UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP– DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E
BIOLOGIA

Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo

Wallance Moreira Pazin

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

Wallance Moreira Pazin

Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto – SP

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pazin, Wallance Moreira.

Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo / Wallance Moreira Pazin ; orientador Amando Siuiti Ito. – Ribeirão Preto, 2012.

136 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

1. Membranas modelo; 2. Anisotropia de fluorescência; 3. DPH; 4. Lipídios marcados com NBD; 5. Ahba; 6. Espectroscopia de fluorescência; 7. Movimento *wobbling*.

Nome: PAZIN, Wallance Moreira

Título: Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Aprovado em: 27/03/2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Iouri Borissevich

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. João Ruggiero Neto

Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP.

Julgamento: Aprovado

*Aos meus pais e irmãs, que mesmo sem me
entender às vezes, nunca deixam de me apoiar
devido à confiança em mim depositada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, pela saúde e pela fé, motivos pelos quais nunca desisti de trilhar meu caminho;

Ao professor Amando, pela oportunidade de me deixar chamá-lo de orientador, pela amizade, pelos ensinamentos e por tudo o que aprendi ao longo destes dois anos de trabalho;

Aos meus pais Ivete e Junior e minhas irmãs Drielle e Drienne, que estão comigo em todos os momentos da minha vida. Mais que super-heróis, vocês são pra mim a prova de que o amor é incondicional;

À Amanda Burg Rech, por ter “suprimido bastante” (risos) a minha solidão no momento em que cheguei à Ribeirão Preto. Pela amizade, companheirismo, pelo carinho, enfim, por todos os momentos intensos que passamos juntos nestes dois últimos anos;

À Aline Mello, por acompanhar meus passos desde o ensino médio, por ter me hospedado nos momentos em que eu precisei, por todas as conversas, por toda a confiança e, principalmente, pela amizade verdadeira;

Ao Marcus, que está ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e fazendo com que eu sinta orgulho de mim mesmo e de tudo o que tenho feito e conquistado;

À Marina Berardi, primeiramente pelo companheirismo no laboratório e por toda a ajuda nos experimentos e nas discussões teóricas. Segundo e mais fundamental, agradeço à grande amizade criada ao longo do ano de 2010, que me mostrou que devemos sempre ser os mesmos, independente do ambiente em que você se encontra. Juntamente à Marina, agradeço também ao André (esposo) pela grande amizade criada e por todos os momentos divertidíssimos que já passamos;

À Érika (Kikinha), que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me dando forças nos momentos em que precisei. Agradeço também pela leitura da dissertação e pelas dicas sempre valiosas;

Ao Gustavo (PudimM), pelas discussões teóricas deste trabalho, pelos conselhos, pelo apoio, enfim, pelo grande amigo que ganhei;

Ao Samuel, antigo amigo e novo irmão da república;

Ao professor Iouri, por todo ensinamento, pelas conversas e pela confiança depositada nos momentos em que precisei utilizar seu laboratório;

Aos alunos do grupo de Fluorescência, Danilo, Sérgio, Luciana, principalmente à Larissa Montaldi (Morango), que dividiu comigo o espaço para que juntos conseguíssemos pensar e aperfeiçoar nossas práticas laboratoriais, além das conversas que fizeram com que hoje pudéssemos nos chamar de amigos;

À Giusi, pela constante alegria nos encontros festivos do grupo e também por me hospedar em sua casa quando precisei, juntamente ao professor Amando;

A todo pessoal do corredor, Éder, Carlão, Guilherme e em especial ao Jorge, pela amizade e principalmente pelos toques dados quando estou acima do peso (risos).

Ao Adriano, técnico do grupo, que nunca mede esforços nos momentos em que necessito de algum serviço ou de algum auxílio. Agradeço pelas boas risadas e pelo bom humor que faz com que tenhamos a alegria de sempre estar aqui trabalhando;

Ao Aziani e Élcio, por todo suporte técnico concedido, principalmente por terem criado o sistema de extrusão automática;

À Profa. Dra. Maria Elisabete D. Zaniquelli e ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, por terem concedido o uso de seus equipamentos para a realização dos experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz e de Calorimetria Diferencial de Varredura, respectivamente, no Departamento de Química;

Ao pessoal da Informática, por todo auxílio técnico;

A todo grupo de Biofísica do IF-USP, em especial à professora Vera B. Henriques e ao Jozismar;

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por tudo o que me foi concedido;

Aos professores, ao coordenador do programa Marcelo Mulato e à secretária do Departamento de Física Nilza Marino, pela intensa disponibilidade em ajudar e por todas as conversas e dúvidas tiradas;

À CAPES, pelo financiamento da pesquisa;

Ao INCT-FCx, CNPQ e à FAPESP, pelo apoio;

Enfim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

*“O único lugar onde o sucesso vem
antes do trabalho é no dicionário.”*

Albert Einstein

RESUMO

O estudo de agregados anfífilos é de extrema importância devido à sua mimetização de membranas celulares, que são essenciais para a vida da célula. Sabe-se que os fosfolípidos não possuem estruturas moleculares bem definidas nas membranas, porém exercem um papel essencial na manutenção da sua integridade. Fosfolípidos zwitteriônicos são um dos principais componentes estruturais das membranas celulares, e um modelo simplificado destas membranas são as bicamadas que estes fosfolípidos podem formar em meio aquoso. A principal característica destas bicamadas lipídicas é a auto-organização dos lipídios, fazendo-se necessário o estudo de processos naturais e espontâneos, como suas propriedades estruturais e dinâmicas. A espectroscopia de fluorescência tem sido utilizada no estudo de diversos processos e sistemas de interesse biológico, principalmente por medidas de anisotropia de fluorescência, que fornece informações sobre a dinâmica rotacional das sondas fluorescentes inseridas nos sistemas de interesse, refletindo efeitos combinados de flexibilidade, fluidez e interações estáticas com moléculas circundantes. Neste trabalho examinamos as propriedades estruturais e dinâmicas de membranas modelo fosfolipídicas formadas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) por técnicas relacionadas à espectroscopia de fluorescência, principalmente por medidas de anisotropia do estado estacionário e resolvida no tempo, das sondas fluorescentes 1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-il (NBD) ligado em diferentes regiões das moléculas fosfolipídicas e também da sonda lipofílica 2-amino-N-hexadecil-benzamida (Ahba). As medidas foram realizadas tanto acima como abaixo da temperatura de transição de fase das bicamadas fosfolipídicas de DPPC, na fase gel e líquido-cristalina, devido à diferença da organização lateral das cadeias de hidrocarboneto nestas duas fases. Medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas para confirmar a formação das vesículas unilamelares pelo processo de extrusão da suspensão lipídica contendo vesículas multilamelares, e a técnica de calorimetria diferencial de varredura foi empregada para verificar se baixa concentração das sondas fluorescentes nas vesículas afetam seu empacotamento lipídico. Pelos resultados obtidos, constatamos que os comportamentos das sondas fluorescentes diferem em ambas as fases das bicamadas fosfolipídicas, revelando suas propriedades estruturais e dinâmicas, principalmente

