPC na sílica, tomando 0,5 nm^2 como a área da cabeça polar de cada molécula de DPPC adsorvida.

Entretanto é importante notar que os valores de $(x/m)_{máx}$ alcançados por todas as isotermas da Figura 3.5.1.1 estão acima do valor esperado para a deposição de uma única bicamada de DPPC na superfície da sílica hidrofílica, que é de 40.10^{17} moléculas de DPPC/m^2 de sílica [Rapuano & Carmona-Ribeiro, 1997].

A elevação da força iônica provocou um leve aumento do $(x/m)_{máx}$ indicando uma maior adsorção de moléculas de DPPC na sílica (Figura 3.5.1.1) até valores ainda maiores do que os 40.10^{17} moléculas de DPPC/m^2 de sílica esperados. Portanto a adsorção de DPPC na sílica passou do ponto de deposição de uma única bicamada, havendo indícios então da deposição de vesículas inteiras, não-rompidas, aderidas à superfície da sílica como foi

também reportado na literatura [Mornet et al., 2005].

Assim, essas isotermas estão indicando que as vesículas de DPPC possuem uma maior afinidade pelas partículas de sílica do que as vesículas de PC. Nos dois casos a elevação da força iônica aumenta as forças de atração entre os componentes do sistema aumentando assim a adsorção, mas no caso do DPPC essa adsorção pode não necessariamente ocorrer em seguimento do rompimento de vesículas, como ocorre no caso do PC que forma vesículas mais fluídas. Isso pode nos indicar que as forças de van der Waals não seriam suficientes para romper o agregado molecular rígido formado pelas moléculas de DPPC nas temperaturas estudadas.

3.6 – Estudo da adsorção de vesículas mistas DPPC/DODAB sobre a sílica.

Tendo em mente os obstáculos encontrados em se promover a deposição de bicamadas únicas de DPPC na sílica, foi então proposta a utilização de um outro anfifílico formador de bicamadas, o DODAB, para modular a adsorção do DPPC na superfície do particulado aos níveis esperados de bicamada. A adsorção de bicamadas mistas de DPPC/DODAB foi estimada com base na dosagem do DPPC restante no sobrenadante e no cálculo de isotermas de adsorção de DPPC em sílica. A Tabela 3.6 mostra os valores de D_z e ζ das dispersões coloidais empregadas: sílica, DPPC e DPPC/DODAB.

Tabela 3.6 – D_z e ζ da sílica, DPPC e misturas DPPC/DODAB em 1 mM de NaCl, pH 6,3, 25 ºC.

Amostra	D_z (nm)	ζ (mV)
Sílica 0,1 mg/ml	271,1 ± 2,9	– 45,1 ± 2,9
DPPC 3 mM	87,9 ± 0,6	0,5 ± 1,5
DPPC/DODAB 1% 3 mM	81,4 ± 0,6	21,5 ± 3,2
DPPC/DODAB 2% 3 mM	78,5 ± 0,3	41,4 ± 5,1
DPPC/DODAB 5% 3 mM	53,5 ± 0,2	40,5 ± 2,3
DPPC/DODAB 10% 3 mM	30,8 ± 0,1	37,5 ± 1,4
DPPC/DODAB 20% 3 mM	30,6 ± 0,9	39,1 ± 3,2

Vale notar a diminuição do D_z vesicular com a elevação da porcentagem molar de

DODAB presente nas vesículas, de 87,9 nm em 0% DODAB até 30,6 nm em 20% DODAB. Os ζ das misturas DPPC/DODAB positivos mostram que a carga positiva do DODAB, mesmo em baixas proporções molares, tem um grande impacto no potencial de superfície da vesícula.

3.6.1 – Efeito da proporção molar na adsorção.

A Figura 3.6.1.1 mostra o efeito da % DODAB (0, 1, 2, 5, 10 e 20%) nas isotermas de adsorção de DPPC em sílica a 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC.

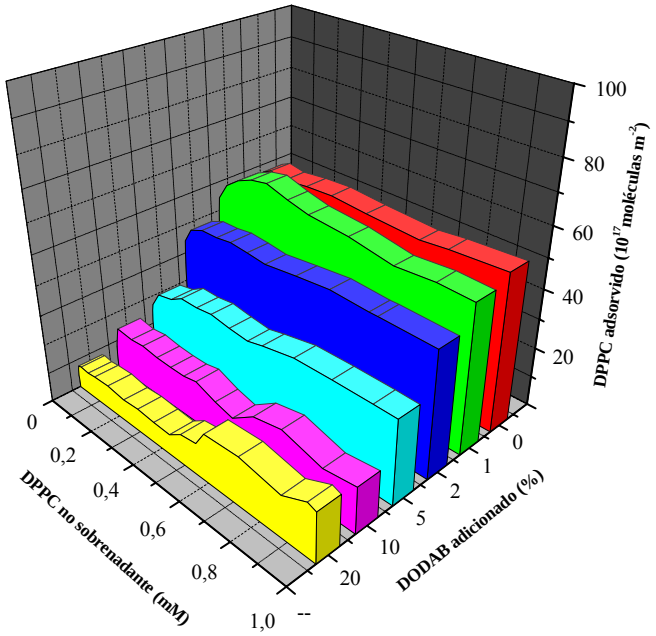


Figura 3.6.1.1 – Isotermas de adsorção para vesículas mistas sobre sílica (1 mg/ml) a 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB em 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC.

Na proporção molar de 0 e 1% de DODAB, pode-se perceber que os valores de adsorção de DPPC estão acima do valor esperado para uma bicamada de DPPC sobre sílica (a deposição para uma única bicamada de DODAB é de 33 – 40.10^{17} moléculas/m^2 de sílica [Rapuano, 2000; Moura, 2003]) e o perfil da isoterma é similar ao exibido na Figura 3.5.1.1B, com 100% de DPPC a 1 mM NaCl. Com a elevação da % DODAB, houve uma drástica queda na adsorção de DPPC na sílica a valores de $(x/m)_{máx}$ abaixo dos esperados para a

adsorção de bicamada. Esses resultados indicam um tipo de modulação da adsorção de moléculas de DPPC na superfície da sílica negativa com a adição de moléculas catiônicas de DODAB à bicamada.

3.6.2 – Análise dos diâmetros hidrodinâmicos (D_z).

A Figura 3.6.2.1 mostra a variação dos D_z de partículas em função da concentração de anfifílico total para 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB a 1mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC.

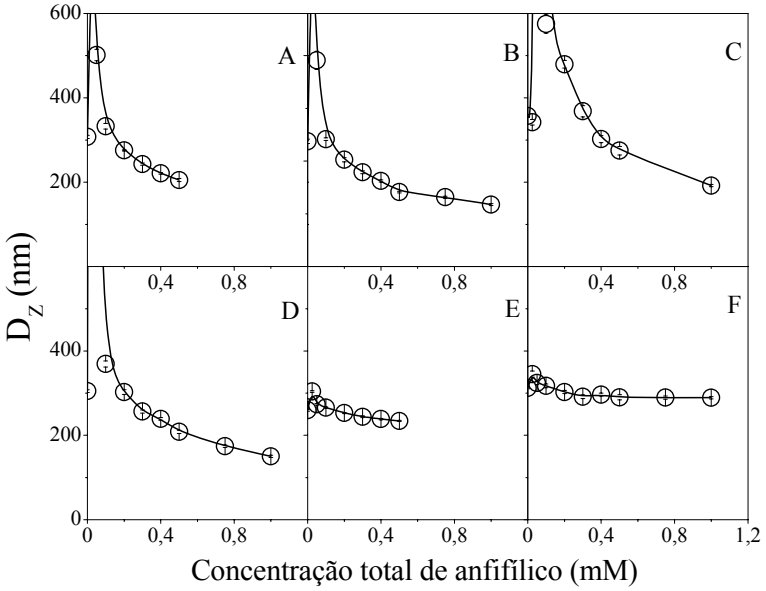


Figura 3.6.2.1 – Efeito da concentração de anfifílico adicionado no D_z da sílica (0,1 mg/ml) em 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) e 20% (F) de DODAB em proporção molar, a 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC. Interação de uma hora entre vesículas e partículas.

Pode-se notar o fenômeno de diminuição do D_z na presença de concentrações crescentes de anfifílico (Figura 3.6.2.1A – D), já observado anteriormente também para o PC. Em baixas concentrações de anfifílico adicionado à mistura ocorre a agregação das partículas de sílica em particulados de tamanhos mais elevados (> 600 nm) e a conseqüente instabilidade coloidal das partículas em dispersão. Elevando-se a concentração de anfifílico, a agregação é revertida e a diminuição do tamanho das partículas tem início, atingindo valores ainda mesmo

menores que os da sílica sozinha.

Na Figura 3.6.2.1E e F, entretanto, não foi detectada a mesma agregação inicial de partículas em baixas concentrações de anfifílico e nem mesmo a acentuada diminuição de tamanho provocada pela elevação da concentração deste. Os tamanhos de partículas se mantiveram basicamente os mesmos que o apresentado pela sílica sozinha. Isso nos leva a crer que possivelmente não houve interações, ou ao menos nenhuma que provocasse a agregação de partículas, entre as vesículas mistas nas duas proporções molares, com as partículas de sílica.

3.6.3 – Análise dos potenciais-zeta (ζ).

A Figura 3.6.3.1 mostra o efeito da concentração de anfifílico no ζ das partículas para 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB a 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC.

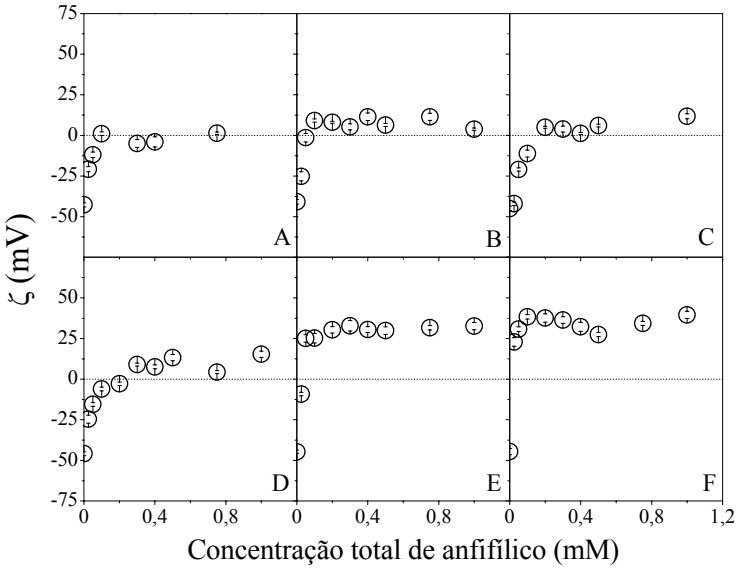


Figura 3.6.3.1 – Efeito da concentração de anfifílico adicionado no ζ da sílica a 0,1 mg/ml em 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) e 20% (F) de DODAB em proporção molar, a 1 mM NaCl, pH 6,3 e 25 ºC. Interação de uma hora entre vesículas e partículas.

Pela figura pode-se ver que ocorreu uma neutralização da carga superficial da sílica,

que em 1 mM NaCl está por volta de – 45 mV (Tabela 3.6), com a adição de vesículas mistas. Essa neutralização do ζ é indicativa de revestimento ocorrido na superfície da partícula de sílica e como pode ser visto na Figura 3.6.3.1A (100% de DPPC) ela chegou a ζ = 0 mV, indicando um recobrimento total do particulado negativamente carregado da sílica por agregados moleculares de DPPC, sejam vesículas ou bicamadas adsorvidas.

Com a elevação da % DODAB, esse potencial sofreu uma natural elevação devido à carga positiva do DODAB chegando, em 20% de DODAB, ao valor de ζ medido para a respectiva vesícula mista de DPPC/DODAB (Tabela 3.6). Entretanto essa congruência não foi detectada para as proporções menores de DPPC/DODAB (1 e 10%), apresentando potenciais inferiores aos medidos para as respectivas vesículas mistas sozinhas (Tabela 3.6).

Tabela 3.7 – D_z e ζ de interações de sílica com vesículas mistas a 0, 1, 2, 5, 10 e 20% de DODAB em 1 mM NaCl, pH 6,3, 25 ºC.

Partícula	D_z (nm)	ζ (mV)
Sílica 0,1 mg/ml	271,1 ± 2,9	– 45,1 ± 2,9
Sílica 0,1 mg/ml / DPPC/DODAB 0% 0,3 mM	242,9 ± 2,5	1,1 ± 1,1
Sílica 0,1 mg/ml / DPPC/DODAB 1% 0,3 mM	223,6 ± 3,2	5,2 ± 1,9
Sílica 0,1 mg/ml / DPPC/DODAB 2% 0,3 mM	254,0 ± 4,1	4,1 ± 1,4
Sílica 0,1 mg/ml / DPPC/DODAB 5% 0,3 mM	256,2 ± 2,2	18,3 ± 3,0
Sílica 0,1 mg/ml / DPPC/DODAB 10% 0,3 mM	244,0 ± 2,0	32,8 ± 3,2
Sílica 0,1 mg/ml / DPPC/DODAB 20% 0,3 mM	291,6 ± 4,2	36,4 ± 2,0

A Tabela 3.7 mostra os D_z e ζ de misturas de partículas de sílica a 0,1 mg/ml com vesículas mistas a 0,3 mM de anfifílico total nas diferentes proporções molares de DODAB utilizadas (0, 1, 2, 5, 10 e 20%). Não foram detectadas grandes diferenças no tamanho de partículas entre a sílica sozinha e aquela com vesículas mistas nas proporções molares empregadas. Entretanto os valores de ζ de partícula mostraram uma clara reversão da carga negativa da sílica sozinha para um valor próximo de zero em 0% DODAB (devido à natureza zwiteriônica do DPPC) e valores positivos nas proporções molares seguintes (1 – 20 %).

A Figura 3.6.3.2 exibe a diferença na variação do ζ das dispersões de vesículas mistas

sozinhas (Figura 3.6.3.2A) em comparação com as interações de partículas de sílica e vesículas mistas (Figura 3.6.3.2B) a partir dos dados das Tabelas 3.6 e 3.7.

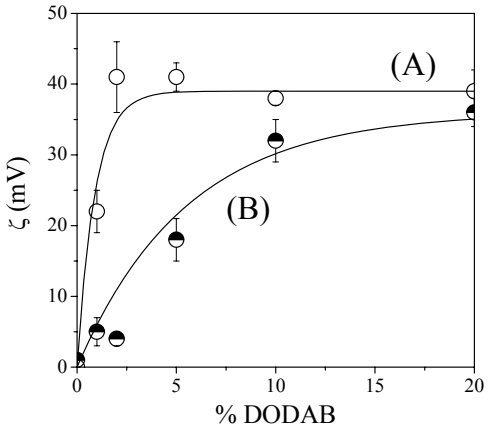


Figura 3.6.3.2 – Comparação da variação do ζ das vesículas mistas (A) e das interações de partículas com vesículas mistas (B) em função da % DODAB a partir dos dados das Tabelas 3.6 e 3.7.

Pode-se perceber pela figura que o ζ das vesículas mistas sozinhas é mais positivo do que o ζ das interações de partículas de sílica com vesículas mistas. Isso ocorre até 20% de DODAB adicionado, quando os dois valores de ζ se tornam parecidos. Essa diferença na densidade superficial de carga das bicamadas mistas nas duas situações experimentais sugere a existência de uma diferença na distribuição das cargas positivas do DODAB na superfície de ambas partículas coloidais. Os valores superiores de ζ para as vesículas mistas sozinhas indicam uma maior densidade de carga, logo uma maior densidade de moléculas de DODAB na superfície da vesícula do que para as interações entre sílica e vesículas. Essa diferença se torna menor com a elevação da % DODAB, como pode ser visto em 20% de DODAB.

Este comportamento estranho de início pode ser entendido se algum tipo de separação de fase entre os dois anfifílicos estiver ocorrendo nas interações com sílica. Essa separação pode estar ocorrendo na bicamada tanto lateralmente quanto transversalmente (movimento flip-flop). A força de atração eletrostática entre o DODAB e a sílica pode estar acelerando a sua difusão transversal, criando uma assimetria na membrana adsorvida entre a camada

externa (distal) e a interna (proximal) [Linseisen et al., 1996; Käsbauer et al., 1999]. Essa assimetria, com as cargas positivas de DODAB concentradas na camada proximal em contato com as cargas negativas da sílica, faria com que o ζ das interações fosse menor do que o das vesículas mistas sozinhas livres de atrações eletrostáticas. Com a elevação da % DODAB e a conseqüente neutralização da força de atração eletrostática, a camada distal seria então progressivamente preenchida pelas cargas positivas do anfifílico e o ζ se igualaria ao das vesículas mistas sozinhas (Figura 3.6.3.2).

Outra explicação para esse comportamento poderia ser a presença de grupos silanóis de superfície das partículas de sílica não recobertos por bicamadas de anfifílicos. Esses grupos negativos expostos ao meio aquoso estariam diminuindo o ζ líquido da partícula, resultando assim em valores menores do que os encontrados para as vesículas mistas sozinhas. Essa explicação se encontra mais de acordo com os dados obtidos nas isotermas de adsorção de DPPC em sílica (Figura 3.6.1.1), que apresentaram um perfil de adsorção baixo para os valores mais elevados de % DODAB (10 e 20% de DODAB). Aqueles dados indicavam uma diminuição da adsorção de DPPC com a elevação da % DODAB em solução, enquanto que os valores de ζ indicavam uma elevação da densidade de cargas positivas na superfície das partículas com a elevação da % DODAB (Figura 3.6.3.2). Assim, uma menor adsorção de DPPC significa uma maior área de sílica exposta ao meio aquoso, que por sua vez interfere no ζ líquido da partícula.

Uma troca direta de anfifílicos também pode estar ocorrendo entre membranas, com moléculas de DODAB difundindo das vesículas livres em solução para as bicamadas adsorvidas nas partículas e moléculas de DPPC no movimento inverso. Isso explicaria a baixa adsorção de DPPC na sílica medida por isotermas ao mesmo tempo em que a presença de cargas positivas, próprias do DODAB, é medida nos particulados por espalhamento de luz. Entretanto tais fenômenos de transferência são relativamente lentos (ver *item 1.2.3*), podendo

levar várias horas para ocorrer entre bicamadas suportadas e bicamadas livres [Reinl & Bayerl, 1994]. Neste caso a atração eletrostática entre o DODAB e a sílica poderia estar acelerando esse processo de transferência, embora isto possa ser insuficiente para explicar os baixos valores de adsorção de DPPC medidos em elevadas proporções molares de DODAB.

Experimentos adicionais para esclarecer estes pontos são necessários. Uma melhor compreensão desta assimetria lipídica na bicamada será útil para o desenvolvimento de sistemas biomiméticos mais parecidos com sistemas naturais, onde as membranas biológicas são naturalmente assimétricas tanto lateral quanto transversalmente (Figura 1.2.1).

A Figura 3.6.3.3 mostra uma sobreposição dos gráficos de ζ e D_z nas diferentes % DODAB em função da concentração total de anfifílico exibidos nas Figuras 3.6.2.1 e 3.6.3.1, em escala logarítmica.

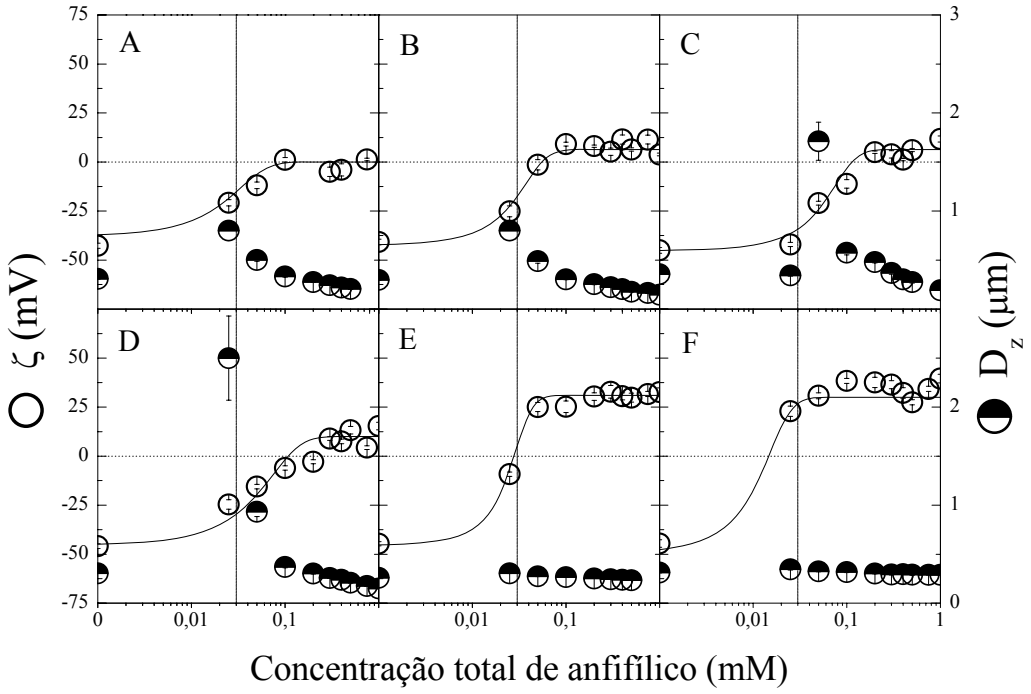


Figura 3.6.3.3 – Sobreposição das variações de Dz e ζ em interações de sílica (0,1 mg/ml) com vesículas mistas em função da concentração total de anfifílico em 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) e 20 % (F) de DODAB a partir dos gráficos das Figuras 3.6.2.1. e 3.6.3.1. As linhas pontilhadas verticais no centro dos gráficos representam a concentração total de anfifílico necessária para recobrir a sílica com uma única bicamada.

As linhas pontilhadas verticais em 0,03 mM de anfifílico em cada gráfico equivalem à concentração necessária para recobrir toda a superfície da sílica com uma única bicamada de anfifílico, a partir da Equação 3.1.2.1. Vale notar que as diferentes % DODAB foram consideradas nesse cálculo, adicionando as frações molares para DPPC e DODAB em cada caso na equação em relação com a área de cabeça polar respectiva, sendo a do DODAB 0,6 nm^2 e a do DPPC 0,5 nm^2. Entre 0 e 20% de DODAB os valores sofreram variações desprezíveis do 0,03 mM representado.

Pela figura é possível perceber uma certa correlação entre o ponto de reversão dos ζ das partículas (representado na elevação da sigmoidal) e o valor de concentração necessária para recobrimento da sílica com uma única bicamada. Os D_z máximos também exibem uma próxima correlação com esse valor, que possivelmente terá grande importância para melhor compreender o processo de adsorção de bicamadas completas na superfície de partículas. Entretanto serão necessários experimentos adicionais para refinar as medidas de ζ e D_z aqui obtidas, varrendo faixas menores de anfifílico adicionado, se o intuito for dar um fundamento sólido à importância da equivalência de áreas entre as bicamadas e a sílica.

3.6.4 – Efeito da proporção molar e da concentração total de anfifílico na estabilidade coloidal das partículas.

A Figura 3.6.4.1 mostra o efeito da % DODAB (0, 1, 2, 10, 20%) na sedimentação de partículas de sílica a 1 mg/ml em 1 mM de NaCl, pH 6.3 e 25 ºC, após uma hora de interação. Pela figura pode-se perceber que existem algumas diferenças no padrão de sedimentação da sílica em diferentes % DODAB com o aumento da concentração de anfifílico. Em 10 e 20% de DODAB, a instabilidade coloidal (sedimentação) a baixas concentrações de anfifílico é maior do que entre 0 e 2%, enquanto a altas concentrações a estabilidade coloidal é maior nestes últimos. Entretanto em todos os casos a sedimentação de partículas é reduzida com a

elevação da concentração de anfifílicos em dispersão, sendo atingida boa estabilidade coloidal entre 0 e 2% de DODAB para as maiores concentrações de anfifílico total.

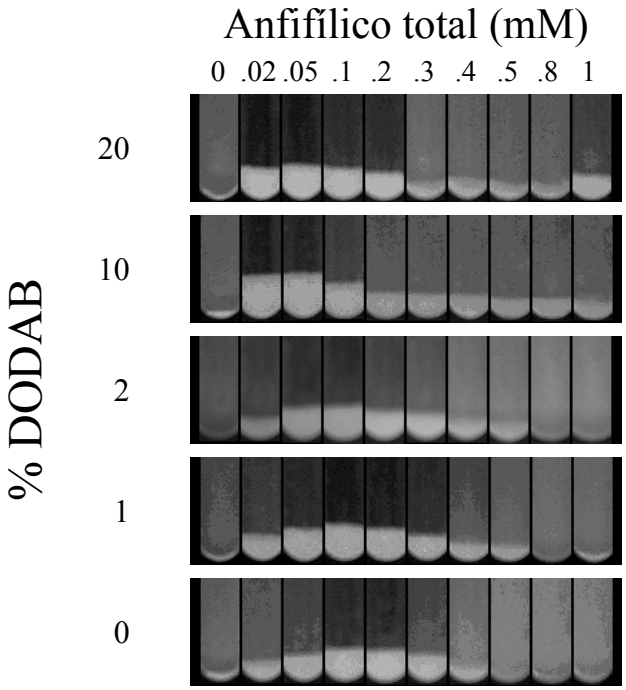


Figura 3.6.4.1 – Misturas de sílica (1 mg/ml) com vesículas mistas em quatro proporções molares diferentes (0, 1, 2, 10 e 20% de DODAB) após 1 hora de interação, em 1 mM de NaCl, pH 6.3 e 25 ºC.

Para 10 e 20% de DODAB houve sedimentação generalizada da sílica, embora mais intensamente a baixas concentrações de anfifílico. Tais valores de % DODAB apresentaram baixos valores de $(x/m)_{máx}$ (Figura 3.6.1.1), indicando baixa adsorção de DPPC nas partículas, e valores positivos de ζ (Figura 3.6.3.1), indicando adsorção de DODAB nas partículas, ou seja, uma situação onde pode ter ocorrido grande troca de lipídeos entre bicamadas livres e bicamadas adsorvidas, como previamente argumentado aqui.

A quantidade de DODAB em solução, 10 – 20% do total de anfifílico adicionado, não é suficiente para a formação de uma bicamada de DODAB revestindo completamente a área superficial de sílica, com um valor de R = 0,76 para 20% de DODAB em 1 mM de anfifílico total (Equação 3.1.2.1). Assim, se ao menos uma boa parte do DODAB se encontra adsorvido nas partículas e a maior parte do DPPC se encontra na forma de vesículas, as partículas

insuficientemente revestidas podem sofrer uma agregação similar com a agregação ocorrida para as situações de baixas quantidades de lipídeo total adicionado, levando o sistema à sedimentação detectada.

3.7 – Adsorção de ACT em partículas de PMMA/CMC

A Figura 3.7.1 mostra um estudo de adsorção de ACT na superfície de partículas de PMMA/CMC (Np = $7{,}9.10^9$ ppml) em 10 mM TRIS-HCl, 140 mM NaCl a pH 7,4 e 25ºC.

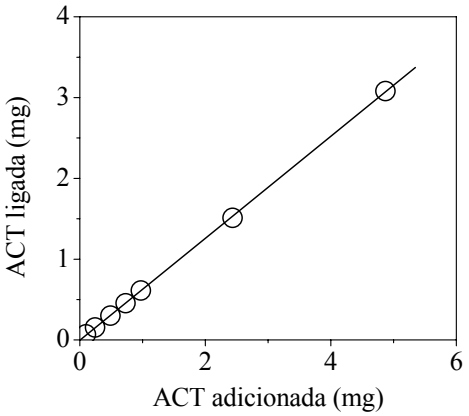


Figura 3.7.1 – Efeito da ACT adicionada na adsorção de ACT à partículas poliméricas de PMMA/CMC (Np = $7{,}9.10^9$ ppml) em 10 mM TRIS-HCl, 140 mM NaCl a pH 7,4 e 25ºC.

A adsorção apresentou um perfil linear de afinidade com grau de adsorção por volta de 65% da ACT adicionado. Apesar de ter sido detectada adsorção da ACT na superfície das partículas, não é possível ainda identificar que tipo de interação ocorre entre a antitoxina e as partículas e nem prever a orientação com que as moléculas de ACT estão adsorvidas na superfície das partículas.

Devido à natureza negativamente carregada das partículas de PMMA/CMC ($\zeta = -52 \pm 2$ mV) [Castro et al., 2004], a adsorção de proteínas à sua superfície pode ser favorecida por atração eletrostática dependendo do ponto isoelétrico (pI; valor de pH em que a carga líquida da proteína é igual a zero) próprio da proteína. No caso de anticorpos como a ACT, a

literatura relata que o pI total da molécula é menor do que o pI do fragmento F_{ab} e maior do que o do fragmento F_c isolados [Zhou et al., 2004]. Portanto no valor do pI total do anticorpo, o fragmento F_{ab} terá uma carga positiva e o F_c uma carga negativa.

Isso sugere uma possível atração entre as cargas positivas localizadas no fragmento F_{ab} do anticorpo, dentre elas os grupos amino terminais positivos da cadeia de aminoácidos, e os resíduos de açúcar negativos da superfície da partícula. Se essa interação estiver ocorrendo, a ACT se encontra de 'cabeça-pra-baixo' com o fragmento F_{ab} voltado para a superfície da partícula. De fato, simulações computacionais Monte Carlo da adsorção e orientação de anticorpos em partículas e superfícies carregadas em diferentes condições de pH e força iônica mostraram que a orientação 'cabeça-pra-cima' é obtida em superfícies positivamente carregadas, e a orientação 'cabeça-pra-baixo' em superfícies negativas, enquanto que em superfícies neutras o anticorpo se encontra 'deitado' na superfície [Zhou et al., 2004]. A imobilização 'cabeça-pra-cima' da ACT, com o fragmento F_{ab} voltado para o meio-aquoso, é crítica no desenvolvimento de sistemas biosensores com alta sensitividade e especificidade.

Adicionalmente para as partículas de PMMA/CMC, a camada de açúcares altamente hidrofílicos recobrindo a superfície das partículas pode ser sítio de formação de pontes de hidrogênio. As diversas hidroxilas expostas ao meio aquoso podem estar interagindo desta forma com as cadeias laterais de aminoácidos como serina, histidina e tirosina, favorecendo ainda mais uma adsorção do anticorpo na superfície da partícula.

É importante lembrar que a solução de ACT utilizada nestes experimentos é o anti-soro total do coelho (ver *item 2.1*), logo deve-se assumir a presença de outras proteínas naturais do soro não-específicas para toxina da cólera, mas que também podem estar adsorvendo na superfície das partículas. Talvez fosse de interesse trabalhar com a ACT purificada a partir do anti-soro para aumentar a eficiência da resposta de ligação com a CT.

Esses problemas devem ser resolvidos para que o conjunto ACT/CT seja verificado como um sistema biosensor viável. Experimentos adicionais serão necessários para averiguar a orientação tridimensional da ACT adsorvida na superfície das partículas assim como sua capacidade de ligação com moléculas de CT.

4 – Conclusões

Partículas de sílica hidrofílica recobertas com bicamadas de PC se mostraram estáveis por longos períodos (48h) mesmo em concentrações mais elevadas de força iônica (10 – 150 mM) demonstrando o efeito estabilizante das bicamadas de PC na estabilidade coloidal da sílica.

A interação de van der Waals se mostrou o fator determinante para a otimização da deposição de bicamadas de PC na superfície das partículas em valores mais elevados de força iônica, embora a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos –P=O na molécula de PC e –O–H na superfície da partícula de sílica possa ter alguma influência na adsorção de bicamadas, como visto nos estudos de pH.

O receptor de membrana celular GM1 foi incorporado com sucesso na bicamada de PC adsorvida na sílica, e sua função de reconhecimento receptor-ligante foi reconstituída quantitativamente com a ligação da toxina da cólera ao GM1 incorporado nas partículas biomiméticas.

A adsorção de DPPC na superfície da sílica hidrofílica aumentou com a força iônica do meio e ocorreu possivelmente na forma de vesículas inteiras aderidas à superfície da partícula, sem rompimento da estrutura vesicular rígida, ocorrendo maior adsorção de vesículas quanto maior a força iônica do meio.

A partir da interação de vesículas mistas de DPPC e DODAB com partículas de sílica pode-se concluir que o DODAB causa uma modulação da adsorção de DPPC na superfície de sílica. Em valores elevados de % DODAB, este mostrou uma preferência pela superfície da partícula e o DPPC por vesículas livres em solução. Quanto maior a proporção de DODAB adicionada, menor a quantidade de DPPC adsorvido. A proporção molar DODAB/DPPC pode

se mostrar uma maneira útil de otimizar a deposição de bicamadas lipídicas em estado gel na superfície de partículas de sílica.

5 – Perspectivas

- Continuar o estudo de imobilização da ACT nas partículas híbridas de PMMA/CMC utilizando imobilização química do anticorpo com o uso do reagente SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), que adiciona um grupo –SH à amina primária da cadeia lateral do aminoácido lisina, permitindo assim que o anticorpo seja ancorado covalentemente à partícula.

- Iniciar a verificação da viabilidade do sistema de detecção GM1/CT/ACT bipartícula, em busca dos reconhecimentos GM1/CT e CT/ACT, da estabilidade dos componentes e da consequente agregação das partículas ancoradas indicando a presença da toxina.

- Otimização dos estudos de adsorção de DPPC modulada pela presença do anfifílico catiônico DODAB na superfície de partículas de sílica, com a utilização de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para análise das transições de fase e microscopia de força atômica para caracterização da superfície das bicamadas mistas.

6 – Referências bibliográficas

BANGHAM, A.D.; DE GIER, J.; GREVILLE, G.D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. **Chem. Phys. Lipids** 1 (3): 225-246 MAY 1967.

BATZRI, S; KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochim. Biophys. Acta** 298 (4): 1015-1019 APR 16 1973.

BLANDAMER, M.J.; BRIGGS, B.; CULLIS, P.M.; ENGBERTS, J.B.F.N. Gel to liquid-crystal transitions in synthetic amphiphile vesicles. **Chem. Soc. Rev.** 24 (4): 251-257 AUG 1995.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **J. Am. Chem. Soc.** 60 (2): 309-319 FEB 1938.

BROOKHAVEN, INSTRUMENTS CORPORATION. **Instruction Manual for BI-MAS Multi Angle Sizing Option on the ZetaPlus.** Brookhaven Corporate Park, Holtsville NY USA 1995.

BROOKHAVEN, INSTRUMENTS CORPORATION. **Instruction Manual for ZetaPlus Zeta Potential Analyzer.** Brookhaven Corporate Park, Holtsville NY USA 1997.

BUCAK, S.; JONES, D.A.; LAIBINIS, P.E.; HATTON, T.A. Protein separations using colloidal magnetic nanoparticles. **Biotechnol. Prog.** 19 (2): 477-484 APR 2003.

BURANDA, T.; HUANG, J.; RAMARAO, G.V.; ISTA, L.K.; LARSON, R.S.; WARD, T.L.; SKLAR, L.A.; LOPEZ, G.P. Biomimetic molecular assemblies on glass and mesoporous silica microbeads for biotechnology. **Langmuir** 19 (5): 1654-1663 MAR 4 2003.

CANTOR, C.H.; SCHIMMEL, P.R. **Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the**

Study of Biological Structure and Function. W.H. Freeman Chemistry & Company, San Francisco, 1980.

CANTU, L.; CORTI, M.; CASELLATO, R.; ACQUOTTI, D.; SONNINO, S. Aggregation properties of GD1b, $II^3Neu5Ac_2GgOse_4Cer$, and of GD1b-lactone, II^3[α-Neu5Ac-(2→8, 1→9)-α-Neu5Ac]$GgOse_4Cer$, in aqueous solution. **Chem. Phys. Lipids** 60 (2): 111-118 DEC 1991.

CASTRO, L.B.R.; SOARES, K.V.; NAVES, A.F.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; PETRI, D.F.S. Synthesis of stable polystyrene and poly(methyl methacrylate) particles in the presence of carboxymethyl cellulose. **Ind. Eng. Chem. Res.** 43 (24): 7774-7779 NOV 24 2004.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 733 (1): 172-179 AUG 24 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., YOSHIDA, L.S.; SESSO, A.; CHAIMOVICH, H. Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. **J. Colloid Interf. Sci.** 100 (2): 433-443 AUG 1984.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CASTUMA, C.E.; SESSO, A.; SCHREIER, S. Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions. **J. Phys. Chem.** 95 (13): 5361-5366 JUN 27 1991.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. **Chem. Soc. Rev.** 21 (3): 209-214 SEP 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Does DLVO account for interaction between charged spheric

vesicles? **J. Phys. Chem.** 96 (23): 9555-9557 NOV 12 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; MIDMORE, B.R. Synthetic bilayer adsorption onto polystyrene microspheres. **Langmuir** 8 (3): 801-806 MAR 1992.

CARMORNA-RIBEIRO, A.M. Interaction between charged spherical vesicles. **J. Phys. Chem.** 97 (45): 11843-11846 NOV 11 1993.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Reply to comment on "Does DLVO account for interaction between charged spheric vesicles?" **J. Phys. Chem.** 97 (16): 4247-4247 APR 22 1993.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer vesicles and liposomes as interface agents. **Chem. Soc. Rev.** 30: 241-247 2001.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer-forming synthetic lipids: drugs or carriers? **Curr. Med. Chem.** 10 (22): 2425-2446 NOV 2003.

CREMER, P.S.; BOXER, S.G. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. **J. Phys. Chem. B** 103 (13): 2554-2559 APR 1 1999.

CUATRECASAS, P. Interaction of Vibrio cholerae enterotoxin with cell membranes. **Biochemistry** 12 (18): 3547–3558 AGO 28 1973.

CUTLER, P. Protein arrays: The current state-of-the-art. **Protemoics** 3 (1): 3-18 JAN 2003.

DAMAS, C.; ADIBNEJAD, M.; BENJELLOUN, A.; BREMBILLA, A.; CARRÉ, M.N.; VIRIOT, M.L.; LOCHON, P. Fluorescent probes for detection of amphiphilic polymer hydrophobic microdomains: A comparative study between pyrene and molecular rotors. **Colloid Polym. Sci.** 275 (4): 364-371 1997.

DEAMER, D.; BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method.

Biochim. Biophys. Acta 443 (3): 629-634 SEP 7 1976.

DEGUSSA S/A. Basic characteristics of AEROSIL®. **Technical Bulletin Pigments** (4): 11 1993.

EIBL, H.; BLUME, A. The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 553 (3): 476-488 JUN 2 1979.

EVANS, D.F.; WENNERSTRÖM, H. **The Colloidal Domain – Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet.** (1): VHC Publishers, Inc. 1994.

FISCHER, A.; HOUZELLE, M.C.; HUBERT, P.; AXELOS, A.V.; GEOFFROY-CHAPOTOT, C.; CARRÉ, M.C.; VIRIOT, M.L.; DELLACHERIE, E. Detection of intramolecular associations in hydrophobically modified pectin derivatives using fluorescent probes. **Langmuir** 14 (16): 4482-4488 AUG 4 1998.

FISHMAN, P.H.; BRADLEY, R.M.; MOSS, J.; MANGANIELLO, V.C. Effect of serum on ganglioside uptake and choleragen responsiveness of transformed mouse fibroblasts. **J. Lipid Res.** 19 (1): 77-81 JAN 1978.

GENNIS, R.B. **Biomembranes: Molecular Structure and Function.** New York, Springer Verlag Inc. 1989.

GILES, C.H.; MACEWAN, T.H.; NAKHWA, S.N.; SMITH, D. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solutions adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of specifics surface areas of solids. **J. Chem. Soc.** 1: 3973-3993 OCT 1960.

GRANELI, A.; RYDSTROM, J.; KASEMO, B.; HOOK, F. Formation of supported lipid bilayer membranes on SiO_2 from proteoliposomes containing transmembrane proteins.