pelas diferentes localizações dos fluoróforos. Verificamos que, devido à afinidade pela região hidrofóbica, o movimento rotacional do DPH é restrito ao movimento “*wobbling*”, limitado pelas cadeias alifáticas. Para o NBD em lipídios marcados, o movimento do análogo fluorescente como um todo depende da localização do fluoróforo e de sua conformação em ambas as fases das bicamadas lipídicas. Devido à localização do grupo fluorescente da sonda Ahba na interface das bicamadas lipídicas, verificamos que seu movimento rotacional aumenta à medida que a bicamada torna-se mais fluida, mostrando uma dependência deste movimento com a microviscosidade destas bicamadas.

Palavras-chave: Membranas modelo; Anisotropia de fluorescência; DPH; Lipídios marcados com NBD; Ahba; Espectroscopia de fluorescência; Movimento *wobbling*.

ABSTRACT

The study of amphiphilic aggregates is extremely important due to their cell membrane mimic, which are essential for the life of the cell. It is known that phospholipids do not have molecular structure well defined in membranes, but play an essential role in maintaining of their integrity. Zwitterionic phospholipids are one of the main components of cell membranes, and a simplified model for the membranes are the bilayers they can form in aqueous medium. The main characteristic of lipid bilayers is the self-organization of lipids, making it necessary to study natural and spontaneous process, as their structural and dynamical properties. The fluorescence spectroscopy has been used to study many processes and systems of biological interest, especially by measurement of fluorescence anisotropy, which gives information about the rotational dynamics of the fluorescent probe inserted in the systems of interest, reflecting the combined effects of flexibility, fluidity and static interactions with surrounding molecules. In this work we examined the structural and dynamic properties of phospholipid model membranes formed of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocoline DPPC by techniques related to fluorescence spectroscopy, mainly by measurements of steady-state and time resolved anisotropy of the probes 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-yl (NBD) attached to different regions of phospholipid molecules and also the lipophilic probe 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (Ahba). The measurements were performed above and below of the phase transition temperature of the phospholipid bilayers of DPPC, gel and liquid-crystalline phase, due to the difference in the lateral organization of hydrocarbon chains in these two phases. Measures of dynamic light scattering (DLS) was performed to confirm the formation of the unilamellar vesicles by extrusion of lipid suspension containing multilamellar vesicles, and the technique of differential scanning calorimetry (DSC) was used to verify if the low concentration of fluorescent probes in lipid vesicles affect its packing. From the results, we found that the behavior of the different fluorescent probes differ in both phases of phospholipid bilayers, revealing their structural and dynamic properties, mainly because to specific locations of the fluorophores. We verify that, due to the affinity for the hydrophobic region, the rotational motion of the DPH is restricted to the “wobbling” motion, limited by hydrocarbon chains. For the NBD labeled in lipids, the motion of the fluorescent analogues as a whole depends on the location of the

fluorophore and on the lipid conformation in both phases of lipid bilayers. Because of the location of the fluorescent group of the probe Ahba in the interface of lipid bilayers, we found that its rotational motion increases as the bilayers becomes more fluid, showing a dependency of the motion with the microviscosity of these bilayers.

Keywords: Model membranes; fluorescence anisotropy; DPH; NBD-labeled lipid; Ahba; fluorescence spectroscopy; wobbling motion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Ilustração da molécula Fosfatidilcolina (PC). Adaptado de: [1].	33
Figura 2.2: Tipos de agregados anfifílicos dependentes do formato geométrico representativo para diferentes lipídios e surfactantes. Adaptado de: [31].	34
Figura 2.3: Preparação de vesículas multilamelares (MLVs) por hidratação. Fonte [35].	35
Figura 2.4: Representação da obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs), por sonicação e extrusão das vesículas multilamelares (MLVs), respectivamente. Fonte: [39].	36
Figura 2.5: Esquema do dispositivo eletroformador para obtenção de vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Adaptado de: [22].	37
Figura 2.6: Figura esquemática das fases termodinâmicas das bicamadas lipídicas. Fonte: [41].	38
Figura 2.7: Formato da molécula 1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno. Fonte: [48].	39
Figura 2.8: Estrutura química da molécula NBD e de três análogos fluorescentes lipídicos ligados a este fluoróforo em diferentes posições. Fonte: [49]	41
Figura 2.9: Estrutura química da molécula Ahba. Fonte [19].	42
Figura 2.10: Níveis de energia de uma molécula diatômica simples.	43
Figura 2.11: Representação da absorção de luz por uma amostra, em função da distância percorrida pela luz no caminho óptico. Fonte [52].	44