Langmuir 19 (3): 842-850 FEB 4 2003.

GROVES, J.T.; BOXER, S.G. Micropattern formation in supported lipid membranes. **Acc. Chem. Res.** 35 (3): 149-157 MAR 2002.

HANUS, L.H.; PLOEHN, H.J. Conversion of intensity-averaged photon correlation spectroscopy measurements to number-averaged particle size distributions. 1. Theoretical development. **Langmuir** 15 (9): 3091-3100 APR 27 1999.

HELM, C.A.; ISRAELACHVILI, J.N.; McGUIGGAN, P.M. Molecular mechanism and forces involved in the adhesion and fusion of amphiphilic bilayers. **Science** 246 (4932): 919-922 NOV 17 1989.

HIEMENZ, P.C. **Principles of Colloid and Surface Chemistry.** (2): New York, Marcel 1986.

HOLMGREN, J.; LYCKE, N.; CZERKINSKY, C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. **Vaccine** 11 (12): 1179-1184 SEP 1993.

HUANG, C.H. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. **Biochemistry** 8 (1): 344-352 JAN 1969.

ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and Surface Forces.** (2): London, Academic Press 1992.

ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL D.J., NINHAM B.W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 470 (2): 185-201 OCT 17 1977.

ISRAELACHVILI, J.N; WENNERSTRÖM, H. Hydration of steric forces between amphiphilic surfaces. **Langmuir** 6 (4): 873-876 APR 1990.

JACKSON, S.; REBOIRAS, M.D.; LYLE, I.G.; JONES, M.N. Adsorption of phospholipid vesicles on solid surfaces. **Faraday Discuss. Chem. Soc.** 81: 291-301 1986.

JASS, J.; TJÄRNHAGE, T.; PUU, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. **Biophys. J.** 79 (6): 3153-3163 DEC 2000.

JAURAND M.C.; BAILLIF P.; THOMASSIN J.H.; MAGNE, L.; TOURAY, J.C. X-ray photoelectron-spectroscopy and chemical study of the adsorption of biological molecules on chrysotile asbestos surface. **J. Colloid. Interf. Sci.** 95 (1): 1-9 SEP 1983.

JEON, S.I; LEE, J.H.; ANDRADE, J.D.; deGENNES, P.G. Protein surface interactions in the presence of polyethylene oxide. 1. Simplified theory. **J. Colloid Interf. Sci.** 142 (1): 149-158 MAR 1 1991.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. **J. Am. Chem. Soc.** 99 (7): 2039-2044 MAR 30 1977.

KANO, K.; ROMERO, A.; DJERMOUNI, B.; ACHE, H.; FENDLER, J.H. Characterization of surfactant vesicle as membrane mimetic agents. 2. Temperature-dependent changes of the turbidity, viscosity, fluorescence polarization of 2-methylanthracene, and positron annihilation in sonicated dioctadecyldimethylammonium chloride. **J. Am. Chem. Soc.** 101 (15): 4030-4037 JUL 18 1979.

KARLSSON, K.A. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 58, 309-350 JUL 1989.

KÄSBAUER, M.; JUNGLAS, M.; BAYERL, M.T. Effect of cationic lipids in the formation

of asymmetries in supported bilayers. **Biophys. J.** 76 (5): 2600-2605 MAY 1999.

KELLER, C.A.; GLASMÄSTAR, K.; ZHDANOV, V.P.; KASEMO, B. Formation of supported membranes from vesicles. **Phys. Rev. Lett.** 84 (23): 5443-5446 JUN 5 2000.

KELLY, D.; GRACE, K.M.; SONG, X.; SWANSON, B.I.; FRAYER, D.; MENDES, S.B.; PEYGHAMBARIAN, N. Integrated optical biosensor for detection of multivalent proteins. **Optics Letters** 24 (23): 1723-1725 DEC 1 1999.

KLEE, B.; JOHN, E.; JÄHNIG, F. A biosensor based on the membrane protein lactose permease. **Sensors and Actuators B** 7 (1-3): 376-379 MAR 1992.

KONDO, A.; HIGASHITANI, K. Adsorption of model proteins with wide variation in molecular properties on colloidal particles. **J. Colloid interface Sci.** 150 (2): 344-351 MAY 1992.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y.; TAMAKI, K.; KUMAMARU, F.; TAKAYANAGI, M. Formation of the bilayer membrane from a series of quaternary ammonium salts. **Chem. Lett.** 4: 387-390 1977.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** New York, Plenum Press 1983.

LASIC, D.D. Sterically stabilized vesicles. **Angew. Chem. Int. Edit. Engl.** 33 (17): 1685-1698 SEP 16 1994.

LARSSON, C.; BRAMFELDT, H.; WINGREN, C.; BORREBAECK, C.; HÖÖK, F. Gravimetric antigen detection utilizing antibody-modified lipid bilayers. **Anal. Biochem.** 345 (1): 72-80 OCT 1 2005.

LEE, A.G. Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipids phase transition. **Biochim. Biophys. Acta** 472 (2): 237-281 1977.

LEE, G.; DICK, D.; VASQUEZ, E.-M.; WERNER, K. **Drug Develop. Industr. Pharm.** 15 (4): 649 1989.

LEE, T.-H.; MOZSOLITS, H.; AGUILAR, M.-I. Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors. **J. Peptide Res.** 58 (6): 464-476 DEC 2001.

LENCER, W.I.; HIRST, T.R.; HOLMES, R.K. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. **Biochim. Biophys. Acta.** 1450 (3): 177-190 JUL 8 1999.

LEONARD, M. New packing materials for protein chromatography. **J. Chromatogr. B** 699 (1-2): 3-27 OCT 10 1997.

LEONENKO, Z.V.; CARNINI, A.; CRAMB, D.T. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. **Biochim. Biophys. Acta** 1509 (1-2): 131-147 DEC 20 2000.

LI, B.Q.; RUCKENSTEIN, E. Adsorption of ionic surfactants on charged solid surfaces from aqueous solutions. **Langmuir** 12 (21): 5052-5063 OCT 16 1996.

LIGLER, F.S.; TAITT, C.R.; SHRIVER-LAKE, L.C.; SAPSFORD, K.E.; SHUBIN, Y.; GOLDEN, J.P. Array biosensor for detection of toxins. **Anal. Bioanal. Chem.** 377 (3): 469-477 OCT 2003.

LINSEISEN, F.M.; BAYERL, S.; BAYERL, T.M. ^{2}H-NMR and DSC study of DPPC-DODAB mixtures. **Chem. Phys. Lipids** 83 (1): 9-23 SEP 16 1996.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR. A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193 (1): 265-275 NOV 1951.

LUCKHAM, P.; WOOD, J.; FROGATT, S.; SWART, R. The Surface Properties of Gangliosides: I. Monolayer Properties. **J. Colloid Interface Sci.** 156 (1): 164-172 MAR 1 1993.

MAHANTY, I.; NINHAM, B.W. **Dispersion Forces.** New York, Academic Press 1976.

MAJEWSKI, J.; KUHL, T.L.; KJAER, K.; SMITH, G.S. Packing of ganglioside-phospholipid monolayers: An x-ray diffraction and reflectivity study. **Biophys. J.** 81 (5): 2707-2715 NOV 2001.

MEKALANOS, J.J.; COLLIER, R.J.; ROMIG, W.R. Enzymic activity of cholera toxin. II. Relationships to proteolytic processing, disulfide bond reduction, and subunit composition. **J. Biol. Chem.** 254 (13): 5855-5861 JUL 10 1979.

MERRITT, E.A.; HOL, W.G. AB_5 toxins. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 5 (2): 165-171 APR 1995.

MERRITT, E.A.; SARFATY, S.; VAN DEN AKKER, F.; L'HOIR, C.L.; MARTIAL, J.A.; HOL, W.G. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. **J. Protein Sci.** 3 (2): 166-175 FEB 1994.

MERRITT, E.A.; KUHN, P.; SARFATY, S.; ERBE, J.L.; HOLMES, R.K.; HOL, W.G. The 1.25 Å resolution refinement of the cholera toxin B-pentamer: evidence of peptide backbone strain at the receptor-binding site. **J. Mol. Biol.** 282 (5): 1043-1059 OCT 9 1998.

MILLER, C.E.; MAJEWSKI, J.; FALLER, R.; SATIJA, S.; KUHL, T.L. Cholera toxin assault on lipid monolayers containing ganglioside GM1. **Biophys. J.** 86 (6): 3700-3708 JUN

2004.

MILLER-PODRAZA, H.; BRADLEY, R.M.; FISHMAN, P.H. Biosynthesis and localization of gangliosides in cultured cells. **Biochemistry** 21 (14): 3260-3265 JUL 6 1982.

MILONJIĆ, S. Determination of surface ionization and complexation constants at colloidal silica/electrolyte interface. **Colloid. Surface.** 23 (4): 301-312 APR 1987.

MORNET, S.; LAMBERT, O.; DUGUET, E.; BRISSON, A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. **Nano Letters** 5 (2): 281-285 FEB 2005.

MORTARA, R.A.; QUINA, F.H.; CHAIMOVICH, H. Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester - Preparation and some properties of vesicles of dihexadecyl phosphate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 81 (4): 1080-1086 APR 28 1978.

MORTIMER, C. **Chemistry-A Conceptual Approach** (2): New York, D. Van Nostrand Company 1971.

MOSS, J.; FISHMAN, P.H.; MANGANIELLO, V.C.; VAUGHAN, M.; BRADY, R.O. Functional incorporation of ganglioside into intact cells: induction of choleragen responsiveness. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 73 (4): 1034-1037 APR 1 1976.

MOURA, S.P. **Bicamadas catiônicas em sílica: adsorção e estabilidade coloidal a baixa força iônica.** Dissertação de Mestrado. São Paulo; Instituto de Química, Universidade de São Paulo 2003.

MURASE, N.; GONDA, K. Adsorption of liposomes by clay. **J. Biochem.** Tokyo 92 (1): 271-273 JUL 1982.

OTTEWILL, R.H. Introduction in: **Surfactants** TADROS, T.F. London, Academic Press: 1-18 1984.

PANSU, R.M.; ARRIO, B.; RONCIN, J.; FAURE, J. Vesicles versus membrane fragments in DODAC suspensions. **J. Phys. Chem.** 94 (2): 796-801 JAN 25 1990.

PICKING, W.L.; MOON, H.; WU, H., PICKING, W.D. Fluorescence analysis of the interaction between ganglioside GM1-containing phospholipid vesicles and the B subunit of cholera toxin. **Biochim Biophys Acta.** 1247 (1): 65-73 FEB 22 1995.

RAPUANO, R.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Physical adsorption of bilayer membranes on silica. **J. Colloid Interface Sci.** 193 (1): 104-111 SEP 1 1997.

RAPUANO, R.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Supported bilayers on silica. **J. Colloid Interface Sci.** 226 (2): 299-307 JUN 15 2000.

RAPUANO, R. **Interações entre vesículas sintéticas ou fosfolipídicas e superfícies de óxido de silício.** Dissertação de Mestrado. São Paulo; Instituto de Química, Universidade de São Paulo 2000.

REINL, H.M.; BAYERL, T.M. Lipid transfer between small unilamellar vesicles and single bilayers on a solid support: self-assembly of supported bilayers with asymmetric lipid distribution. **Biochemistry** 33 (47): 14091-14099 NOV 29 1994.

REVIAKINE, .I; BRISSON, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. **Langmuir** 16 (4): 1806-1815 2000.

ROUSER, G.; FLEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus

analisys of spots. **Lipids** 5 (5): 494-496 MAY 1970.

ROWE-TAITT, C.A.; CRAS, J.J.; PATTERSON, C.H.; GOLDEN, J.P.; LIGLER, F.S. A ganglioside-based assay for cholera toxin using an array biosensor. **Anal. Biochem.** 281 (1): 123-133 MAY 15 2000.

SCHALES, O.; SCHALES S.S. A simple and accurate method for determination of chloride in biological fluids. **J. Biol. Chem.** 140 (3): 879-884 SEP 1 1941.

SCHULLERY, S.E.; GARZANITI, J.P. Studies on phosphatidylcholine models membranes. I. Size-Heterogeneity effect on permeability measurements. **Chem. Phys. Lipids** 12 (2): 75-95 APR 1974.

SCHWARZMANN, G.; HOFFMANN-BLEIHAUER, P.; SCHUBERT, J.; SANDHOFF, K.; MARSH, D. Incorporation of ganglioside analogues into fibroblast cell membranes. A spin-label study. **Biochemistry** 22 (21): 5041-5048 OCT 11 1983.

SEARS, G.W. Determination of specific surface area colloidal silica by titration with sodium hydroxide. **Anal. Chem.** 28 (12): 1981-1983 DEC 1956.

SHARMA, B.G.; BASU, S.; SHARMA, M.M. Characterization of adsorbed ionic surfactants on a mica substrate. **Langmuir** 12 (26): 6506-6512 DEC 25 1996.

SHARP, J.M.; DURAN, R.S.; DICKINSON, R.B. Direct measurement of forces between a colloidal particle and a phospholipid bilayer. **J. Colloid Interface Sci.** 299 (1): 182-190 JUL 1 2006.

SHILLCOCK, J.C.; LIPOWSKY, R. Equilibrium structure and lateral stress distribution of amphiphilic bilayers from dissipative particle dynamics simulations. **J. Chem. Phys.** 117 (10): 5048-5061 SEP 8 2002.

SHRIVER-LAKE, L.C.; DONNER, B; EDELSTEIN, R.; BRESLIN, K.; BHATIA, S.K.; LIGLER, F.S. Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers. **Biosens. Bioelectron.** 12 (11): 1101-1106 NOV 1997.

SICCHIEROLLI, S.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Incorporation of the cholera-toxin receptor in phospholipid-covered polystyrene microspheres. **Colloid. Surface. B** 5 (1-2): 57-61 SEP 25 1995.

SICCHIEROLLI, S.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Biomolecular recognition at phospholipid-covered polystyrene microspheres. **J. Phys. Chem. B** 100 (41): 16771-16775 OCT 10 1996.

SONNINO, S.; ACQUOTTI, D.; RIBONI, L.; GIULIANI, A.; KIRSCHNER, G.; TETTAMANTI, G. New chemical trends in ganglioside research. **Chem. Phys. Lipids** 42 (1-3): 3-26 DEC 15 1986.

SUGAO, N.; SUGAWARA, M.; MINAMI, H.; UTO, M.; UMEZAWA, Y. Na^+/D-Glucose cotransporter based bilayer lipid membrane sensor for D-Glucose. **Anal. Chem.** 65 (4): 363-369 FEB 15 1993.

SUH, C.W; KIM, M.Y.; CHOO, J.B.; KIM, J.K.; LEE, E.K. Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy. **J. Biotec.** 112 (3): 267-277 SEP 9 2004.

TADROS, T.F.; LYKLEMA, J. Adsorption of potential-determining ions at the silica-aqueous electrolyte interface and the role of some cations. **J. Electroanal. Chem.** 17 (3-4): 267-& 1968.

TURNBULL, W.B.; PRECIOUS, B.L.; HOMANS, S.W. Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM_1 interaction by isothermal titration calorimetry. **J. Am. Chem. Soc.** 126 (4): 1047-1054 FEB 4 2004.

VIKHOLM, I.; ALBERS, W.M. Oriented immobilization of antibodies for immunosensing. **Langmuir** 14 (14): 3865-3872 JUL 7 1998.

VIJAYENDRAN, R.A.; LECKBAND, D.E. A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins. **Anal. Chem.** 73 (3) FEB 1 2001.

VISWANATHAN, S.; WU, L.C.; HUANG, M.R.; HO, J.A. Electrochemical immunosensor for cholera toxin using liposomes and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated carbon nanotubes. **Anal. Chem.** 78 (4): 1115-1121 FEB 15 2006.

WADU-MESTHRIGE, K.; AMRO, N.A.; LIU, G.Y. Immobilization of proteins on self-assembled monolayers. **Scanning** 22 (6): 380-388 NOV-DEC 2000.

WÄNGNERUD, P.; JÖNSSON, B. Adsorption of ionic amphiphiles as bilayers on charged surfaces. **Langmuir** 10 (9): 3268-3278 SEP 1994.

ZHOU, J.; TSAO, H.K.; SHENG, Y.J.; JIANG, S. Monte Carlo simulations of antibody adsorption and orientation on charged surfaces. **J. Chem. Phys.** 121 (2): 1050-1057 JUL 8 2004.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

- Origem: brasileiro - Estado civil: solteiro - Nascimento: 17/01/1977
- Endereço: Rua Pintassilgo 426, ap. 83 - Moema - São Paulo - CEP - 01422001
- Telefone: (11) 55351301 / (11) 82416870 - E-mail: spmoura@yahoo.com

Escolaridade

1982 - 1994	Colégio São Luís (11) 3138-9600 - 1º e 2º graus completos.
1994 - 2000	Fundação Armando Álvares Penteado (11) 3662-1662 - Engenheiro Químico formado pela Faculdade de Engenharia da Fundação Armando Álvares Penteado (FEFAAP): *"Otimização da produção de vinho industrial"*
Ago.2001 - ago.2003	Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - USP (11) 30913810 - Secretaria de Bioquímica. - Título de Mestrado em Bioquímica (área de biocolóides): *"Bicamadas Catiônicas em Sílica: Adsorção e Estabilidade Coloidal a Baixa Força Iônica"*
Set.2003 - set.2006	Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - USP (11) 30913810 - Secretaria de Bioquímica. - Título de Doutorado em Bioquímica (área de biocolóides): *"Adsorção ótima de bicamada fosfolipídica sobre sílica e reconstituição do reconhecimento receptor-ligante"*

Experiência Adquirida

Mar.2000 - nov.2000	Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (11) 30615544 - Estágio em laboratório de pesquisa biotecnológica. Atuação em um projeto que visava o desenvolvimento de uma nova terapia gênica para o tratamento de tumores de pele.
Ago.2001 - set.2006	Departamento de Bioquímica – IQUSP (11) 30913810 - Desenvolvimento de pesquisa biotecnológica em paralelo com os cursos de mestrado e doutorado. Realização de projeto que caracterizou o mecanismo de deposição de bicamadas lipídicas na superfície de partículas sólidas de óxido de silício com o objetivo de criar uma base científica para a criação de sistemas biosensores de maior precisão.

Trabalhos Publicados

Out.2000	*'In Vivo transfection of SP1 transcription factor decoy in melanoma tumor'*. NOVAK, EM; BRANDINE, C; CARMO, AO; **MOURA, S**; NERY, A; BADRA, C; BYDLOWSKI, SP - The Journal of Gene Medicine Supplement, 2 (5): 98 OCT 2000. Resumo
Ago.2003	*'Cationic Bilayer Fragments on Silica at Low Ionic Strength: Competitive Adsorption and Colloid Stability'*. **MOURA, SP**; CARMONA-RIBEIRO, AM - Langmuir, 19 (17): 6664 - 6667 AUG 19 2003. Completo
Out.2005	*'Biomimetic particles: Optimization of phospholipid bilayer coverage on silica and colloid stabilization'*. **MOURA, SP**; CARMONA-RIBEIRO, AM - Langmuir, 21 (22): 10160 - 10164 OCT 2005. Completo
Fev.2006	***'**Cationic Lipid Modulates Phospholipid Adsorption on Silica'*. **MOURA, SP**; CARMONA-RIBEIRO, AM - Materials Research Society Symposium Proceedings, 900E: 0900-O03-35 FEV 2006. Completo
Ago.2006	*'Biomimetic particles for isolation and reconstitution of receptor function'*. **MOURA, SP**; CARMONA-RIBEIRO, AM - Cell Biochemistry and Biophysics, 44 (3): 446 - 452 2006. Completo

Trabalhos Apresentados

7-10 Out 2000	*'In Vivo transfection of SP1 transcription factor decoy in melanoma tumor'* NOVAK, EM; BRANDINE, C; CARMO, AD; MOURA, S; NERY, A; BADRA, C; BYDLOWSKI, SP. Em: 8th Meeting of the European Society of Gene Therapy, Estocolmo, Suécia. Por: Novak, EM.
17-20 Mai 2003	*'The Effect of Cationic Bilayers on Colloid Stability of Silica'* MOURA, SP; CARMONA-RIBEIRO, AM. Em: XXXII Reunião Anual da SBBq, Caxambú, MG, Brasil. Por: Moura, SP.
15-19 Set 2003	*'Adsorption of cationic bilayer fragments on silica'* MOURA, SP; CARMONA-RIBEIRO, AM. Em: 11th International Conference on Surface and Colloid Science, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Por: Carmona-Ribeiro, AM.
8-12 Nov 2004	*'Biomimetic particles for isolation and reconstitution of receptor function'* MOURA, SP; CARMONA-RIBEIRO, AM. Em: 1st Latin American Protein Society Meeting, Angra dos Reis, RJ, Brasil. Por: Moura, SP.
2-5 Jul 2005	*'Biomimetic Particles: Optimization of Phospholipid Bilayer Coverage on Silica and Colloid Stabilization'* MOURA, SP; CARMONA-RIBEIRO, AM. Em: XXXIV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, SP, Brasil. Por: Moura, SP.
28 Nov-2 Dez 2005	*'Cationic lipid modulates phospholipid adsorption on silica'* MOURA, SP; CARMONA-RIBEIRO, AM. Em: 2005 Materials Research Society Fall Meeting, Boston, MA, Estados Unidos. Por: Moura, SP.

Idiomas

Inglês avançado - comunicação ampla, com obtenção dos certificados de proficiência CAE (Certificate in Advanced English) pela Universidade de Cambridge e TOEFL (Test of English as a Foreign Language).

Biomimetic Particles: Optimization of Phospholipid Bilayer Coverage on Silica and Colloid Stabilization†

Sérgio P. Moura and Ana M. Carmona-Ribeiro*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, P.O. Box 26077, 05513-970 São Paulo, SP, Brazil

Received February 21, 2005. In Final Form: May 17, 2005

The effect of ionic strength and pH on phosphatydilcholine (PC) adsorption from vesicles on silica nanoparticles was investigated over a range of NaCl concentrations (0.1−150 mM) at pH 6.3 and 7.4 from determination of adsorption isotherms, colloid stability, particle sizing, and ζ-potentials. At and above 10 mM ionic strength, pH 6.3, high-affinity adsorption isotherms with limiting adsorption indicative of one-bilayer deposition on each silica particle were obtained. At 10 mM ionic strength, adsorption isotherms indicated lower affinity between PC and silica at pH 7.4 than at pH 6.3, suggesting a role of hydrogen bonding between silanol on silica and phosphate on PC in promoting bilayer deposition at low pH. Under conditions where high affinity and bilayer deposition were achieved, silica sedimentation documented from photographs was absent, suggesting particle stabilization induced by bilayer coverage. However, at physiological (150 mM NaCl) or close to physiological ionic strength (140 mM NaCl), the large colloid stability similarly achieved at pH 6.3 or 7.4 suggested the major role of van der Waals attraction between the PC bilayer vesicle and silica particle in determining bilayer deposition. The effect of increasing ionic strength was increasing van der Waals attraction, which caused PC vesicle disruption with bilayer deposition and bilayer-induced silica stabilization.

Introduction

Over the last two decades membrane-derivatized colloidal systems have been introduced as potential applications to a broad set of problems involving chemical events on cell membrane surfaces.[1−3] These ranged from mapping ligand interactions with numerous cell surface proteins to detection of membrane-targeting bacterial toxins and viruses. Indeed, the use of membrane coatings on colloidal particles offers an extensive repertoire of chemical functionality.[4−6] However, not always the interaction between bilayer vesicles and mineral surfaces produced the desired spreading of lipid bilayers on the supports.[7−11] Membrane propagation was impeded at high pH or on highly curved surfaces.[7,9] Different oxides exhibited different affinities for lipid bilayers; e.g., aluminum oxide inhibited vesicle fusion so that micropatterns of different oxides on a surface produced micropatterned supported bilayers.[8] Conversely, different lipids also exhibited different affinities for hydrophilic silica particles. Quantitative data on lipid adsorption at ionic strengths lower than 10 mM showed deceptively low affinity between silica and an important lipid such as phosphatidylcholine (PC) over a range of pH values.[7,10] Bilayer deposition was absent,[7,10] while vesicles remained adhered to the surface without vesicle rupture.[11] On the other hand, the cationic lipid dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB), a bilayer-forming synthetic compound, adsorbed on silica with high affinity at low ionic strength.[7,10,12−14]

The bilayer−oxide surface interaction has also been evaluated from a crystal chemical and thermodynamic basis, predicting the correct sequence of membranolytic ability for the oxides: quartz > amorphous SiO_2 > Al_2O_3 > Fe_2O_3 > TiO_2.[15] Membrane rupture requires unfavorable (negative) adsorption entropy of the quaternary ammonium moiety (TMA^+) of the lipid and favorable Gibbs free energy of exchange between TMA^+ and the ambient Na^+ ions to maximize the extent of bilayer affected.[15] For amorphous silica, the entropic variation was positive and bilayer disruption was limited, even though the total variation in Gibbs free energy was negative.[15] Simultaneously, Jones and co-workers performed a microcalorimetric study at pH 7.4, 25 °C, and physiological ionic strength and found exothermic interactions for bilayer vesicles and SiO_2 or TiO_2.[16] The enthalpic term of the Gibbs free energy compensated the entropic one, and no effect of bilayer charge on Gibbs free energies of adsorption at 150 mM ionic strength was observed.[16]

In this work, our strategy was to optimize the PC vesicle disruption step required for bilayer adsorption from vesicles onto particles by increasing the ionic strength (0−150 mM NaCl), thereby increasing van der Waals attraction between the silica particle and PC bilayer. In fact, at and above 10 mM ionic strength at two different pH values, 6.3 and 7.4, PC adsorption from PC vesicles onto silica produced high-affinity adsorption isotherms with limiting adsorption consistent with one-bilayer

† Part of the special issue "Bob Rowell Festschrift".

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 55 11 3091 3810, ext 237. Fax: 55 11 3818 5579. E-mail: mcribeir@quim.iq.usp.br.

(1) Bayerl, T. M. *Nature* **2004**, *427*, 105.
(2) Baksh, M. M.; Jaros, M.; Groves, J. T. *Nature* **2004**, *427*, 139.
(3) Carmona-Ribeiro, A M. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2425.
(4) Groves, J. T.; Boxer, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 149.
(5) Seddom, A. M.; Patel, H. M.; Burkett, S. L.; Mann, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2988.
(6) Carmona-Ribeiro, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 241.
(7) Rapuano, R.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 104.
(8) Groves, J. T.; Ulman, N.; Cremer, P. S.; Boxer, S. G. *Langmuir* **1998**, *14*, 3347.
(9) Cremer, P. S.; Boxer, S. G. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554.
(10) Rapuano, R.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *226*, 299.
(11) Bennett, T. C.; Creeth, J. E.; Jones, M. N. *J. Liposome Res.* **2000**, *10*, 303.
(12) Esumi, K.; Sugimuro, T.; Yamada, T.; Meguro, K. *Colloids Surf., A* **1992**, *62*, 249.
(13) Esumi, K.; Yamada, T. *Langmuir* **1993**, *9*, 622.
(14) Moura, S. P.; Carmona-Ribeiro, A M. *Langmuir* **2003**, *19*, 6664.
(15) Sahai, N. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *252*, 309.
(16) Scott, M. J.; Jones, M. N. *Colloids Surf., A* **2002**, *207*, 69.

10.1021/la0504614 CCC: $30.25 © 2005 American Chemical Society
Published on Web 07/07/2005

Table 1. Mean ζ-Average Diameters (D_z), Polydispersities, and ζ-Potentials for PC Vesicles and Silica Particles Dispersed in Pure Water, pH 6.5[a]

sample	mean D_z (nm)	polydispersity	ζ (mV)	SSA[b] (m^2/g)	mean A[c] (nm^2)
0.1 mg/mL silica	292 ± 2	0.186 ± 0.025	−35 ± 1	47	
2 mM PC	70 ± 1	0.182 ± 0.016	0 ± 2		0.7

[a] The low scattering intensity obtained for small unilamellar PC vesicles was the reason for employing a relatively large PC concentration, 2 mM, for the determining mean vesicle size. [b] SSA is the mean specific surface area on silica as determined from potentiometric titration. [c] Mean A is the mean molecular area for PC at the air−water interface.

deposition on silica and high colloidal stability as determined from dynamic light scattering and absence of particle sedimentation over a range of PC or NaCl concentrations. Optimal bilayer deposition induced colloid stabilization.

Experimental Section

Materials. Egg PC (type XIII-E) and tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride (Tris−HCl) were obtained from Sigma. Silica AEROSIL OX-50 was obtained from Degussa (batch 0725, Degussa AG GB AC, D-6000 Frankfurt) with a 50 nm mean particle diameter from electron transmission microscopy and 50 m^2/g specific surface area as provided by the supplier. From routine measurements by dynamic light scattering, silica particles presented extensive aggregation with a mean aggregate diameter around 300 nm (Table 1), though its specific surface area determined as 47 m^2/g by potentiometric titration[17] remained similar to the 50 m^2/g provided by the supplier. Before use, the silica powder was routinely redispersed by sonication with the tip (85 W/15 min) in pure water or NaCl solutions in the presence or absence of 10 mM Tris−HCl buffer. The particle mean diameter after redispersion is shown in Table 1. Water was of Milli-Q quality.

Preparation of Small Unilamellar PC Vesicles. Small unilamellar PC vesicles with a 70−80 nm mean diameter (Table 1), as determined from dynamic light scattering, were prepared by ethanolic injection[18] in pure water or NaCl solutions in the presence or absence of 10 mM Tris−HCl buffer, according to the desired experimental conditions of ionic strength and pH. Injection was followed by dialysis (2 h against 2 × 0.5 L of the same medium, changing the medium every hour) to eliminate ethanol and centrifugation (1 h/14000 rpm/25 °C) to remove multilamellar vesicles. The PC concentration was determined by inorganic phosphorus analysis.[19]

Determination of the PC Adsorption Isotherm on Silica. PC adsorption on silica was induced by mixing vesicles and particles. The mixtures were incubated (1 h/25 °C) and centrifuged (14000g/1 h/15 °C) to separate the particles from the vesicles, and the supernatant was used to determine the PC concentration in the supernatant by inorganic phosphorus analysis.[19] The total surface area of silica in each mixture was calculated from its specific surface area (47 m^2/g). The adsorption isotherm for PC onto silica particles was obtained from inorganic phosphorus analysis of the supernatants and original vesicle dispersion. The sensitivity of PC analysis was 10 nM. PC adsorption on silica was expressed as the number of phospholipid molecules adsorbed per square meter of silica. The limiting adsorption and area per adsorbed molecule were determined from the plateau level on the isotherm considering that one PC molecule occupies 0.7 nm^2 at the air−water interface. For isotherms displaying a Langmuirian shape, linearizations were performed to obtain affinity constants (k) and adsorption maxima $(x/m)_{max}$ over a range of experimental conditions.[20,21]

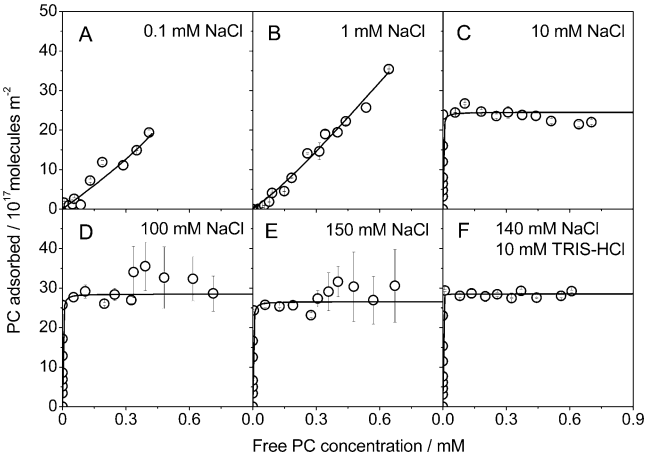


Figure 1. PC adsorption isotherms from vesicles onto silica (1 mg/mL) in 0.1 (A), 1 (B), 10 (C), 100 (D), and 150 (E) mM NaCl at pH 6.3 or in 140 mM NaCl plus 10 mM Tris−HCl at pH 7.4 (F). Mixtures were incubated at 25 °C for 1 h before centrifugation and determination of PC in the supernatant.

Determination of the Mean ζ-Average Diameters and ζ-Potentials for Particles, Vesicles, or Mixtures of Both. A Brookhaven ZetaPlus-ZetaPotential analyzer (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY) equipped with a 677 nm laser and dynamic light scattering at 90° was used throughout for particle sizing (mean ζ-average diameter, D_z) and mean ζ-potential determination. ζ was determined from the electrophoretic mobility μ in pure water, and from Smoluchowski's equation: $\zeta = \mu\eta/\epsilon$, where η is the medium viscosity and ϵ the medium dieletric constant. The effect of PC concentration on the mean D_z for particles in the mixtures was obtained at 0.1 mg/mL silica.

Determination of Silica Sedimentation from Photographic Imaging of Silica Dispersions. Colloid stability of silica or silica/PC vesicle mixtures was documented macroscopically by taking pictures with a digital camera (HP Photosmart 215) over a range of interaction times and PC and NaCl concentrations.

Results and Discussion

1. Effect of Ionic Strength on Phosphatidylcholine Adsorption on Silica. PC adsorption isotherms from vesicles on silica at pH 6.3 and several ionic strengths (0.1−150 mM NaCl) are shown in Figure 1A−E. For PC/silica mixtures interacting at and above 10 mM NaCl, isotherms of high affinity were obtained (Figure 1C−E) in contrast to the low-affinity ones determined below 10 mM NaCl which did not reach a limiting adsorption value over the range of lipid concentrations tested (0−1 mM PC) (Figure 1A,B). In fact, these results confirmed previous quantitative data obtained in our laboratory for PC adsorption on silica at low ionic strength or in pure water: adsorption was deceptively low over a range of pH values, and a limiting adsorption consistent with bilayer deposition was absent.[7,10] From 10 mM ionic strength, adsorption maxima $(x/m)_{max}$ could be calculated or determined from adsorption at the plateau exhibited by the isotherms in Figure 1 (Table 2). The effect of increasing ionic strength in the PC/silica medium was to increase the affinity between PC vesicles and silica particles (Table 2). Assuming 0.7 nm^2 per PC molecule as the mean molecular area at the air−water interface[22] and bilayer deposition at maximal adsorption, 28.57×10^{17} molecules/m^2 of silica should be obtained at limiting adsorption. Limiting adsorption figures shown in Table 2 are very similar to the theoretically predicted value and consistent with deposition of one bilayer per silica particle.

(17) Sears, G. W., Jr. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 1981.
(18) Batzri, S.; Korn, E. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *298*,
(19) Rouser, G.; Fleischer, S.; Yamamoto, A. *Lipids* **1970**, *5*, 4924.
(20) Hiemenz, P. C. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*; Marcel Dekker: New York, 1986.
(21) Tadros, Th. F.; Lyklema, J. *J. Electroanal. Chem.* **1968**, *17*, 267.
(22) Van Deenen, L. L. M.; Houtsmuller, U. M. T.; De Haas, G. H.; Mulder, E. *J. Pharm. Pharmacol.* **1962**, *14*, 429.

Table 2. Effect of Ionic Strength on Adsorption Parameters for PC Adsorption from PC Vesicles on Silica (1 mg/mL) at pH 6.3[a]

ionic strength	pH	affinity constant k (M^{-1})	adsorption max $(x/m)_{max}$ (molecules/m^2)
10 mM NaCl	6.3	95	27.21E+17
100 mM NaCl	6.3	387	29.93E+17
150 mM NaCl	6.3	2594	25.79E+17
140 mM NaCl, 10 mM Tris−HCl	7.4	21121	28.50E+17

[a] The last line shows adsorption parameters for PC under conditions similar to the physiological ones (150 mM ionic strength and pH 7.4). The parameters k and $(x/m)_{max}$ were calculated from adsorption isotherms in Figure 1.

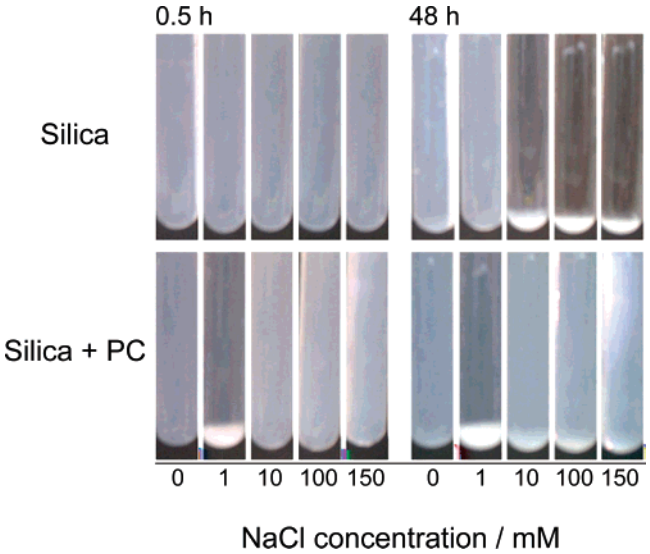


Figure 2. Silica/PC mixtures at 1 mg/mL silica, 0.3 mM PC, pH 6.3, 25 °C, and a 0.5 or 48 h time of interaction after mixing over a range of NaCl concentrations. The upper photos show controls under the same conditions but without PC vesicles.

To check if the high affinity and bilayer deposition achieved at and above 10 mM ionic strength, at pH 6.3 (Figure 1C−E), would be kept at pH 7.4 (the physiological one), PC adsorption on silica was quantified also at pH 7.4, 140 mM NaCl plus 10 mM Tris−HCl (Figure 1F). The adsorption isotherm and parameters still remained indicative of bilayer deposition with high affinity at 150 mM ionic strength and pH 7.4 (Table 2).

Photos of silica or silica/PC mixtures over a range of experimental conditions allowed the PC, NaCl, and time effects on silica colloid stability to be obtained. Figure 2 shows silica or silica/PC mixtures at 0.5 and 48 h after mixing at 0, 1, 10, 100, and 150 mM NaCl, pH 6.3. At 0.5 h after mixing 1 mg/mL silica and 0.3 mM PC, there was PC-induced particle sedimentation at 1 mM NaCl whereas silica control in the absence of PC remained dispersed. At 48 h after mixing, in the absence of PC, there was complete silica sedimentation from 10 mM NaCl whereas, in the presence of PC, sedimentation was practically absent. Therefore, over the 10−150 mM NaCl concentration range, the low colloid stability of silica was substantially improved by adding the PC bilayer coating on each particle. One should notice the consistency between adsorption isotherms in Figure 1 and PC-induced colloid stabilization in Figure 2. Colloid stabilization was achieved only under experimental conditions that led to bilayer deposition, namely, at and above 10 mM NaCl and 0.3 mM PC.

It was interesting to notice that, in pure water, the PC/silica mixture remained colloidally stable (Figure 2) consistently with the low-affinity adsorption isotherm previously described for PC adsorption on silica.[7,10] At 0.3 mM PC, in pure water, vesicles and particles barely interacted, each component of the mixture remaining dispersed and colloidally stable by itself. At 0.3 mM PC in 1 mM NaCl, colloid instability for the vesicle/particle mixture (Figure 2) revealed the onset of a more attractive interaction. However, this attraction was not sufficiently large as to disrupt the vesicle bilayer and cause entire bilayer deposition on particles (Figure 1B). Possibly, the measured adsorption corresponded to mere vesicle adhesion to particles with formation of a ca. 1:1 network of particles and vesicles which would precipitate (Figure 2). The 1:1 proportion hypothesis was cast due to the employed ratio between total surface area for PC vesicles and silica particles, which was close to 1. At 0.3 mM PC and 1 mg/mL silica, there would be approximately one vesicle per particle.