Figura 2.12: Diagrama de Perrin-Jablonski representando os processos de excitação eletrônica e emissão característica de processos radiativos e não-radiativos.....	46
Figura 2.13: Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro. Fonte: [53].	48
Figura 2.14: Diagrama esquemático para medida de fluorescência temporal pelo método TCSPC. Fonte: [53].	51
Figura 2.15: Esquema de medida de fluorescência polarizada. Adaptado de: [53].	54
Figura 2.16: Esquema de medida de anisotropia com a adição de polarizadores perpendicularmente e paralelamente orientados.....	58
Figura 2.17: Representação esquemática de uma endoterma caracterizando um evento térmico. Adaptado de: [57].....	64
Figura 2.18: Representação de medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz por PCS em uma amostra de partículas grandes e outra de partículas pequenas. A intensidade de luz espalhada é medida em função do tempo.	66
Figura 2.19: Intensidade de luz espalhada e a obtenção da função de auto-correlação de intensidade espalhada em função do tempo, em unidades arbitrárias. Adaptado de: [58]	66
Figura 3.1: Estrutura molecular do fosfolipídio DPPC.....	69
Figura 3.2: Sistema automatizado de Extrusão para obtenção de vesículas unilamelares grandes (LUVs).	70
Figura 3.3: Espectrômetro <i>Ultrospec 2100 pro</i>	72
Figura 3.4: Espectrofluorímetro <i>Hitachi F-7000</i>	73

Figura 3.5: *Lasers* (a) *Millenia* e (b) *Tsunami*, utilizados como fonte de excitação nos experimentos de fluorescência com resolução temporal..... 74

Figura 3.6: Diagrama esquemático de um equipamento de espalhamento dinâmico de luz de 90° convencional..... 76

Figura 4.1: **à esquerda** - Espectros de absorção da molécula DPH em etanol, em sete diferentes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 μM ; **à direita** - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda DPH para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ). 79

Figura 4.2: Ajuste do perfil de decaimento da fluorescência do DPH a 5 μM em etanol, com pulso de excitação (IRF) em 355 nm e emissão em 430 nm. 80

Figura 4.3: **à esquerda** - Obtenção dos decaimentos da fluorescência do DPH a 5 μM em etanol, com a adição de polarizadores cruzados (paralelos e perpendiculares) na excitação e emissão da amostra para obtenção do decaimento da anisotropia; **à direita** - Decaimento da anisotropia do DPH a 5 μM em etanol e seus respectivos resíduos para obtenção de um melhor valor de χ^2 para ajuste da curva. 81

Figura 4.4: **à esquerda** - Espectros de absorção do C6-NBD-PC em etanol, em sete diferentes concentrações: 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 μM ; **à direita** - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda C12-NBD-PC para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ). 82

Figura 4.5: **à esquerda** - Espectros de absorção do C12-NBD-PC em etanol, em sete diferentes concentrações: 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 μM ; **à direita** - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda C6-NBD-PC para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ). 82

Figura 4.6: **à esquerda** - Espectros de absorção do NBD-PE em etanol, em sete diferentes concentrações: 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 μM ; **à direita** - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda NBD-PE para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ)..... 83

Figura 4.7: Perfis de decaimento da fluorescência do NBD ligado em três diferentes posições lipídicas a 5 μM em etanol, com pulso de excitação em 470 nm e emissão em 530 nm..... 85

Figura 4.8: Decaimento da anisotropia da molécula C6-NBD-PC a 5 μM em etanol. . 86

Figura 4.9: **à esquerda** - Espectros de absorção da sonda Ahba em etanol, em sete diferentes concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM ; **à direita** - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda Ahba para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ). 87

Figura 4.10: Perfil de decaimento da fluorescência da sonda Ahba 20 μM em etanol, com pulso de excitação em 330 nm e emissão em 405 nm. 88

Figura 4.11: Decaimento da anisotropia da sonda Ahba a 20 μM em etanol. 89

Figura 4.12: C_p (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para suspensão de vesículas de DPPC a 0,5 mM, após subtração da linha de base. 90

Figura 4.13: Distribuição de tamanho das vesículas obtidas por extrusão da suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, calculada pelo método automático do *software*. **À esquerda** – medida a 25 $^{\circ}\text{C}$ (abaixo da transição); **à direita** – medida a 50 $^{\circ}\text{C}$ (acima da transição). 91

Figura 4.14: C_p (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença da sonda DPH a 5 μM incorporada às vesículas, após subtração da linha de base. 93

- Figura 4.15:** Distribuição de tamanho das vesículas obtidas por extrusão da suspensão lipídica de DPPC 0,5 mM com DPH a 5 μ M incorporado às vesículas, calculada pelo método automático do *software*. À esquerda – medida a 25°C (abaixo da transição); à direita – medida a 50°C (acima da transição). 94
- Figura 4.16:** Espectros de fluorescência da sonda DPH a 5 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, com excitação e emissão polarizada, obtidas em temperaturas compreendidas entre 25°C e 46°C. 95
- Figura 4.17:** Anisotropia estática em função da temperatura para o DPH a 5 μ M incorporado às vesículas de DPPC a 0,5 mM. 96
- Figura 4.18:** Decaimento da fluorescência da sonda DPH a 5 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em 25°C e 50°C, com adição de polarizadores de excitação (0°) e emissão (54,7°), com comprimentos de onda de 330 nm e 405 nm, respectivamente. 97
- Figura 4.19:** Perfis de decaimento da anisotropia para a sonda DPH a 5 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM: na fase gel (29°C e 37°C) e na fase líquido-cristalina (45°C e 53°C). 99
- Figura 4.20:** Tempos de correlação rotacional ϕ_1 e ϕ_2 da sonda DPH a 5 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, na faixa de temperatura de 22°C a 53°C. 100
- Figura 4.21:** Modelo esquemático de representação das localizações da sonda DPH nas bicamadas lipídicas de DPPC. 101
- Figura 4.22:** Sistema esquemático de movimento “*wobbling in a cone*” da sonda DPH restrito pelas cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios nas bicamadas. Fonte: [60]. 102