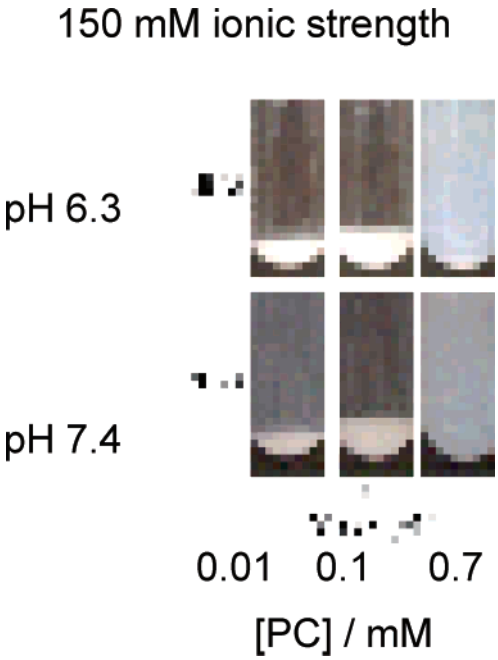


Figure 3. Silica/PC mixtures at 1 mg/mL silica, 150 mM ionic strength, 25 °C, and pH 6.3 in 150 mM NaCl solution (A, top) or 7.4 in 140 mM NaCl plus 10 mM Tris−HCl solution (B, bottom) at three different PC concentrations. Mixtures were incubated at 25 °C for 2 h before the pictures were taken.

To confirm PC-induced stabilization of silica particles at pH 7.4, an experiment similar to the one at pH 6.3 was performed. The photos in Figure 3 show the poor colloid stability of silica at 150 mM ionic strength, pH 6.3 and 7.4, when the PC concentration is too low to produce bilayer adsorption, namely, 0.01 and 0.1 mM PC. This contrasts with the high stability achieved at 0.7 mM PC at 150 mM ionic strength for the two pH values tested (Figure 3). Thus, the association between bilayer coverage and improved colloid stability was confirmed for silica/PC mixtures at the two different pH values tested.

2. pH Effect on Bilayer Coverage and Bilayer-Induced Silica Stabilization. For bilayer deposition on flat SiO_2 wafers, increasing pH impeded bilayer spreading.[9] To check if a similar effect would occur also for particles, PC adsorption isotherms from PC vesicles on silica at pH 7.4 or 6.3 were obtained at 10 mM ionic strength (Figure 4) and adsorption parameters calculated from the curves (Table 3). The affinity between PC vesicles and silica was lower at pH 7.4 than at pH 6.3, though adsorption maxima were similar and consistent with bilayer deposition (Table 3). Thus, the present measure-

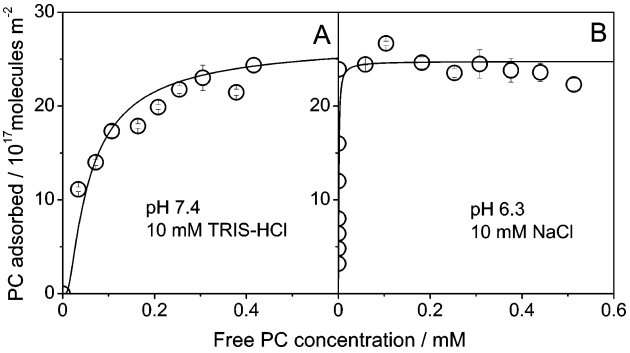


Figure 4. PC adsorption from PC vesicles onto silica (1 mg/mL) in 10 mM Tris−HCl at pH 7.4 (A) or 10 mM NaCl at pH 6.3 (B). Mixtures were incubated at 25 °C for 1 h before centrifugation and determination of PC in the supernatant.

Table 3. pH Effect on Adsorption Parameters for PC Adsorption from PC Vesicles on Silica (1 mg/mL) at Ca. 10 mM Ionic Strength[a]

ionic strength	pH	affinity constant k (M^{-1})	adsorption max $(x/m)_{max}$ (molecules/m^2)
10 mM NaCl	6.3	1234	25.01E+17
10 mM TRIS-HCl	7.4	24	24.76E+17
10 mM TRIS-HCl	7.4	20	32.40E+17

[a] The last line shows adsorption parameters for PC adsorption calculated from previous work by Rapuano and Carmona-Ribeiro.[10] At pH 7.4, 10 mM Tris−HCl Buffer ($pK_a = 8.1$) will provide an 8.3 mM ionic strength so that the ionic strength will be slightly inferior to the one obtained at 10 mM NaCl (first line).

ments for particles yielded a pH effect similar to the one previously reported for flat substrates.[9] The reason for decreasing affinity and thereby adsorption upon increasing the pH might be related to the loss of cooperative hydrogen bridges between the −P═O moiety in the PC molecule and the HO− moiety at the silica particle surface. At low pH, the larger frequency of nondissociated silanol on the particle surface would allow hydrogen bonding with PC, a cooperative interaction that would not occur at higher pH values due to the higher frequency of dissociated silanol at the silica surface.

At a given pH above the point of zero charge, increasing ionic strength tends to increase silanol dissociation and surface charge density on silica.[21] Therefore, the possibility of hydrogen bonding between phospholipid and silica would also be diminished with increasing ionic strength. Despite this decrease in hydrogen bonding, affinities remarkably increase with increasing ionic strength (Figure 1). This suggests that, above 10 mM ionic strength, hydrogen bonding was not the main driving force determining bilayer deposition on particles; possibly improved van der Waals attraction accounted for the optimal bilayer deposition. Indeed, van der Waals attraction between surfaces should increase upon increasing the ionic strength of the medium.[23,24] For the interaction between PC and silica, this seemed to be the case.

3. Effect of PC Concentration on Silica Stabilization. PC-induced colloidal stabilization from macroscopic visualization of silica/PC mixtures (Figures 2 and 3) required a microscopic complementary approach from photon correlation spectroscopy, particle sizing, and ζ-potential analysis to be validated. Therefore, the effect of PC concentration on the mean particle diameter was

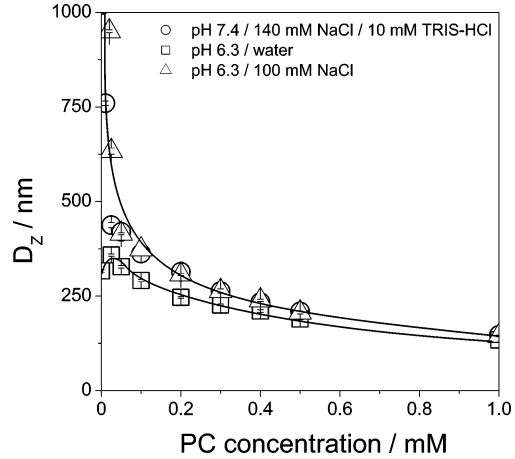


Figure 5. Effect of PC concentration on the mean diameter (D_z) of silica (0.1 mg/mL) at 0 (□) or 100 (△) mM NaCl at pH 6.3. The same effect was shown at pH 7.4, 140 mM NaCl, and 10 mM Tris−HCl (○). Measurements were done after incubation of the mixtures for 1 h at 25 °C.

Table 4. Effect of Different Amphiphiles and Lipids (1 mM each) on ζ-Potentials and Mean Diameters (D_z) of Silica (0.1 mg/mL) in Pure Water at pH 6.3[a]

sample	ζ (mV)	D_z (nm)
silica	−45 ± 3	326 ± 3
silica/sonicated DODAB	25 ± 1	246 ± 2
silica/PC vesicles	−18 ± 3	162 ± 2
silica/injected PC*	−12 ± 1	146 ± 2
silica/CTAB	46 ± 3	333 ± 3

[a] Measurements were taken after either 1 h of mixing of amphiphile dispersions with particles or vesicle preparation in the silica dispersion (indicated by an asterisk), silica, vesicles, and a mixture medium of pure water.

obtained and is shown in Figure 5 at two different pH values and at three different values of ionic strength. At 0.1 mg/mL silica, which is a particle concentration 10 times smaller than the one used for taking the pictures or determining the adsorption isotherms (Figures 1−4), the mean diameter in the mixtures decreased as a function of PC concentration, in close agreement with visualization of colloid stability in the pictures and with previously reported light scattering data for lipid/polymeric particles[25−27] or lipid/silica.[14]

The PC-induced stabilization of silica particles was also reported in comparison to the one induced by other amphiphiles and lipids such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and DODAB, respectively, and for two different procedures: (1) PC dispersed in the particle medium; (2) PC previously dispersed to form vesicles and then mixed with particles (Table 4). There was no difference in the final sizes by preparing the mixtures via procedure 1 or 2 (Table 4). At 1 mM amphiphile or lipid, in pure water, whereas the micelle-forming CTAB did not change particle size, the cationic synthetic lipid DODAB and the neutral PC lipid both induced a decrease in particle size with PC as the most effective stabilizer among all (Table 4). DODAB-induced silica stabilization was previously reported over a range of low ionic strengths (0.1−10 mM KCl).[14] Unfortunately, DODAB could not improve silica colloidal stability over the 10−150 mM NaCl

(23) Mahanty, J.; Ninham, B. W. *Dispersion Forces*; Academic Press: New York, 1976.
(24) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, 1992.
(25) Carmona-Ribeiro, A. M.; Midmore, B. R. *Langmuir* **1992**, *8*, 801.
(26) Carmona-Ribeiro, A. M.; Herrington, T. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *156*, 19.
(27) Pereira, E. M.; Vieira, D. B.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 11490.

concentration range due to the appearance of salt-induced hydrophobic defects in the supported bilayer and collapse of the bilayer structure with interbilayer fusion at ionic strengths higher than 10 mM monovalent salt.[28] The strongly bound water layer at the PC bilayer surface possibly provided stabilizing short-ranged hydration repulsion forces between PC-bilayer-covered particles.[24,29]

Table 4 also presents the ζ-potentials for silica or silica/amphiphile mixtures. The ζ-potential for silica changed its sign in the presence of the cationic CTAB or DODAB, whereas, in the presence of neutral PC lipid, silica still displayed a negative ζ-potential (Table 4). The reason for this could be the low affinity (Figure 1A,B) between PC vesicle and silica so that adhered PC vesicles on silica would screen to a certain extent the particle surface potential but would not neutralize the silica surface charge completely; a certain extent of surface area on silica was still exposed to the water solution. The technical limitations of the ζ-potential analyzer did not allow determination of the ζ-potentials over the salt concentration range where PC bilayer deposition indeed took place on particles (10−150 mM NaCl).

Mornet and co-workers[30] recently provided beautiful cryo transmission electron microscopy images for the dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)/silica interaction. Vesicle adhesion was often observed after deposition of the bilayer onto the particles in close association with quantitative data for lipid adsorption previously provided by our laboratory[7,10] which indicated either low affinity and mere vesicle adhesion or uncontrollable vesicle adsorption going beyond bilayer deposition.[7,10] Recently, the adequacy of the optimal experimental conditions for bilayer deposition described here (150 mM ionic strength, pH 7.4, 0.3 mM PC, 1 mg/mL silica) was further checked against quantitative reconstitution of biomolecular recognition between cholera toxin (CT) and its monosyalo-ganglioside (GM1) receptor.[31] At the root of the optimal recognition achieved at 1:5 molar ratio (CT:GM1)[31] was the increase in affinity between the PC bilayer and silica obtained upon increasing the ionic strength and thereby van der Waals attraction between the PC bilayer and silica particles.

The large surface area on biomimetic particles and the simplicity of the analytical methods employed for both protein[31] and lipid analysis (this work) will certainly facilitate qualitative and quantitative studies for a variety of receptor−ligand pairs in the future.

Acknowledgment. Financial support from FAPESP and CNPq is gratefully acknowledged. S.P.M. is the recipient of a Ph.D. fellowship from FAPESP.

LA0504614

(28) Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11843.
(29) Rand, R. P. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10*, 277.
(30) Mornet, S.; Lambert, O.; Duguet, E.; Brisson, A. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 281.
(31) Moura, S. P.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Cell Biochem. Biophys.* **2005**, in press.

Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 900E © 2006 Materials Research Society 0900-O03-35.1

Cationic Lipid Modulates Phospholipid Adsorption on Silica

Sérgio P. Moura and Ana M. Carmona-Ribeiro
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo,
P. O. Box 26077, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil.

ABSTRACT

The effect of cationic lipid dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) to dipalmitoylphosphatydilcholine (DPPC) molar ratio (%R) on lipid adsorption from DODAB/DPPC vesicles on silica was investigated over a range of %R (0 –20 %) at pH 6.3 and 7.4 from determination of adsorption isotherms, colloid stability, particle sizing and ζ-potentials. At 2 % DODAB and pH 6.3, in pure water, high affinity adsorption isotherms with limiting adsorption indicative of one bilayer deposition on each silica particle were obtained whereas for the other R values tested, limiting lipid adsorption was either above or below the level expected for bilayer deposition. At R smaller or higher than 2%, adsorption isotherms indicated limiting adsorption above and below bilayer deposition, respectively. This suggested a modulating role for DODAB allowing control of total amount of lipid adsorbed on silica. Silica sedimentation documented from photographs was almost absent over a range of lipid concentrations where bilayer deposition was achieved.

INTRODUCTION

Membrane-derivatized colloidal particles offer an extensive repertoire of chemical functionality and have been introduced as potential applications to a broad set of problems involving chemical events on cell membrane surfaces [1-3]. However, not always the interaction between bilayer vesicles and mineral surfaces produced the desired spreading of lipid bilayers on the supports [4 –8]. Recently, cryo-TEM provided beautiful images of supported lipid bilayers on silica and adhered liposomes attached to the supported bilayers [9] which confirmed evidences previously obtained either by quantitative physicochemical methods such as determination of lipid adsorption isotherms [4 –8], QCM-D [3, 10], surface plasmon ressonance[1], ellipsometry [11] or atomic force microscopy [12, 13]. In order to avoid the vesicle adhesion onto the supported bilayer, DPPC bilayer adsorption on silica was optimized from a small proportion of cationic lipid included in the DPPC bilayer composition. Thereby the electrostatic repulsion between supported DODAB/DPPC bilayers on silica and free DODAB/DPPC vesicles prevents further vesicle adhesion on the desired bilayer assembly on particles.

EXPERIMENTAL DETAILS

Materials

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) and tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (TRIS-HCl) were obtained from Sigma. Silica AEROSIL OX-50 was obtained from Degussa with 50 nm

mean particle diameter and 50 m^2/g specific surface area provided by the supplier. From routine measurements by dynamic light scattering, silica particles presented extensive aggregation with mean aggregate diameter around 300 nm and 47 m^2/g specific surface area as determined by potentiometric titration. The silica powder was routinely redispersed by sonication with tip (85 W / 15 min) in pure water or saline buffered solution. Water was of Milli-Q quality.

Preparation of DPPC or DODAB/DPPC vesicles

Small unilamellar DPPC or DODAB/DPPC vesicles were prepared in pure water or saline buffered solution by ethanolic injection at ca. 60 ^oC (above the bilayer phase transition temperature) [14]. Ethanolic lipid solutions with 1, 2, 5, 10 or 20 mol% DODAB were prepared and injected in aqueous solutions. Injection of ethanolic solutions was followed by dialysis (2 h against 0.5 L preparation medium, changing medium after the first hour) to eliminate injected ethanol and centrifugation (1 h / 14,000 rpm / 25 ºC) to remove multilamellar vesicles. DPPC concentration was determined by inorganic phosphorous analysis in the supernatant [15].

Determination of adsorption isotherms for DPPC or DODAB/DPPC vesicles on silica

DPPC or DODAB/DPPC adsorption on silica was induced by mixing vesicles and particles. Mixtures were incubated (1 h / 25 ºC), centrifuged (14,000g / 1 h / 15 ºC) to separate particles from vesicles and the supernatant was used to determine DPPC concentration. Total surface area on particles was calculated from its specific surface area determined by potentiometric titration (47 m^2/g). The adsorption isotherm for DPPC or DODAB/DPPC onto silica particles was obtained from inorganic phosphorus analysis of supernatants and original vesicle dispersion considering DODAB/DPPC molar proportion. Sensitivity of DPPC analysis was 10 nM. Lipid adsorption on silica was expressed as the number of lipid molecules adsorbed per square meter of silica. The limiting adsorption and area per adsorbed molecule were determined from the plateau level on the isotherm considering that one DPPC molecule occupies 0.6 nm^2 at the air-water interface.

Particle sizing, zeta-potential and colloid stability determination for silica/vesicles mixtures

A Brookhaven ZetaPlus- ZetaPotential Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY) equipped with a 532 nm laser and dynamic light-scattering at 90 º was used throughout for particle sizing (mean zeta-average diameter, Dz) and mean ζ-potential determination. ζ was determined from electrophoretic mobility μ in pure water, and from the Smoluchowski's equation: $\zeta = \mu \eta / \varepsilon$, where η is the medium viscosity and ε, the medium dieletric constant. The effect of DPPC concentration on Dz of silica particles was obtained at 0.10 mg/mL of silica. Pictures of the silica/vesicles mixtures over a range of %R were taken by a digital camera (HP Photosmart 215) 1 h after preparing the mixtures. This allowed recording silica sedimentation or colloid stability macroscopically whereas sizing allowed a microscopic analysis of colloid stability.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows some physical properties of silica and vesicles employed in this work. By means of dynamic light scattering, AEROSIL OX-50 is characterized as a population of aggregated silica particles with 271 nm of mean diameter and –45 mV of zeta-potential (Table 1). From electron microscopy provided by the supplier, primary particles have ca. 50 nm mean diameter. Therefore, silica particles are aggregated in aqueous dispersion. Pure DPPC vesicles have 88 nm mean diameter (Table 1) in good agreement with sizes expected for vesicles obtained by the procedure of ethanolic injection [14]. Upon increasing DODAB % in the composite vesicles, mean vesicle diameter decreases and zeta-potential increases [Table 1], similarly to the effect of vesicle charge on vesicle size previously reported for charged synthetic vesicles [16]. Increasing vesicle charge from changes in the environment where vesicles are prepared indeed causes a decrease in vesicle size [16]. In Table 1, changes in vesicle charge were directly obtained by changing % DODAB in the lipidic composition of the composite DODAB/DPPC vesicles.

The change on silica zeta-potential and particle size after interacting with DPPC or DODAB/DPPC vesicles is on Table 2. DPPC is a zwitterionic lipid so that coverage of silica with one DPPC bilayer was indeed expected to result in a substantial change of particle zeta-potential. Indeed, it changed form –45 to ca. 0 mV upon coverage of silica particles with a DPPC bilayer. Furthermore, the decrease in particle size for silica in the presence of DPPC indicates colloid stabilization. It was often observed that if enough lipid is mixed with the particulate so that all particles can be covered by at least one lipid bilayer, a stabilizing effect is obtained that reduces interparticle aggregation [2, 6-8, 17].

Table 1 – Physical properties for silica particles and lipid vesicles. Mean zeta-average diameter (D_z) and zeta-potential (ζ) for silica particles and vesicles at 3 mM total lipid, 1 mM NaCl, pH 6.3, 25 ºC.

Sample	D_z/nm	ζ/mV
Sílica 0.1 mg/ml	271 ± 3	-45 ± 3
DPPC	88 ± 1	0 ± 1
DPPC/DODAB 1%	81 ± 1	22 ± 3
DPPC/DODAB 2%	79 ± 1	41 ± 5
DPPC/DODAB 5%	54 ± 1	41 ± 2
DPPC/DODAB 10%	31 ± 1	38 ± 1
DPPC/DODAB 20%	31 ± 1	39 ± 3

Table 2 – Mean zeta-average diameter (D_z) and zeta-potential (ζ) for silica particles (0.1 mg/mL) and particles/vesicles mixtures at 1 mM NaCl, pH 6.3, 25 ºC.

Sample	D_z (nm)	ζ (mV)
Particles	271 ± 3	-45 ± 3
Particles / vesicles 0.1 mM DPPC	243 ± 3	1 ± 1
Particles / vesicles 0.3 mM (DPPC/ 1%DODAB)	224 ± 3	5 ± 2
Particles / vesicles 0.3 mM (DPPC/ 10%DODAB)	244 ± 2	32 ± 3
Particles / vesicles 0.3 mM (DPPC/ 20%DODAB)	292 ± 4	36 ± 2

The effect of varying DODAB % on lipid adsorption isotherms on silica is in Figure 1. The lipid amount theoretically required to cover all particles with one lipid bilayer is ca.40E17 DPPC molecules per square meter silica, assuming bilayer adsorption and 0.6 nanometers square per DPPC molecule at the air-water interface. At zero or 1 % DODAB in the composition of the DODAB/DPPC vesicles, limiting adsorption overcomes the expected amount for bilayer deposition. This, taken together with cryo-TEM pictures by Mornet et al. [9], suggests that a certain extent of entire vesicle adhesion onto the bilayer-covered particles occurs. At 2 % DODAB, limiting adsorption precisely agrees with the expected value for bilayer deposition whereas further increasing DODAB molar proportion in the vesicles progressively reduced the maximal amount of total lipid adsorbed (Figure 1). In fact, at 100 % DODAB, DODAB adsorption at pH 6.3 and 0- 1 mM NaCl was reported to be close to zero [4 -6].

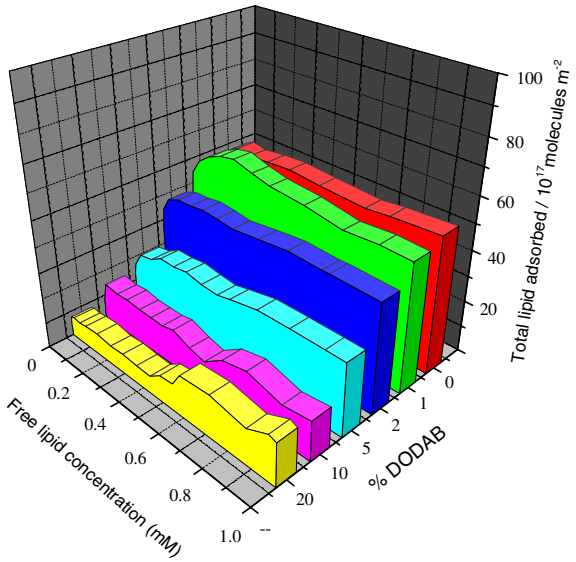


Figure 1- Lipid adsorption from DODAB/DPPC vesicles onto silica (1 mg/ml) at 1 mM NaCl, pH 6.3, 25 °C and 0 (A), 1 (B), 2 (C), 5 (D), 10 (E) and 20% (F) DODAB.

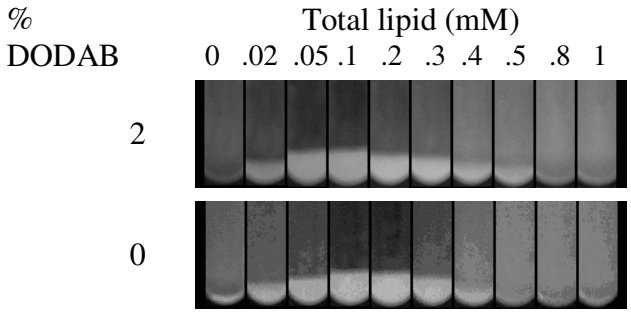


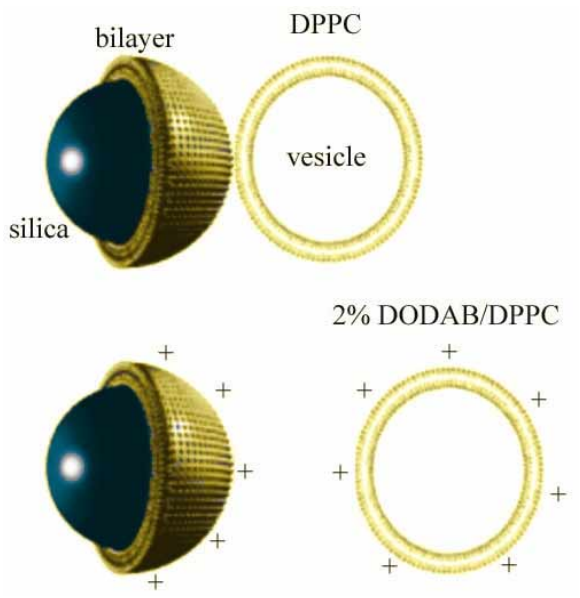
Figure 2- Colloid stability of silica/vesicles mixtures at pH 6.3, 1 mM NaCl, 25 °C and 1 mg/ml silica. Pure DPPC vesicles (0 % DODAB) or 98 % DPPC (2 %DODAB) vesicles were mixed with silica over a range of lipid concentrations, interacted for 1 h and were then photographed.

The colloid stability for silica in the presence of vesicles was also inferred from sedimentation as shown in Figure 2. The control tube containing 1 mg/ml silica was compared with silica/vesicles mixtures over a range of total lipid concentration at two different % DODAB in the vesicles. The low colloid stability seen from extensive sedimentation over a range of low lipid concentrations (0.02 -0.3 mM total lipid) can be understood from insufficient amount of lipid to cover all silica particles so that several naked silica particles may adhere to one bilayer-covered particle forming a large and heavy floc that sediments in the assay tube. On the other hand, above 0.3 mM lipid, all particles have apparently been covered by one bilayer so that no aggregation takes place and covered particles remain stable in dispersion. This macroscopic approach is consistent with the microscopic one: particle sizing from dynamic light scattering indicates also colloid stabilization by bilayer coverage (Table 2).
The phase behavior of vesicles consisting of binary mixtures of DPPC and DODAB was investigated by Bayerl and coworkers by means of differential scanning calorimetry [18]. They have also investigated solid supported vesicle samples to gain information about the effect of silica on the mixing behaviour [18]. DODAB exhibited a peculiar phase diagram when mixed with DPPC. For example, a higher melting temperature than each of the pure components was obtained for vesicles prepared from an equimolar mixture [18]. For all other mixing ratios they obtained lower transition temperatures and significant reduction in vesicle size in going from the fluid to the gel state [18]. In the present work, increasing DODAB/DPPC molar ratio led to reduction of DPPC adsorption on silica to levels well below those required for deposition of one single bilayer on each particle. Possibly, predominance of electrostatic attraction between cationic DODAB/DPPC bilayer and oppositely charged silica at the pH of water represented a poor interaction force to drive bilayer deposition onto silica in clear contrast with the strong cooperative effect of several hydrogen bridges between undissociated silanols and the phosphate moieties of DPPC bilayer which predominates at very low DODAB/DPPC molar ratios. Because, at room temperature, both DPPC and DODAB are below their phase transition temperature, at the rigid gel state, it would certainly be difficult for DODAB to flip flop from the outer to the inner monolayer in accordance with the electrostatic attraction between the composite bilayer and silica. Therefore, one might speculate that an even spatial distribution occurs for DODAB in the DODAB/DPPC bilayer on silica which could

eventually change to a larger DODAB concentration at the inner monolayer upon increasing temperature to values above the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature.This point is currently under investigation in our lab.

CONCLUSIONS

This study for the first time shows how phospholipid (DPPC) adsorption on silica can be modulated by varying cationic lipid (DODAB) molar ratio in DODAB/DPPC bilayer vesicles. In addition it was shown that colloid stability is improved at total lipid concentrations at and above the amount required to cover all particles with one bilayer. Most likely, the electrostatic repulsion between slightly positively charged supported bilayer and free positively charged vesicles in the dispersion is the explanation for avoidance of further vesicle adhesion onto bilayer-covered particles. Scheme 1 illustrates a DPPC bilayer-covered silica particle with 2% DODAB in contrast to a DPPC bilayer-covered silica particle where further vesicle adhesion takes place.



Scheme 1: DPPC or 2%DODAB /98%DPPC assembly from vesicles onto silica.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank FAPESP and CNPq for financial support. Sérgio P. Moura is the recipient of a PhD fellowship from FAPESP.

REFERENCES

1. W. Knoll, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 569 (1998).
2. A. M. Carmona-Ribeiro, *Chem. Soc. Reviews* **30**, 241(2001).
3. R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson, *Biophys. J.* **85**, 3035 (2003).
4. R. Rapuano and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **193,** 104 (1997).
5. R. Rapuano and A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Colloid Interface Sci.* **226,** 299 (2000).
6. S. P. Moura and A. M. Carmona-Ribeiro, *Langmuir* **19**, 6664 (2003).
7. S. P. Moura and A. M. Carmona-Ribeiro, *Langmuir* **21**, 10160 (2005).
8. S. P. Moura and A. M. Carmona-Ribeiro, *Cell Biochem. Biophys.* (2006) (in press).
9. Mornet, S.; Lambert, O.; Duguet, E.; Brisson, A. *Nano Letters* **5**, 281 (2005).
10. E. Reimhult, F. Hoeoek, B. Kasemo, *Langmuir* **19**, 1681 (2003)
11. M. Benes, D. Billy, W.T. Hermens, M. Hof, *Biol. Chem.* **383**, 337 (2002)
12. Reviakine, A. Brisson, *Langmuir* **16**, 1806 (2000)
13. J. Jass, T. Tjaernhage, G. Puu, *Biophys. J.* **79**, 3153 (2000)
14. J. M. H. Kremer, M. W. J. v. d. Esker, C. Pathmamanaharan and P. H. Wiersema. *Biochemistry* **16,** 3932 (1977).
15. G. Houser, S. Fleischer and A. Yamamoto. *Lipids* **5,** 594 (1970).
16. A. M. Carmona-Ribeiro and B. R. Midmore *J. Phys. Chem. B* **96**, 3542 (1992).
17. A. M. Carmona-Ribeiro and B. R. Midmore *Langmuir* **8**, 801(1992).
18. F. M. Linseisen, S. Bayerl, T. M. Bayerl, *Chem. Phys. Lipids* **83**, 9 (1996).

© Copyright 2006 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
1085-9195/(Online)1559-0283/06/44:446–452/$30.00

ORIGINAL ARTICLE

Biomimetic Particles for Isolation and Reconstitution of Receptor Function

*Sérgio P. Moura and Ana M. Carmona-Ribeiro**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

Biomimetic particles supporting lipid bilayers are becoming increasingly important to isolate and reconstitute protein function. Cholera toxin (CT) from *Vibrio cholerae,* an 87-kDa AB_5 hexameric protein, and its receptor, the monosialoganglioside GM_1, a cell membrane glycolipid, self-assembled on phosphatidylcholine (PC) bilayer-covered silica particles at 1 CT/5 GM_1 molar ratio in perfect agreement with literature. This receptor–ligand recognition represented a proof-of-concept that receptors in general can be isolated and their function reconstituted using biomimetic particles, i.e., bilayer-covered silica. After incubation of colloidal silica with small unilamellar PC vesicles in saline solution, pH 7.4, PC adsorption isotherms on silica from inorganic phosphorus analysis showed a high PC affinity for silica with maximal PC adsorption at bilayer deposition. At 0.3 m*M* PC, fluorescence of pyrene-labeled GM_1 showed that GM_1 incorporation in biomimetic particles increased as a function of particles concentration. At 1 mg/mL silica, receptor incorporation increased to a maximum of 40% at 0.2–0.3 m*M* PC and then decreased as a function of PC concentration. At 5 μ*M* GM_1, 0.3 m*M* PC, and 1 mg/mL silica, CT binding increased as a function of CT concentration with a plateau at 2 mg bound CT/m^2 silica, which corresponded to the 5 GM_1/1 CT molar proportion and showed successful reconstitution of receptor–ligand interaction.

Index Entries: Cholera toxin; monosialoganglioside GM_1; phosphatidylcholine vesicles; Aerosil OX-50; silica; receptor–ligand recognition.

INTRODUCTION

Cell-surface protein–carbohydrate interactions mediate the invasion and colonization of a wide range of pathogenic bacteria and viruses *(1).* Toxins are the primary virulence factors of many bacteria and the causative agents of tetanus, cholera, and hemolytic ureic syndrome among other diseases. A large number of bacteria release protein toxins that similarly exploit adhesion to cell-surface carbohydrates as a means of entering target cells *(2).* The archetypal bacterial toxins are the cholera and heat-labile toxins derived from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli,* respectively. These toxins share an AB_5-type structure: a single A-subunit of 27 kDa, which possesses the toxic activity, and five identical B-subunits, which bind selectively to the cell-surface glycolipid ganglioside GM_1 *(3).* The cholera toxin (CT) interacts with the oligosaccharide portion of GM_1 and the crystal structure of the CT–GM_1 complex has been refined to 1.25-Å resolution *(4,5).* The complex CT–GM_1 is one of the highest-affinity protein–carbohydrate interactions known *(6).*

Over the past two decades, membrane-derivatized colloidal systems have been introduced as potential applications to a broad set of problems involving chemical events on cell membrane surfaces *(7–9).* These applications ranged from mapping ligand interactions with numerous cell-surface proteins to detection of membrane-targeting bacterial toxins and viruses. Indeed, the use of membrane coatings on colloidal particles offers an extensive repertoire of chemical functionality *(10).* In this work, we proved the concept that phosphatidylcholine (PC) bilayer-covered silica particles, from now on named biomimetic particles, represent a valuable asset to isolation and reconstitution of a

* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: mcribeir@iq.usp.br

model receptor–ligand pair, namely, the high-affinity CT–GM_1 complex.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Egg PC (type XIII-E), monosialoganglioside (GM_1) from bovine brain (~95% pure), tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), bovine serum albumin (97% minimum desiccated), cholera toxin (87 kDa) from *V. cholerae* and pyrene-labeled GM_1 (GM_1Py) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Silica AEROSIL OX-50 was obtained from Degussa (Cleveland, OH) with 50-nm mean particle diameter and 50-m^2/g specific surface area (prepared by supplier). From routine measurements by dynamic light scattering, silica particles presented extensive aggregation with mean aggregate diameter of approx 300 nm, although its specific surface area determined as 47 m^2/g by potentiometric titration *(11)* remained similar to that determined by the supplier. The silica powder was routinely redispersed by sonication with tip (85 W; 10 min) in the same saline-buffered solution where the PC vesicles were prepared, namely, 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl at pH 7.4. Water was of Milli-Q quality (Millipore, Billerica, MA).

Preparation of Small Unilamellar PC Vesicles

Small unilamellar PC vesicles 70- to 80-nm mean diameter, as determined from dynamic light scattering, were prepared in 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl at pH 7.4 by ethanolic injection as previously described *(12).* Injection was followed by dialysis (2 h against 0.5 L of the same saline-buffered medium, refilling new medium after the first hour) to eliminate injected ethanol, and centrifugation (1 h; 14,000*g*; 25°C) to remove multilamellar vesicles. PC concentration was determined by inorganic phosphorous analysis *(13).*

Determination of PC Adsorption Isotherm on Silica

PC adsorption on silica was induced by mixing vesicles and particles. Mixtures were incubated (1 h; 25°C), centrifuged (14,000*g;* 1 h; 15°C) to separate particles from vesicles, and the supernatant was used to determine PC concentration by inorganic phosphorus analysis *(13).* The total surface area of silica in each mixture was calculated from its specific surface area determined by potentiometric titration (47 m^2/g). The adsorption isotherm for PC onto silica particles was obtained from inorganic phosphorus analysis of supernatants and original vesicle dispersion. Sensitivity of PC analysis was 10 n*M.* PC adsorption on silica was expressed as the number of phospholipid molecules adsorbed per square meter of silica. The limiting adsorption and area per adsorbed molecule were determined from the plateau level on the isotherm considering that one PC molecule occupies 0.7 nm^2at the air–water interface.

Note that the interaction between PC vesicles and silica was carried out in accordance to previously described protocols *(14–16).* Interaction time effects on adsorption showed that equilibrium adsorption had been achieved from 1-h interaction time *(14,15).* Bilayer coverage on silica particles substantially improved colloid stability of silica *(14–16)* so that precipitating the particles required the relatively large centrifugation speed and time quoted.

Determination of GM_1 Incorporation in Biomimetic Particles

To quantitatively determine GM_1 incorporation into biomimetic particles, GM_1 stock solutions with 7% GM_1Py (GM_1Py/GM_1; 7/93) were prepared in the same saline-buffered solution used to prepare vesicles or disperse silica. Aliquots of this solution were added to biomimetic particles (0.5- to 5-μ*M* range of final GM_1 concentrations), mixed in closed Eppendorf tubes, incubated (0.5 h; 25°C) and centrifuged (1 h; 14,000*g*) to separate incorporated from non-incorporated GM_1 molecules. The supernatant was used to determine GM_1Py fluorescence emission at 375 nm (excitation wavelength at 345 nm) by means of a Hitachi F4500 spectrofluorimeter. The fluorescence intensity of the GM_1 remaining in the supernatant ($I_{supernatant}$) relative to that of the total amount of GM_1 added to the mixture (I_{total}) was used to determine GM_1 percentage of incorporation (% Inc) in biomimetic particles as previously described *(17):*

$$\% \text{ Inc} = 100 \times (I_{total} - I_{supernatant})/I_{total}$$

Determination of CT Binding to Incorporated GM_1

First, PC vesicles were added to silica particles, and mixtures were allowed to interact (1 h; 25°C; 0.3 mM PC; 1 mg/mL silica). Second, GM_1 was added to these mixtures and incubated (0.5 h; 25°C; 0.5 μ*M* GM_1). Finally, CT was added (0.02–0.24 mg/mL), the mixtures allowed to interact (1 h; 25°C), and then they were centrifuged (1 h; 14,000*g*) to separate bound from free CT molecules. Cholera toxin concentration in the supernatant was analytically determined using Lowry's method *(18).* Binding of CT was expressed as adsorbed CT per square meter of silica, percentage of CT binding or micrograms of bound CT, and plotted as a function of total CT mass in the mixtures.

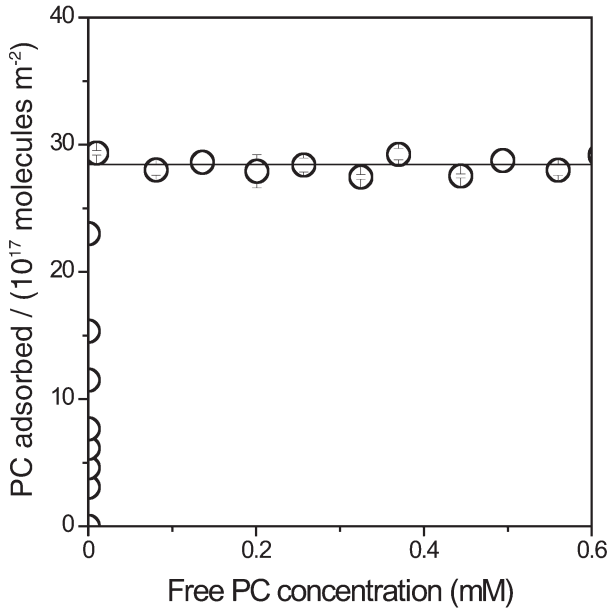


Fig. 1. PC adsorption from small unilamellar PC vesicles onto silica (1 mg/mL) in 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl at pH 7.4 and 25°C.

RESULTS

Phosphatidylcholine Adsorption on Silica: Covering Each Particle With One Bilayer

Figure 1 showed the adsorption isotherm for PC adsorption from small unilamellar PC vesicles onto silica particles at 150 m*M* ionic strength, pH 7.4, and 25°C. This langmuirian isotherm indicated a high affinity between PC and silica under the quoted experimental conditions with limiting adsorption corresponding to 28.5×10^{17} PC molecules per square meter of silica (Fig. 1). If 28.5×10^{17} PC molecules occupied 1 m^2 on silica, then 2 PC molecules would occupy 0.7×10^{-18} m^2 on silica. Therefore, at maximal adsorption, two superimposed PC molecules would occupy 0.7 nm^2 on the silica particle consistently with one bilayer deposition per silica particle. In fact, 0.7 $nm^2$is the mean molecular area per PC molecule usually determined for PC monolayers at the air–water interface from pressure-area adsorption isotherms.