- Figura 4.23:** Ângulo de abertura do “cone wobbling” referente ao movimento da sonda DPH inserida entre as cadeias fosfolipídicas das vesículas de DPPC. 103
- Figura 4.24:** C_P (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para suspensão lipídica de vesículas de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença de 5 μM das moléculas C6-NBD-PC (à esquerda), C12-NBD-PC (à direita) e NBD-PE (abaixo) incorporadas às vesículas, após subtração da linha de base. 105
- Figura 4.25:** Distribuição de tamanho das vesículas obtidas por extrusão da suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM com 5 μM de C6-NBD-PC, calculada pelo método automático do *software*. À esquerda – medida a 25°C (abaixo da transição); à direita – medida a 50°C (acima da transição). 107
- Figura 4.26:** Espectros de fluorescência em diferentes temperaturas da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM , incorporadas às vesículas de DPPC a 0,5 mM. À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. As amostras foram excitadas em 465 nm. 108
- Figura 4.27:** Gráfico das intensidades dos picos de emissão das sondas C6-NBD-PC, C12-NBD-PC E NBD-PE a 5 μM em vesículas de DPPC a 0,5 mM, obtidas na faixa de temperatura de 28 a 54°C 109
- Figura 4.28:** Ilustração das diferentes localizações do fluoróforo NBD ligado na cadeia de ácido graxo em vesículas fosfolipídicas abaixo da temperatura de transição ($T < T_C$) e acima da temperatura de Transição ($T > T_C$). Fonte: [49]. 110
- Figura 4.29:** Anisotropia estática em função da temperatura para o fluoróforo NBD ligado à cadeia de ácido graxo na posição C6 e C12 e na cabeça polar do lipídio PE a 5 μM , incorporados às vesículas de DPPC a 0,5 mM. 111

Figura 4.30: Decaimento da fluorescência da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM incorporadas às vesículas de DPPC a 0,5 mM, com adição de polarizadores de excitação (0°) e emissão ($54,7^\circ$). À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. As amostras foram excitadas em 465 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 530 nm. 112

Figura 4.31: Perfis de Decaimento da anisotropia da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM incorporados às vesículas de DPPC a 0,5 mM. À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. As amostras foram excitadas em 465 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 530 nm. 114

Figura 4.32: Tempos de correlação rotacional ϕ_1 e ϕ_2 da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM incorporados às vesículas de DPPC a 0,5 mM. À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. Os valores obtidos são de medidas de decaimento da anisotropia na faixa de temperatura de 23°C a 52°C 115

Figura 4.33: C_p (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^\circ\text{C}$) para suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas, após subtração da linha de base. 119

Figura 4.34: Distribuição de tamanho da suspensão de vesículas de DPPC a 0,5 mM com a sonda fluorescente Ahba a 20 μM incorporada às vesículas, obtida na fase gel a 25°C (à esquerda) e na fase líquido-cristalina a 50°C (à direita), calculada pelo método automático do software. 120

Figura 4.35: Espectros de fluorescência da sonda Ahba 20 μM com excitação em 350 nm, incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em diferentes temperaturas compreendidas entre 25°C e 46°C 121

Figura 4.36: Anisotropia estática em função da temperatura da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM. 122

Figura 4.37: Decaimento da fluorescência da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, a 25°C e a 50°C, com adição de polarizadores de excitação (0°) e emissão ($54,7^\circ$). As amostras foram excitadas em 330 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 405 nm. 123

Figura 4.38: Decaimento da anisotropia para a sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas de DPPC 0,5 mM, na fase gel (28°C e 37°C) e na fase líquido-cristalina (46°C e 54°C). As amostras foram excitadas em 330 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 405 nm. 124

Figura 4.39: Tempos de correlação rotacional ϕ_1 e ϕ_2 da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, para temperaturas compreendidas entre 22°C e 53°C..... 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Parâmetros de ajuste do perfil do decaimento da fluorescência e da anisotropia do DPH a 5 μM em etanol.....	81
Tabela 4.2: Valores dos coeficientes de absorção molar das sondas C6-NBD-PC, C12-NBD-PC e NBD-PE em etanol.....	83
Tabela 4.3: Parâmetros de ajuste do perfil do decaimento da fluorescência e da anisotropia do NBD nas diferentes posições lipídicas a 5 μM , em etanol.	86
Tabela 4.4: Parâmetros de ajuste do perfil do decaimento da fluorescência e da anisotropia da sonda Ahba a 20 μM em etanol.	89
Tabela 4.5: Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença de 5 μM da sonda DPH incorporada às vesículas.	93
Tabela 4.6: Parâmetros de ajuste do perfil de decaimento da fluorescência da sonda DPH a 5 μM com suas respectivas contribuições percentuais e χ^2 , em etanol e incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em temperaturas acima e abaixo da transição.	98
Tabela 4.7: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do DPH 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.	104
Tabela 4.8: Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para suspensão lipídica de vesículas de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença de 5 μM da sonda NBD em diferentes posições lipídicas incorporadas às vesículas.....	106
Tabela 4.9: Tempos de vida da sonda NBD em diferentes posições de lipídios a 5 μM , com suas respectivas contribuições percentuais e χ^2 em etanol e incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em temperaturas acima e abaixo da transição.	113

Tabela 4.10: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia da sonda C6-NBD-PC 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.	117
Tabela 4.11: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do C12-NBD-PC 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.	117
Tabela 4.12: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do NBD-PE 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.	118
Tabela 4.13: Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para suspensão lipídica a 0,5 mM de DPPC, na ausência e na presença de 20 μM da sonda Ahba incorporada às vesículas.	119
Tabela 4.14: Tempos de vida da sonda Ahba 20 μM com suas respectivas contribuições percentuais e χ^2 , em etanol e incorporada às vesículas de DPPC a 0.5 mM, em temperaturas acima e abaixo da transição.	123
Tabela 4.15: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do Ahba 20 μM em vesículas de DPPC a 0,5 mM.	126

LISTA DE SÍMBOLOS

a_0	área de ocupação da cabeça polar do lipídio
v	volume de ocupação efetivo da cadeia do lipídio
l_c	tamanho efetivo da cadeia do lipídio
T_c	temperatura de transição
ε	coeficiente de absorção molar
l	caminho óptico
h	constante de Planck – $6,626 \times 10^{-34}$ J.s
C_p	capacidade térmica
ϕ_F	rendimento quântico da fluorescência
D	coeficiente de difusão rotacional
ΔS	variação de entropia
ΔH	variação de entalpia
N_2	nitrogênio gasoso
D_0	difusão translacional
τ	tempo de vida
τ_n	tempo de vida natural ou intrínseco
r_0	anisotropia inicial
r_∞	anisotropia residual
V_{HD}	volume hidrodinâmico