By applying the Langmuir model for linearization of the isotherm *(7)* shown in Fig. 1, two parameters characterizing PC adsorption on silica were obtained: (1) affinity constant and (2) adsorption maximum. These two parameters were shown in Table 1 for two different ionic strengths: 10 and 150 m*M*. The affinity constant at 150 and 10 m*M* ionic strength were $21{,}000 \times 10^3$ L/mol and 20×10^3 L/mol *(14)*, respectively. Therefore, there was a remarkable increase in affinity between PC and silica upon increasing ionic strength. However, maximal PC adsorption on silica was similar at these two ionic strengths (Table 1).

Table 1
Effect of Ionic Strength on Adsorption Parameters for PC Adsorption on Silica at pH 7.4

Interaction medium	*K* (L/mol)	$(x/m)_{max}$ (molecules/m^2)
10 m*M* Tris-HCl/ 140 mM NaCl	$21{,}000 \times 10^3$	28.5×10^{17}
10 m*M* Tris-HCl	20×10^{3a}	32.4×10^{17a}

The affinity constant *K* and the adsorption maximum $(x/m)_{max}$ were calculated from linearization of adsorption isotherms assuming the Langmuir model *(7)*.
[a] Adsorption parameters taken from ref. *14*.

Monosialoganglioside GM_1 Incorporation in Biomimetic Particles

Figure 2 shows fluorescence emission spectra for pyrene-labeled GM_1 in two different environments: GM_1 micelles (Fig. 2A) and PC vesicles (Fig. 2B). These spectra showed that similar hydrophobic environments surrounded the pyrenil moiety in GM_1 micelles or PC vesicles. The fluorescence maximum at 375 nm was used to quantify GM_1 incorporation in bilayer-covered silica.

At 0.3 m*M* PC and 0.5 μ*M* GM_1, GM_1 incorporation in biomimetic particles increased as a function of particle concentration (Fig. 3). There was an almost linear dependence of GM_1 incorporation on biomimetic particles as a function of particles concentration over the 0–1.5 mg/mL silica concentration range (Fig. 3). At 0.3 m*M* PC, the total surface area on PC vesicles per milliliter is equal to $(0.3 \times 10^{-6} \times 0.7 \times 6.02 \times 10^{23})/2$ nm^2 = $0.63 \times 10^{17} \times 10^{-18}$ m^2 = 0.063 m^2. Considering that 1 g of silica had 47 m^2 of surface area, 0.063 m^2 of bilayer area would be adsorbed on the surface of 1.3 mg of silica. Therefore, at 1.3 mg/mL silica and 0.3 m*M* PC, there would be the equivalence of surface areas on vesicles and particles. Above 1.3 mg/mL silica and at 0.3 m*M* PC, GM_1 incorporation should not be affected by adding more bare silica particles because there would not be sufficient PC concentration to cover the additional amount of particles added. Figure 3 showed an intimate relationship between GM_1 incorporation and bilayer-covered particles concentration.

At 1 mg/mL silica and 0.5 μ*M* GM_1, the dependence of GM_1 incorporation on PC concentration was bell-shaped with a maximum at approx 0.23 m*M* PC (Fig. 4).

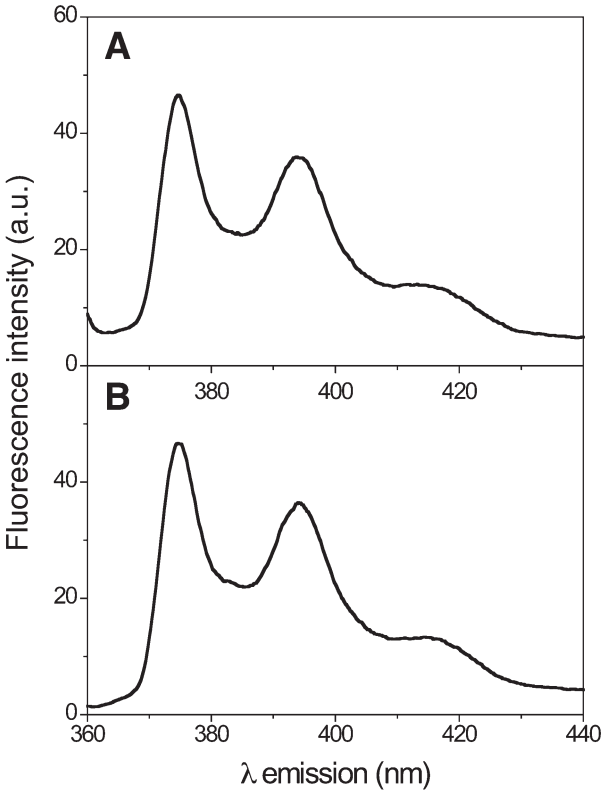


Fig. 2. GM_1Py fluorescence spectra in 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl, pH 7.4, for a 7% GM_1Py, 93% GM_1, 5 μ*M* GM_1 micellar solution in absence **(A)** or in presence of 0.3 m*M* PC **(B).** The excitation wavelength was 345 nm.

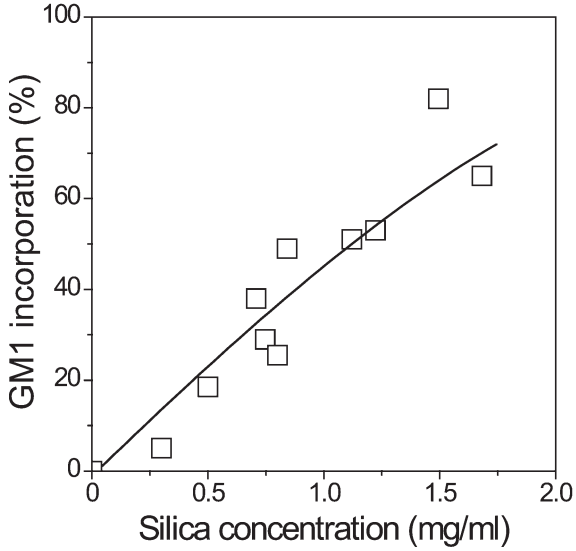


Fig. 3. Particle concentration effect on % GM_1 incorporation at 150 m*M* ionic strength and pH 7.4. The medium was a 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl solution at pH 7.4. PC and GM_1 final concentrations were 0.3 m*M* and 0.5 μ*M*, respectively.

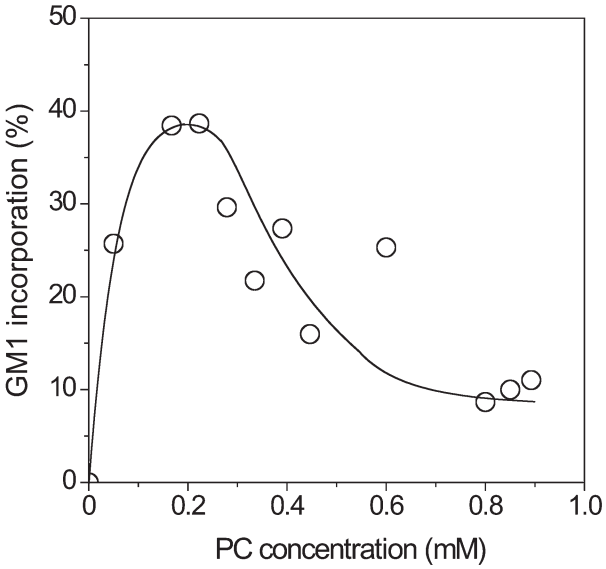


Fig. 4. PC concentration effect on %GM_1 incorporation at 1 mg/mL silica, 150 m*M* ionic strength, pH 7.4, and 0.5 μ*M* GM_1. The medium was a 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl solution at pH 7.4.

PC concentration required to cover all silica particles with one bilayer at 1 mg/mL silica is precisely 0.23 m*M*. Above this PC concentration, which is the one required for coverage of all particles with one PC bilayer, further increasing PC concentration-deviated GM_1 incorporation from biomimetic particles to free PC vesicles in excess in the dispersion. This caused the observed decrease in GM_1 incorporation in biomimetic particles because GM_1 would distribute homogeneously in all PC bilayers in the dispersion so that free PC vesicles would compete with biomimetic particles for GM_1 incorporation.

Cholera Toxin binding to GM_1 Incorporated in Biomimetic Particles

To differentiate specific from unspecific CT binding to biomimetic particles, CT binding determinations were performed in presence or absence of GM_1 under similar experimental conditions. These measurements revealed a negligible binding of 7% CT (2 μg) to biomimetic particles in absence of GM_1 (Table 2). The specific binding, in contrast, amounted to 67% of the total CT added (20 μg). On bare silica particles, as usually observed in the literature *(19,20)*, there was a significant unspecific CT binding amounting to 26% (8 μg) (Table 2).

At 1 mg/mL silica, 0.3 m*M* PC, and 5 μ*M* GM_1, cholera-toxin binding increased as a function of final cholera toxin concentration in the dispersions (Fig. 5A,C).

Table 2
Unspecific Against Specific CT Binding to Particles

Sample	Added CT (μg)	Bound CT (μg)	%CT binding	Bound CT (mg/m^2 silica)
Silica 1 mg/mL	30	8	26	0.65
Silica 1 mg/mL, PC 0.3 m*M*	30	2	7	0.18
Silica 1 mg/mL, PC 0.3 m*M*, GM1 5 μ*M*	30	20	67	1.71

Silica or bilayer-covered silica were the controls (unspecific binding). For testing specific binding, samples contained 5 μ*M* GM_1 incorporated in biomimetic particles. Each sample contained 0.25 mg of silica.

This binding was expressed either as mass of bound cholera toxin (Fig. 5A) or milligrams of bound cholera toxin per square meter of silica (Fig. 5C), or as a percentage of cholera-toxin binding (Fig. 5B). There was a saturation limit where a maximal level of cholera-toxin binding was reached as depicted from the plateau level achieved on the binding curves in Fig. 5. Maximal binding took place at approx 35 μg of added CT corresponding to 2 mg of bound CT per square meter of silica or 21 to 22 μg of bound CT (Fig. 5). The molar proportion for bound CT/GM_1/PC at maximal cholera-toxin binding was 1/5/300. Furthermore, the molecular areas also have to be considered (*see* Discussion). These areas were 30.2 nm^2 per CT molecule *(21)*, 4.0–5.3 nm^2 per GM_1 molecule *(22,23)*, and 105 nm^{2}per 300 PC molecules organized as a bilayer.

DISCUSSION

PC, GM_1, and CT self-assembly on silica were quantitatively determined on silica, and this procedure allowed determination of the molar proportion at maximal cholera-toxin binding at 150 m*M* ionic strength, namely, 1/5/300 CT/GM_1/PC (Fig. 5). Thus, 300 PC molecules would provide (300 × 0.7 nm^2)/2 =105 nm^2 of membrane area to incorporate five GM_1 molecules with 4.0–5.3 nm^2 each *(21,22)* that would bind one single pentameric CT molecule with 30.2 nm^2*(21).* The measured 1/5 CT/GM_1 molar ratio was consistent with literature and was also found from X-ray diffraction for determination of the crystal structure of cholera toxin B pentamer bound to receptor GM_1 pentasaccharide *(4).*

X-ray diffraction, neutron reflectivity and Monte Carlo simulations evaluated *in situ* the structure and packing of ganglioside–phospholipid monolayers nicely confirming absence of phase separation of components or lateral domain formation in these lipidic mixtures over a range of GM_1/lipid ratios (5–20% GM_1) *(22,23).* Neutron reflectivity at the air–liquid interface

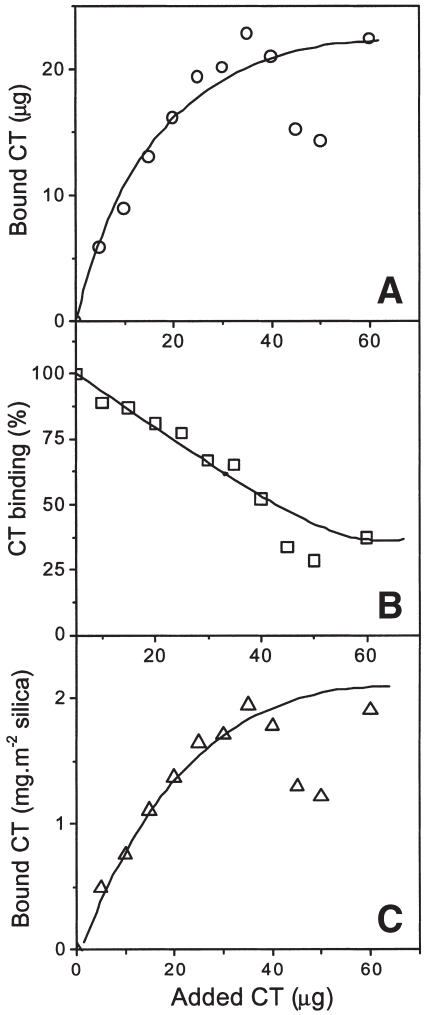


Fig. 5. CT binding to biomimetic particles at 1 mg/mL silica, 0.3 m*M* PC, and 5 μ*M* GM_1. Each mixture contained 0.25 mg of silica (47 m^2/g specific surface area). The medium was a 10 m*M* Tris-HCl, 140 m*M* NaCl solution at pH 7.4. CT binding was expressed as micrograms of CT bound to biomimetic particles **(A),** percentages of bound CT relative to the total mass added **(B),** and milligrams of bound protein per square meter of silica **(C).**

also characterized the structure of lipid monolayers with cholera toxin bound in its native state to GM_1. At a resolution of a few angstroms, the glycol–lipid extension of GM_1, the orientation of bound CT, and the distance between the protein layer and the lipid layer were determined *(21).* This last work has shown from simulations that the random distribution of GM_1 molecules in the lipidic monolayer would change upon CT binding, with binding constraining up to 5 GM_1 molecules at protein binding site locations *(21).* Therefore, our quantitative measurements were also consistent with these conclusions for receptor–protein assemblies in lipid monolayers at the air–water interface.

Silica particles were advantageously used to produce the biomimetic particles compared with the more expensive polymeric particles previously tested for reconstitution of the same GM_1/CT receptor–ligand pair *(8,17).* The problem with the polystyrene microspheres was related to poor particle coverage with continuous bilayers; PC adsorption from vesicles onto particles leading possibly to vesicle adhesion instead of microsphere bilayer coverage. As a consequence of insufficient bilayer coverage, and occurrence of adhered vesicles on polymeric particles, there were vacant particle areas available for unspecific CT adsorption. Thereby, a much higher CT binding yielded the apparent GM_1/CT molar proportion of 1/1 when polymeric particles were used as support *(8),* in clear disagreement with the expected molar ratio for GM_1/CT binding of 5/1. In the present work, controls in Table 2 have clearly shown that unspecific CT binding to biomimetic particles based on silica was practically absent. This led to the excellent agreement between expected and determined molar ratio for GM_1/CT at maximal binding. At the root of the optimized recognition was the increase in affinity between PC bilayer and silica achieved upon increasing ionic strength and thereby van der Waals attraction between PC bilayer and silica particle (Table 1).

The large surface area on biomimetic particles and the simplicity of the analytical methods used here will facilitate qualitative and quantitative studies for a variety of receptor–ligand pairs in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank FAPESP and CNPq for financial support.

REFERENCES

1. Karlsson, K. A. (1989) Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **58,** 309–350.
2. Merritt, E. A. and Hol, W. G. (1995) AB_5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 165–171.
3. Fukuta, S., Magnani, J. L., Twiddy, E. M., Holmes, R. K., and Ginsburg, V. (1988) Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect. Immun.* **56,** 1748–1753.
4. Merritt, E. A., Sarfaty, S., van den Akker, F., L'Hoir, C. L., Martial, J. A., and Hol, W. G. (1994) Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM_1 pentasaccharide. *J. Protein Sci.* **3,** 166–175.
5. Merritt, E. A., Kuhn, P., Sarfaty, S., Erbe, J. L., Holmes, R. K., and Hol, W. G. J. (1998) The 1.25 Å resolution refinement of the cholera toxin B-pentamer: evidence of peptide backbone strain at the receptor-binding site. *J. Mol. Biol.* **282,** 1043–1059.
6. Turnbull, W. B., Precious, B. L., and Homans, S. W. (2004) Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM_1 interaction by isothermal titration calorimetry. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 1047–1054.
7. Carmona-Ribeiro, A. M. (2001) Bilayer vesicles and liposomes as interface agents. *Chem. Soc. Rev.* **30,** 241–247.
8. Sicchierolli, S. M., and Carmona-Ribeiro, A. M. (1996) Biomolecular recognition at phospholipid-covered polystyrene microspheres. *J. Phys. Chem.* **100,** 16,771–16,775.
9. Bayerl, T. M. (2004) A glass bead game. *Nature* **427,** 105–106.
10. Baksh, M. M., Jaros, M., and Groves, J. T. (2004) Detection of molecular interactions at membrane surfaces through colloid phase transitions. *Nature* **427,** 139–141.
11. Sears, G. W. (1956) Determination of specific surface area colloidal silica by titration with sodium hydroxide. *Anal. Chem.* **28,** 1981–1983.
12. Batzri, S. and Korn, E. D. (1973) Single bilayer liposomes prepared without sonication *Biochim. Biophys. Acta* **298,** 1015–1019.
13. Rouser, G., Fleischer, S., and Yamamoto, A. (1970) Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5,** 494–496.
14. Rapuano, R. and Carmona-Ribeiro, A. M. (1997) Physical adsorption of bilayer membranes on silica. *J. Colloid Interface Sci.* **193,** 104–111.
15. Rapuano, R. and Carmona-Ribeiro, A. M. (2000) Supported bilayers on silica. *J. Colloid Interface Sci.* **226,** 299–307.
16. Moura, S. P. and Carmona-Ribeiro, A. M. (2003) Cationic bilayer fragments on silica at low ionic strength: competitive adsorption and colloid stability. *Langmuir* **19,** 6664–6667.
17. Sicchierolli, S. M. and Carmona-Ribeiro, A. M. (1995) Incorporation of the cholera-toxin receptor in phospholipid-covered polystyrene microspheres. *Colloids Surf. B* **5,** 57–61.
18. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193,** 265–275.
19. Kondo, A. and Higashitani, K. (1992) Adsorption of model proteins with wide variation in molecular properties on colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.* **150,** 344–351.
20. Suh, C. W., Kim, M. Y., Choo, J. B., Kim, J. K., Kim, H. K., and Lee, E. K. (2004) Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy. *J. Biotechnol.* **112,** 267–277.

21. Miller, C. E., Majewski, J., Faller, R., Satija, S., and Kuhl, T. L. (2004) Cholera toxin assault on lipid monolayers containing ganglioside GM_1. *Biophys. J.* **86,** 3700–3708.
22. Luckham, P., Wood, J., Froggat, S., and Swart, R. (1993) The surface properties of gangliosides: I. Monolayer properties. *J. Colloid Interface Sci.* **156,** 164–172.
23. Majewski, J., Kuhl, T. L., Kjaer, K., and Smith, G. S. (2001) Packing of ganglioside-phospholipid monolayers: an X-ray diffraction and reflectivity study. *Biophys. J.* **81,** 2707–2715.

Biomimetic particles for isolation and reconstitution of receptor function

S.P. Moura and A.M. Carmona-Ribeiro

Laboratório de Biocolóides - Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo

Introduction

Supramolecular assemblies on particles are becoming increasingly important to isolate and reconstitute membrane protein function. An important biotechnological application, among many others, is the development of biosensors for detecting a variety of toxins and other molecules. Cholera toxin from *Vibrio cholerae* (Figure 01), an 87 kDa protein, and its receptor the monosialoganglioside GM_1, present on the surface membrane of most cells, are used as a model pair to evaluate phosphatidylcholine (PC) covered silica nanoparticles regarding their suitability as a matrix to promote biomolecular recognition. It became evident that the extension of toxin binding on the PC-GM_1 covered silica surface is highly dependable on PC coverage and GM_1 incorporation efficiency. This work showed the self-assembly of lipids, receptor and toxin on the surface of hydrophilic silica particles.