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il
Ahba	2-amino-N-hexadecil-benzamida
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletalona
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
MLV	do inglês <i>Multilamellar Vesicles</i>
LUV	do inglês <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
SUV	do inglês <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
GUV	do inglês <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>
TCSPC	do inglês <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>
CI	conversão interna
CIS	cruzamento inter-sistemas
PCS	do inglês <i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
DLS	do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DSC	do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
G	Fator-G

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xxii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxiii
1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Estudo de membranas modelo por sondas fluorescentes	27
1.2 Objetivos do Trabalho.....	30
2. ASPECTOS TEÓRICOS.....	31
2.1 Membranas Modelo	32
2.1.1 Composição, Estrutura e Formação	32
2.1.2 Transição de Fase	37
2.2 Sondas Fluorescentes	39
2.2.1 1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).....	39
2.2.2 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD)	40
2.2.3 2-amino-N-hexadecil-benzamida (Ahba)	41
2.3 Espectroscopia de UV-Vis	42
2.3.1 Espectroscopia de Absorção Óptica	42
2.3.2 Espectroscopia de Fluorescência.....	45
2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	62
2.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	65

3. METODOLOGIA.....	68
3.1 Materiais.....	69
3.2 Condições Experimentais e Preparação das Soluções Estoque.....	69
3.3 Preparação das Vesículas Fosfolípídicas de DPPC	70
3.4 Medidas de Espectroscopia de Absorção.....	71
3.5 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência do Estado Estacionário	72
3.6 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo	73
3.7 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	75
3.8 Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	75
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 77
4.1 Caracterização das sondas fluorescentes em meio isotrópico	78
4.1.1 DPH.....	78
4.1.2 Lipídios marcados com NBD	81
4.1.3 Ahba.....	87
4.2 Estudo de transição de fase, tamanho e propriedades ópticas por DSC e espalhamento de luz das vesículas de DPPC.....	89
4.2.1 Temperatura de transição (T_c) das vesículas de DPPC.....	89
4.2.2 Tamanho das Vesículas de DPPC	90
4.3 Monitoramento das propriedades estruturais e dinâmicas de vesículas de DPPC por sondas fluorescentes.....	92
4.3.1 Interação da sonda DPH com vesículas de DPPC.....	92
4.3.2 Interação da sonda NBD com vesículas de DPPC	104
4.3.3 Interação da sonda Ahba com vesículas de DPPC	118
 5. CONCLUSÕES.....	 127
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 131

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estudo de membranas modelo por sondas fluorescentes

Dentro da biofísica, o estudo de agregados anfifílicos é de extrema importância devido à sua mimetização de membranas celulares, que são essenciais para a vida da célula. As membranas biológicas que envolvem a célula possuem uma estrutura geral, formadas principalmente de moléculas de lipídios (que constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas de células de eucariotos) e proteínas (que constitui quase todo o restante), mantidas juntas por interação não-covalente. São algumas características fundamentais das membranas celulares: (i) estruturas dinâmicas, fluidas e a maior parte de suas moléculas são capazes de mover-se no plano da membrana; (ii) as moléculas lipídicas são arranjadas como uma dupla camada contínua com cerca de 5 nm de espessura e (iii) as bicamadas lipídicas formadas fornecem a estrutura básica da membrana e atuam como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis [1]. As proteínas de membrana têm papel importante no transporte de moléculas através das membranas e também em processos de sinalização química, enquanto suas funções são determinadas pelas propriedades estruturais das bicamadas lipídicas em que estão inseridas [2].

Os fosfolipídios zwitteriônicos, além de esfingolipídios e colesterol, são os principais componentes estruturais de membranas plasmáticas de eucariotos e exercem um papel essencial na manutenção da sua integridade, estando ligados a algumas funções de proteínas de membranas. Aparentemente, sabe-se que os lipídios nas membranas não possuem estruturas moleculares bem definidas, como por exemplo, as proteínas [3], mas diversos estudos mostraram que a interação de fármacos, peptídeos e outras moléculas anfipáticas podem modificar propriedades estruturais de membranas modelo [4, 5].

A espectroscopia e a microscopia de fluorescência têm sido utilizadas no estudo de diversos processos e sistemas de interesse biológico [6-8], incluindo estudos sobre estados de agregação de componentes da superfície celular, estudo de dinâmica e de processos espontâneos em membranas, como transição de fase, fusão de membranas, atividades de transporte lipídico e difusão lateral dos lipídios [9-11], além de estruturas de peptídeos e proteínas [12-14].

Informações relevantes são obtidas com o uso de técnicas que permitem a resolução temporal da emissão: o tempo característico envolvido nos processos de

absorção e emissão fluorescente, da ordem de 10^{-9} s é compatível com eventos relacionados à interação da molécula emissora com o meio circundante. Desse modo, as técnicas de fluorescência estática, combinadas com as técnicas resolvidas no tempo são particularmente atraentes para o estudo de diversos fenômenos relacionados às propriedades dinâmicas de sistemas biológicos, como as membranas modelo.

As informações obtidas com a técnica de fluorescência resultam de medidas efetuadas em amostras nas quais está presente uma sonda fluorescente, que pode ser uma molécula intrínseca ao sistema em estudo, como por exemplo, o resíduo triptofano em peptídeos e proteínas [15, 16] ou por moléculas incorporadas ao sistema por meio de interações de diferentes naturezas, como derivados de grupos fluorescentes com afinidade por agregados anfifílicos [17-19].

Estudos de monitoramento da organização lipídica em membranas por espectroscopia fluorescência são possíveis a partir do conhecimento de propriedades de emissão pelas sondas fluorescentes, que estão fortemente dependentes do ambiente em que se encontram. Essas dependências estão vinculadas às interações com o meio, que resultam nos efeitos gerais de solventes, descritos por grandezas macroscópicas como constante dielétrica, polaridade e índice de refração [20] e ainda efeitos específicos, oriundos de interação com espécies presentes no meio, como prótons, íons ou outros grupos moleculares [21]. Ainda, alterações na fluorescência também podem ser moduladas por fatores gerais, como os efeitos térmicos e mudanças na viscosidade do meio ou na concentração de íons (força iônica) [22].

Particularmente, em sistemas de interesse biofísico como membranas modelo, o meio nem sempre é homogêneo, levando a situações complexas que os modelos mais simples de interações da sonda em meio contínuo não conseguem descrever. Estas interações muitas vezes são analisadas por técnicas como a anisotropia da fluorescência, que tem sido amplamente utilizada para caracterizar a estrutura e dinâmica de membranas plasmáticas e bicamadas fosfolipídicas, além das interações de moléculas que modulam e modificam suas propriedades [23-25].

As diferenças estruturais e físico-químicas das sondas fluorescentes permitem que regiões específicas de interesse das bicamadas lipídicas sejam monitoradas. Elas podem estar inseridas totalmente na região hidrofóbica das cadeias de hidrocarboneto, como o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), podem estar ligadas covalentemente em posições específicas de lipídios, como o 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD) ligado

seja na cabeça polar da fosfatidiletalona (NBD-PE), seja nos carbonos 6 ou 12 da fosfatidilcolina (C6-NBD-PC e C12-NBD-PC) ou ainda apresentarem uma cadeia de hidrocarbonetos (hexadecila) ligada a um fluoróforo (no caso o ácido *o*-aminobenzóico - *o*-abz), tal que localizam-se preferencialmente na região de interface, como o 2-amino-N-hexadecil-benzamida (Ahba).

A anisotropia de fluorescência permite a análise do movimento rotacional da sonda e de possíveis restrições a este movimento, que podem ser impostas dependendo do meio em que ela está inserida. As medidas por esta técnica podem ser obtidas tanto no estado estacionário quanto resolvido no tempo, sendo que os resultados obtidos para as medidas estáticas estimam a microviscosidade do meio, enquanto que medidas de resolução temporal da despolarização de fluorescência, utilizadas por fornecerem informações que indicam a distribuição orientacional das sondas no equilíbrio anisotrópico, inferem a dinâmica das interações moleculares, que são essenciais para o entendimento da estrutura e função de membranas biológicas [26-28].

As medidas de anisotropia do estado estacionário podem monitorar mudanças nas restrições orientacionais das sondas fluorescentes impostas pela ordem ou desordem das cadeias alifáticas, após a passagem da fase gel para a fase líquido-cristalina das vesículas fosfolipídicas. Estas diferenças, refletidas nos valores de anisotropia estática, são dependentes da localização e da conformação da sonda inserida nas bicamadas. Este agregado fosfolipídico encontra-se na fase gel em temperaturas que precedem sua temperatura de transição, arranjando suas cadeias laterais numa forma estendida e altamente ordenada, diferentemente do seu arranjo em temperaturas acima da transição, na fase líquido-cristalina, onde as cadeias são desorganizadas e não apresentam ordem lateral [29].

Outra importante ferramenta de estudo já mencionada são as medidas de anisotropia resolvida no tempo, que fornecem informações sobre a dinâmica de sistemas biológicos. O decaimento da anisotropia de fluorescência é causado tanto pela dinâmica do fluoróforo como também pela dinâmica do sistema onde o fluoróforo é inserido. A dinâmica de um fluoróforo num sistema micro-heterogêneo como as membranas modelo é completamente diferente se comparado a solventes isotrópicos (líquidos homogêneos). No caso dos sistemas biológicos, a difusão rotacional da sonda fluorescente é limitada devido à região específica em que ela é inserida, enquanto que para soluções homogêneas de baixa viscosidade, a sonda não apresenta restrição no seu

movimento rotacional e sua despolarização pode ser interpretada em termos da difusão rotacional.

1.2 Objetivos do Trabalho

O objetivo principal deste trabalho é obter informações sobre propriedades estruturais e dinâmicas de membranas modelo formadas de DPPC por técnicas relacionadas à espectroscopia de fluorescência através da interação das sondas fluorescentes DPH, NBD-fosfolipídios e Ahba, que possuem diferenças quanto suas estruturas e propriedades físico-químicas, com as vesículas fosfolipídicas.

A principal técnica fluorescente aplicada neste trabalho foi a anisotropia de fluorescência, tanto do estado estacionário como resolvida no tempo, onde foram comparados os estudos conduzidos em meio homogêneo com os realizados nas vesículas fosfolipídicas, examinando-se possíveis modelos para os processos dependentes da difusão rotacional limitada das moléculas envolvidas. Os resultados foram complementados por medidas de espectros de emissão e perfis de decaimento da fluorescência.

Verificamos se houve uniformidade nos diâmetros das vesículas fosfolipídicas formadas por medidas de espalhamento dinâmico de luz e controlamos possíveis influências causadas no empacotamento lipídico destas bicamadas pela interação das sondas fluorescentes, tanto na fase gel como na fase líquido-cristalina, atentando-nos às medidas de calorimetria diferencial de varredura.

No capítulo a seguir, são trazidas as descrições teóricas dos modelos e das técnicas experimentais envolvidas nos experimentos, enfocando principalmente o estudo teórico da espectroscopia UV-Vis. No capítulo 3 são apresentados os compostos utilizados no trabalho, bem como a descrição dos equipamentos utilizados nos experimentos. No capítulo 4 estão apresentados os resultados experimentais obtidos e as análises destes resultados com uma posterior discussão. O último capítulo refere-se à conclusão do trabalho, apresentando e comparando de forma sucinta os resultados descritos no capítulo 4.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

O Capítulo 2 faz uma abordagem básica do sistema estudado neste trabalho, bem como sua formação e suas características físico-químicas. Traz também uma breve descrição sobre as propriedades das sondas fluorescentes empregadas, além de uma abordagem teórica sobre os equipamentos e as técnicas experimentais utilizadas, para que sejam mais bem entendidos os resultados trazidos no Capítulo 4.