Experimental

- *Ultrasonication*: for dispersion of colloidal silica particles from AEROSIL OX-50 of 300 nm effective diameter (Figure 02).
- *Ethanolic injection*: for the preparation of small unilamellar PC vesicles of 75-80 nm effective diameter.
- Quantitative *analysis*: PC adsorption isotherms were determined spectrophotometrically from the inorganic phosphorous. GM_1 concentrations in mixtures were determined fluorimetrically by light emission of pyrene-labeled GM_1 at 345 nm excitation and 375 nm peak emission. Total amount of protein in mixtures was determined by the Lowry method of protein dosage.

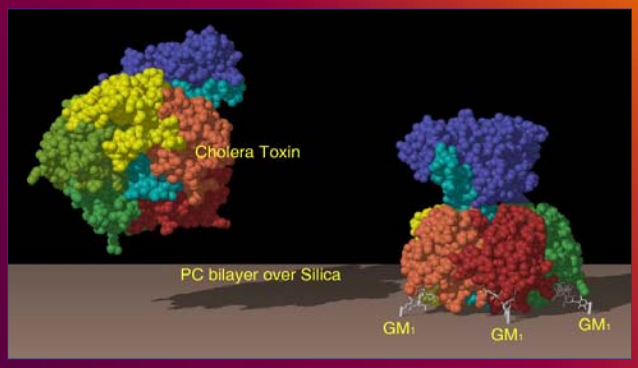


Figure 01 – Cholera toxin binding to GM1 receptors incorporated on the PC covered silica surface (image taken from the internet).

Results and discussion

PC bilayer adsorption on silica particles

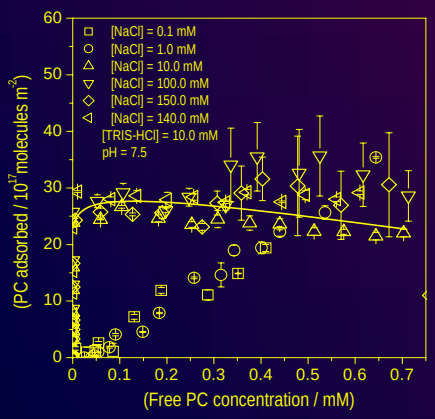


Figure 03 - PC adsorption from small unilamellar vesicles on silica particles in various saline solutions: (◁) 140 mM NaCl with 10 mM TRIS at pH~7.5.

GM_1 incorporation into the PC bilayer on silica particles

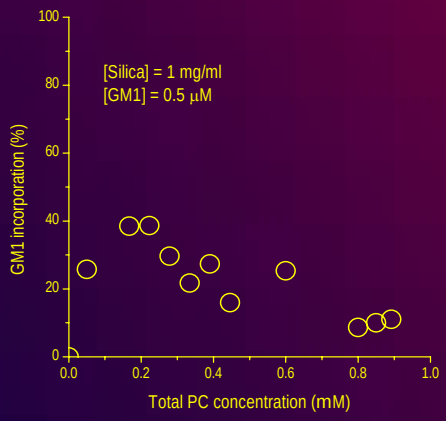


Figure 04 – GM1 incorporation (%) as a function of total PC concentration in the mixtures (mM) at 140 mM NaCl with 10 mM TRIS at pH~7.5. Final silica concentration in mixtures is 1 mg/ml and the GM_1 concentration is 0.5 μM.

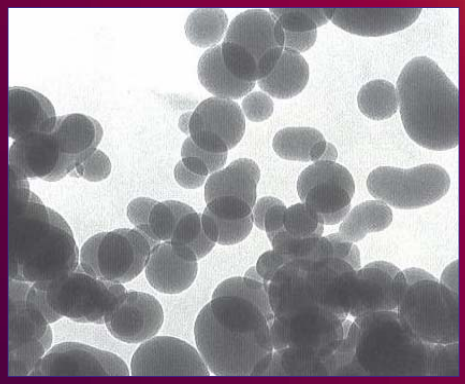
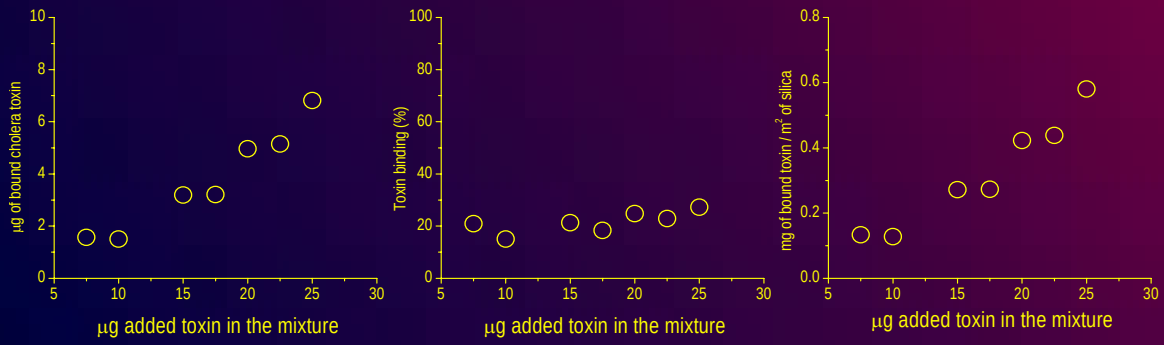


Figure 02 – TEM of AEROSIL OX-50 silica showing primary particles of 50 nm mean diameter.

Cholera Toxin Binding to GM_1

Figure 05 - Cholera toxin binding to PC covered silica particles in the presence of GM1 at 0.5 μM. Final PC concentration is 0.3 mM and silica concentration is 1 mg/ml. Surface area of the AEROSIL OX-50 silica measured by potentiometric titration was 47 m²/g.



Conclusions

- A single bilayer of phosphatidylcholine self-assembled over the silica as measured by adsorption isotherms and GM_1 molecules were successfully incorporated into this bilayer. Toxin molecules could then be bound to the GM_1 receptors on the bilayer covered silica particles.

References

1. Sicchierolli, S.M.; Carmona-Ribeiro, A.M. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 16771-16775.
2. Sicchierolli, S.M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **1995**, 5, 57-61.
3. Moura, S.P.; Carmona-Ribeiro, A.M. *Langmuir*. **2003**, 19, 6664-6667.

Financial Support: FAPESP

Biomimetic Particles: Optimization of Phospholipid Bilayer Coverage on Silica and Colloid Stabilization

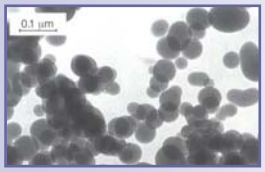
Sérgio de Paula Moura and Ana Maria Carmona-Ribeiro

Laboratório de Biocolóides - Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo

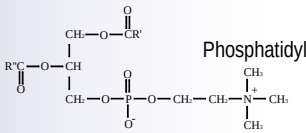
The Problem and The Working Hyphotesis

The problem was optimization of silica coverage with phosphatidylcholine (PC) bilayers from small unilamellar vesicles (SUV). Increasing van der Waals attraction between the silica surface and PC bilayer by increasing the ionic strength would eventually optimize the vesicle disruption step required for bilayer adsorption.

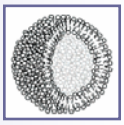
The System



Silica nanoparticles



Phosphatidylcholine (PC)



PC-SUV (60-70 nm)

The Methods

Ethanolic injection of PC in water or saline solution for the preparation of PC-SUVs.

- Dynamic light scattering for sizing and microelectrophoresis for ζ-potentials determinations of PC SUVs, silica particles and PC bilayer adsorbed silica particles.
- Inorganic phosphorus analysis for the determination of PC concentration.
- Adsorption isotherms for the determination of PC adsorption onto silica from PC-SUVs.

At pH 6.3, PC affinity for silica increases as a function of ionic strength: from 10 mM salt there was maximal adsorption compatible with one bilayer deposition

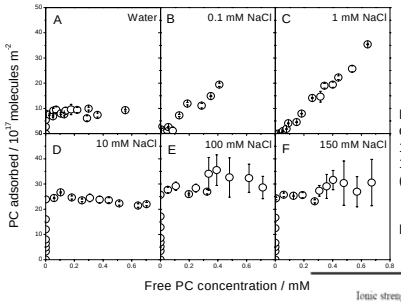


Fig.1 - PC adsorption isotherms from SUVs onto silica (1 mg/ml) in 0.1 (A), 1 (B), 10 (C), 100 (D) and 150 mM NaCl (E) at pH 6.3 or in 140 mM NaCl plus 10 mM TRIS-HCl at pH 7.4 (F).

LEGENDA ESTÁ ERRADA. CORRIGIR

Ionic strength	pH	Affinity Constant k (M^{-1})	Adsorption Maximum $(x/m)_{max}$ (molecules/m^2)
10 mM NaCl	6.3	95	27.21E+17
100 mM NaCl	6.3	387	29.93E+17
150 mM NaCl	6.3	2594	25.79E+17
140 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl	7.4	21121	28.50E+17

Table 2: Effect of ionic strength on adsorption parameters for PC adsorption from PC SUVs on silica (1mg/mL) at pH 6.3.

Colloidal stability increases with ionic strength

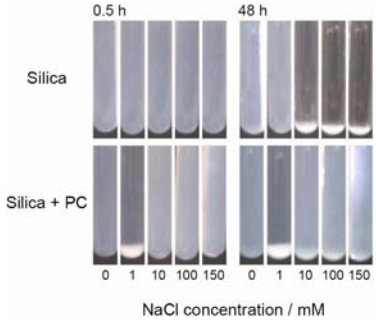


Fig.2 - Silica/PC mixtures at 1 mg/ml silica, 0.3 mM PC, pH 6.3, 25 °C and 0.5 or 48 h time of interaction after mixing over a range of NaCl concentrations.

At 10 mM ionic strength, PC affinity for silica decreases with pH

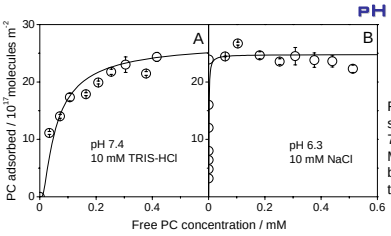


Fig.4 - PC adsorption from PC SUVs onto silica (1 mg/ml) in 10 mM TRIS-HCl at pH 7.4 (A) or 10 mM NaCl at pH 6.3 (B). Mixtures were incubated at 25 °C for 1 h before centrifuging and determining PC in the supernatant.

Ionic strength	pH	Affinity Constant k (M^{-1})	Adsorption Maximum $(x/m)_{max}$ (molecules/m^2)
10 mM NaCl	6.3	1234	25.01E+17
10 mM TRIS-HCl	7.4	24	24.76E+17
10 mM TRIS-HCl*	7.4*	20*	32.40E+17*

Table 3: pH effect on adsorption parameters for PC on silica (1mg/mL) at 10 mM ionic strength. The last line showed adsorption parameters for PC adsorption calculated from previous work (3).

At 150 mM NaCl and two different pH values, coverage of silica particles with a PC bilayer improves colloid stability and prevents sedimentation

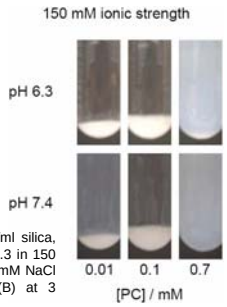


Fig.3 - Silica/PC mixtures at 1 mg/ml silica, 150 mM ionic strength, 25 °C, pH 6.3 in 150 mM NaCl solution (A) or 7.4 in 140 mM NaCl plus 10 mM TRIS-HCl solution (B) at 3 different PC concentrations.

The improved colloid stability induced by PC bilayer coverage is also inferred from size minimization

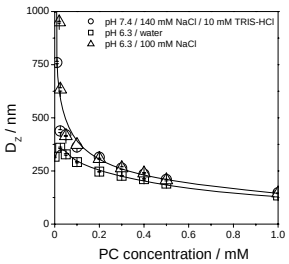


Fig.5 - Effect of PC concentration on the mean diameter (Dz) of silica (0.1 mg/ml) at 0 (□) or 100 mM NaCl at pH 6.3 (△). The same effect was shown at pH 7.4, 140 mM NaCl and 10 mM TRIS-HCl (○).

Table 1: Effect of different amphiphiles and lipids (1mM each) on zeta-potentials (z) and mean diameters (Dz) of silica (0.1mg/mL) in pure water at pH 6.3.

Sample	ζ / mV	Dz / nm
Silica	-45 ± 3	326 ± 3
Silica / sonicated DODAB	25 ± 1	246 ± 2
Silica / PC vesicles	-18 ± 3	162 ± 2
Silica / injected PC*	-12 ± 1	146 ± 2
Silica / CTAB	46 ± 3	333 ± 3

Conclusions

- Optimization of bilayer deposition took place over the 10-150 mM range of ionic strength at pH 6.3, suggesting the importance of van der Waals improved attraction in determining vesicle disruption and bilayer deposition.
- Bilayer depositon on silica changed its colloid stability so that silica sedimentation and mean particle size were minimized upon bilayer deposition.
- Bilayer deposition took place with higher affinity at the lowest pH tested, suggesting a role for hydrogen bonding between silica and PC in determining bilayer deposition.

Financial Support: FAPESP and CNPq

Cationic Lipid Modulates Phospholipid Adsorption on Silica

S.P. Moura and A.M. Carmona-Ribeiro*

Laboratório de Biocolóides - Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo

Introduction

Membrane-derivatized colloidal particles offer an extensive repertoire of chemical functionality and have been introduced as potential applications to a broad set of problems involving chemical events on cell membrane surfaces [1]. However, not always the interaction between bilayer vesicles and mineral surfaces produced the desired spreading of lipid bilayers on the supports [2]. In order to avoid the vesicle adhesion onto the supported bilayer, DPPC bilayer adsorption on silica was optimized from a small proportion of cationic lipid included in the DPPC bilayer composition.

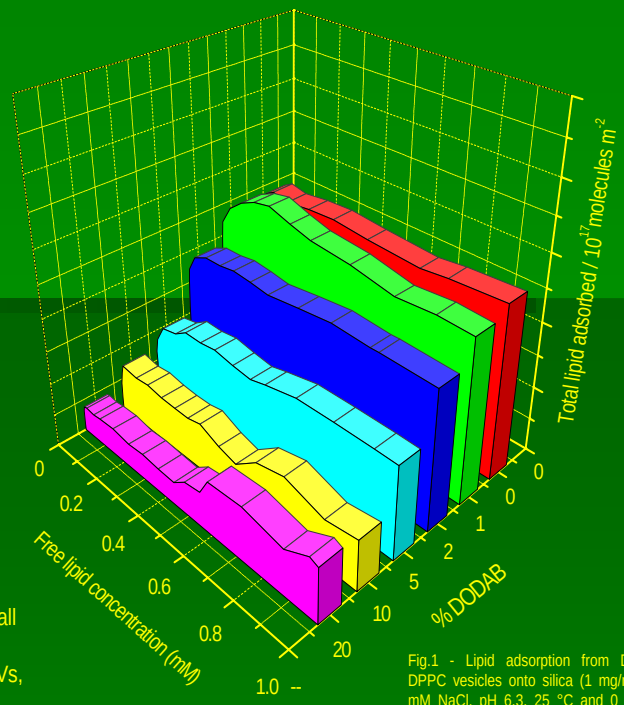
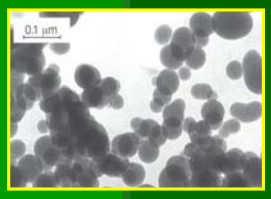


Fig.1 - Lipid adsorption from DODAB/ DPPC vesicles onto silica (1 mg/ml) at 1 mM NaCl, pH 6.3, 25 °C and 0 (red), 1 (green), 2 (dark blue), 5 (blue), 10 (yellow) and 20% (pink) DODAB.

Materials and Methods



Silica nanoparticles

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)

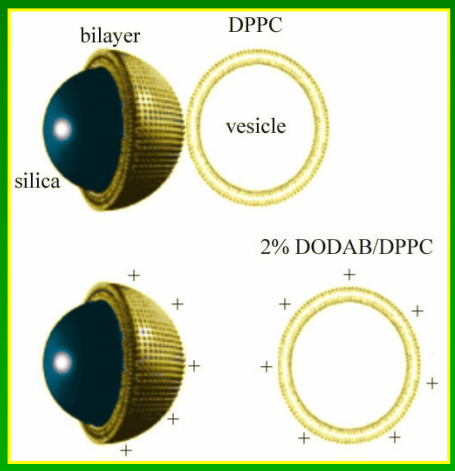
Dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB)

- Ethanolic injection of DPPC or DPPC/DODAB in water or saline solution for the preparation of small unilamellar vesicles (SUVs).
- Dynamic light scattering for sizing and microelectrophoresis for ζ-potentials determinations of SUVs, silica particles and lipid-covered silica particles.
- Inorganic phosphorous analysis for the determination of DPPC concentration.
- Adsorption isotherms for the determination of DODAB/DPPC bilayer adsorption onto silica from SUVs.

Results and Discussion

Sample	Dz / nm	ζ / mV
Sílica 0.1 mg/ml	271 ± 3	-45 ± 3
DPPC	88 ± 1	0 ± 1
DPPC/DODAB 1%	81 ± 1	22 ± 3
DPPC/DODAB 2%	79 ± 1	41 ± 5
DPPC/DODAB 5%	54 ± 1	41 ± 2
DPPC/DODAB 10%	31 ± 1	38 ± 1
DPPC/DODAB 20%	31 ± 1	39 ± 3

Table 1: Physical properties for silica particles and lipid vesicles. Mean zeta-average diameter (Dz) and zeta-potential (ζ) for silica particles and vesicles at 3 mM total lipid, 1 mM NaCl, pH 6.3, 25 ºC.



Scheme 1 - At limiting adsorption, adhered vesicles on bilayer-covered silica particles at 0 % DODAB/ 100% DPPC (on top) or supported bilayer on silica at 2 % DODAB/ 98 %DPPC assembly from composite vesicles onto silica (bottom).

Sample	Dz (nm)	ζ (mV)
Particles	271 ± 3	-45 ± 3
Particles / vesicles 0.1 mM DPPC	243 ± 3	1 ± 1
Particles / vesicles 0.3 mM (DPPC/ 1% DODAB)	224 ± 3	5 ± 2
Particles / vesicles 0.3 mM (DPPC/ 10% DODAB)	244 ± 2	32 ± 3
Particles / vesicles 0.3 mM (DPPC/ 20% DODAB)	292 ± 4	36 ± 2

Table 2: Mean zeta-average diameter (Dz) and zeta-potential (ζ) for silica particles (0.1 mg/mL) and particles/vesicles mixtures at 1 mM NaCl, pH 6.3, 25 ºC.

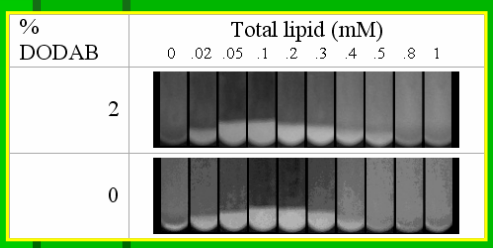


Fig. 2: Colloid stability of silica/vesicles mixtures at pH 6.3, 1 mM NaCl, 25 °C and 1 mg/ml silica. Pure DPPC vesicles (0% DODAB) and 98% DPPC (2% DODAB) vesicles were mixed, interacted for 1 h and were then photographed.

Conclusion

This study for the first time shows how phospholipid (DPPC) adsorption on silica can be modulated by varying cationic lipid (DODAB) molar ratio in DODAB/ DPPC bilayer vesicles. In addition it was shown that colloid stability is improved at total lipid concentrations at and above the amount required to cover all particles with one bilayer (0.4 mM total lipid). Most likely, the electrostatic repulsion between slightly positively charged supported bilayer and free positively charged vesicles in the dispersion is the explanation for avoidance of further vesicle adhesion onto bilayer-covered particles (Scheme 1).

References

1. Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. *Biophys. J.* 85, 3035 **2003**.

2. Moura, S.P.; Carmona-Ribeiro, A.M. *Cell Biochem. Biophys.* **2006** (in press).

Financial Support: FAPESP and CNPq

“Tudo neste livro pode estar errado.”

Manual do Messias – Lembretes para a alma avançada,
Richard Bach.