2.1 Membranas Modelo

2.1.1 Composição, Estrutura e Formação

Há quase um século, diferentes tipos de agregados lipídicos têm sido alvo de estudos por facilitar o entendimento da estrutura básica e dos aspectos dinâmicos de membranas biológicas [3]. As vesículas, um dos principais tipos de agregados lipídicos estudados, possuem estruturas esféricas de filme muito fino de moléculas de lipídios, com diâmetros compreendidos entre nanômetros a alguns micrômetros, e são basicamente formadas de fosfolipídios naturais ou sintéticos devido à abundância deste grupo lipídico nas membranas biológicas [1].

Os fosfolipídios, moléculas derivadas do glicerol ou da esfingosina, possuem cabeça polar e duas longas cadeias de hidrocarbonetos, que constituem a sua cauda hidrofóbica. As cabeças polares podem ser carregadas negativamente (fosfolipídios aniônicos), positivamente (fosfolipídios catiônicos) ou possuir o balanço total de cargas nulo (fosfolipídios zwitteriônicos). Além da diferença no balanço de cargas da cabeça, o fosfolipídio pode apresentar diferenças na estrutura da cauda hidrofóbica, tanto na quantidade de átomo de carbono das cadeias acílicas, como na ausência ou presença de uma ou mais duplas ligações [30]. A Figura 2.1 ilustra a estrutura da fosfatidilcolina (PC), um dos principais tipos de lipídios encontrados nas membranas.

Figura 2.1: Ilustração da molécula Fosfatidilcolina (PC). Adaptado de: [1].

A principal diferença encontrada entre os fosfolipídios e outras moléculas anfipáticas, como os detergentes (que formam estruturas micelares acima da concentração micelar crítica – CMC), está no formato geométrico, que depende da área ocupada pela cabeça polar (a_0) e do volume (v) ocupado pelo tamanho efetivo da cadeia hidrofóbica (l_c) [31].

Para moléculas que se associam em micelas esféricas, suas cabeças polares ocupam-se em áreas suficientemente grandes e suas cadeias em volume suficientemente menores, de modo que o formato geométrico de suas estruturas é representado por um cone. Para as moléculas fosfolipídicas, que se associam formando vesículas, esta relação entre a ocupação das cabeças polares e das cadeias hidrofóbicas é relativamente a mesma, de modo que o formato geométrico que representa basicamente suas estruturas moleculares é a forma cilíndrica. Outras representações geométricas, como ilustrado pela Figura 2.2, podem ser relatadas dependendo quão maior ou menor são os valores de a_0 , l_c , e v .

Lípido	$v/aolc$	Forma de empacotamento	Estruturas formadas
Lípidios de cadeias únicas (surfactantes) com grande área da cabeça polar e baixa força iônica	$< 1/3$	cone	micelas esféricas
Lípidios de cadeias únicas com pequena área de cabeça polar SDS e CTAB em alta força iônica, lípidios não-iônicos.	$1/3-1/2$	cone truncado	micelas cilíndricas
Lípidios de cadeias duplas com grande área de cabeça polar, cadeias fluidas: fosfatidil colina (lecitina) fosfatidil serina fosfatidil glicerol fosfatidil inositol ácido fosfatídico esfingomielina dihexadecil fosfato cloreto dialquil dimetil amônio	$1/2-1$	cone truncado	bicamadas flexíveis vesículas
Lípidios de cadeias duplas com pequena área de cabeça polar, lípidios iônicos em alta força iônica, cadeias rígidas saturadas: Fosfatidil etalonamina, fosfatidil serina + Ca^{2+}	~ 1	cilindro	bicamadas planares
Lípidios de cadeias duplas com pequena área de cabeça polar, lípidios não-iônicos, cadeias poli-insaturadas (cis), alta T. fosfatidil etalonamina insaturada cardiolipina + Ca^{2+} ácido fosfatídico + Ca^{2+} colesterol, DMDG ^b	> 1	cone truncado invertido	micelas invertidas

Figura 2.2: Tipos de agregados anfifílicos dependentes do formato geométrico representativo para diferentes lípidios e surfactantes. Adaptado de: [31].

A formação espontânea de estruturas membranares por diversos parâmetros físico-químicos foi relatada pela primeira vez pelo pesquisador Alec Bangham, após a dispersão de fosfolípidios num meio aquoso [32]. Esta dispersão dá origem à formação de vesículas multilamelares (MLVs), onde bicamadas esféricas concêntricas estão subdivididas por um espaço aquoso em diferentes tamanhos compreendidos entre 0,4 e 3,5 μm , de forma a minimizar a energia livre do sistema [33]. A principal ocorrência da agregação é proteger as cadeias acíclicas dos fosfolípidios das moléculas de água, principalmente por efeitos hidrofóbicos.

A obtenção da suspensão de MLVs, num processo mais atual, ocorre por hidratação de um filme lipídico originado da evaporação da solução de lípidios num determinado solvente orgânico, geralmente efetuada em tubo de ensaio ou balão de

fundo arredondado (Figura 2.3). O processo de obtenção das MLVs pode sofrer influências que dependem do solvente orgânico evaporado, da forma como este solvente é secado e dos parâmetros de agitação dos recipientes em que a suspensão é obtida pela adição do solvente, como o tempo, a intensidade e principalmente a temperatura de agitação [34].

Figura 2.3: Preparação de vesículas multilamelares (MLVs) por hidratação. Fonte [35].

Devido à inconveniência da utilização de vesículas multilamelares como forma de mimetização de membranas modelo e de encapsulação de compostos polares para estudos de “*drug delivery*”, foi necessário efetuar processamentos nas suspensões obtidas de MLVs para formação de estruturas unilamelares [33], sendo os métodos mais difundidos para esta formação: (i) sonicação, para a formação de vesículas com diâmetros próximos de 30 a 50 nm, denominadas SUVs (do inglês *Small Unilamellar Vesicles*); (ii) extrusão por membranas de policarbonato, para a formação de vesículas com diâmetros próximos de 50 a 500 nm, denominadas LUVs (do inglês, *Large Unilamellar Vesicles*) e (iii) eletroformação, para a formação de vesículas com diâmetros acima de 1 μm , denominadas GUVs (do inglês *Giant Unilamellar Vesicles*) [36].

O método da sonicação caracteriza-se por uma elevada transferência de energia para a suspensão lipídica, podendo efetuar-se através da utilização de uma ponta de titânio (para suspensões muito concentradas) ou de um banho com desintegrador ultrassônico (no caso de maiores volumes de amostra). Devido às elevadas temperaturas utilizadas e às trocas gasosas associadas com a ponta de titânio, existe um risco

considerável de degradação dos lipídios e contaminação da suspensão com o titânio, o que não ocorre na obtenção de SUVs com o banho. No entanto, dado que ocorre dispersão de energia por uma área maior quanto utilizamos o banho, torna-se impossível a obtenção de vesículas tão pequenas como as obtidas com a ponta de titânio [37].

A extrusão, método utilizado para obtenção de LUVs, baseia-se na passagem da suspensão lipídica contendo MLVs num filtro de membrana de policarbonato ou celulose, cujo diâmetro dos poros é bem definido. As extrusões devem ser realizadas a temperaturas acima da temperatura de transição de fase dos lipídios constituintes da suspensão, além de ser necessário também que sejam executadas diversas passagens pelo filtro para que os tamanhos de vesículas unilamelares obtidas tenham tamanhos mais bem definidos, além de garantir que o sistema esteja uniforme [38]. A Figura 2.4 ilustra a obtenção de SUVs e LUVs.

Figura 2.4: Representação da obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs), por sonicação e extrusão das vesículas multilamelares (MLVs), respectivamente. Fonte: [39].

O método da eletroformação foi descrito primeiramente pela pesquisadora Miglena Angelova [40] utilizando-se um eletroformador (Figura 2.5), que consiste em um sistema de placas de vidro condutoras. Através da formação de um filme lipídico em uma das placas, a suspensão lipídica é formada injetando-se solução aquosa no

espaçamento interno entre as placas, onde, por uma diferença de potencial aplicada, são obtidas as vesículas denominadas GUVs.

Figura 2.5: Esquema do dispositivo eletroformador para obtenção de vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Adaptado de: [22].

2.1.2 Transição de Fase

As bicamadas lipídicas podem apresentar-se em duas fases termodinâmicas distintas, caracterizada pela transição de um estado de grande ordenação das cadeias hidrofóbicas para um estado de maior fluidez destas caudas, numa determinada temperatura de transição (T_C). Quando a temperatura do sistema é inferior à temperatura de transição, as cadeias laterais dos lipídios assumem conformações estendidas e altamente ordenadas (*all trans*), onde a liberdade de movimento é muito restrita. Já para temperaturas acima da temperatura de transição, as caudas apolares não apresentam ordem lateral (*trans-gauche*) devido à sua grande mobilidade, e a área da superfície ocupada por cada uma das cabeças polares na bicamada torna-se maior. Deste modo, os lipídios podem apresentar duas fases distintas denominadas fase gel e fase líquido-cristalina, como ilustrado na Figura 2.6. A transição entre essas duas fases numa

determinada temperatura é altamente cooperativa, apresentando um pico bem pronunciado e estreito na capacidade térmica (C_p). Esta definição será abordada na seção 2.4.

Figura 2.6: Figura esquemática das fases termodinâmicas das bicamadas lipídicas. Fonte: [41].

A temperatura de transição depende da natureza do grupo da cabeça polar e do comprimento e grau de insaturação das cadeias de ácido graxo. Em geral, ela aumenta com o comprimento das cadeias e diminui com o grau de insaturação. Em condições fisiológicas (alta força iônica ~ 300 mM) os valores de T_C para lipídios puros podem encontrar-se numa largura estreita, em intervalos de até $\pm 0,5^\circ\text{C}$, enquanto que para um sistema de diferentes composições lipídicas, o intervalo pode abranger valores de $\pm 10^\circ\text{C}$. Além disso, para certos fosfolipídios tais como a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol ou o ácido fosfatídico, a presença de íons ou alterações no pH do sistema podem influenciar consideravelmente os valores de T_C [42-46].

A fase em que se encontram as bicamadas lipídicas é extremamente importante, uma vez que influencia marcadamente a estabilidade do comportamento das vesículas no meio biológico. Todavia, o comportamento termodinâmico de uma bicamada pode ser alterado quando se incorporam moléculas não fosfolipídicas na membrana, como o colesterol, que é conhecido como um modulador da fluidez por possuir grande parte da sua molécula intercalada entre as cadeias dos fosfolipídios, reduzindo-se consideravelmente a permeabilidade das bicamadas fosfolipídicas que se apresentam fluidas à temperatura ambiente.

2.2 Sondas Fluorescentes

2.2.1 1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)

A sonda fluorescente DPH é muito utilizada em estudos de estrutura e dinâmica de sistemas micro-heterogêneos como as membranas modelo. Sua afinidade por ambientes hidrofóbicos permite a sua interação por ligações não-covalentes com as cadeias de ácido graxo das bicamadas fosfolipídicas, tanto na fase gel como na fase líquido-cristalina. As principais razões que levaram o DPH a ser uma das sondas fluorescentes mais utilizadas para monitorar o comportamento de estruturas biomiméticas devem-se (i) ao seu caráter fotofísico, pois possui alto valor de coeficiente de absorção molar e alto valor de rendimento quântico de fluorescência em regiões hidrofóbicas e também (ii) à sua alta estabilidade fotoquímica [17].

O DPH possui uma estrutura alongada em forma de uma elipsóide como mostrado na Figura 2.7, onde os seus momentos de dipolo de absorção e de emissão se encontram ao longo do eixo principal, z. O seu tempo de vida de fluorescência é dependente da polaridade do meio circundante e, devido à sonda encontrar-se inserida totalmente na região hidrofóbica das bicamadas lipídicas, alterações na polaridade do sistema pela penetração de moléculas de água podem ser verificadas por medidas de fluorescência [47]. Além do mais, quando o DPH inserido nas vesículas é excitado por luz pulsada no comprimento de onda de sua banda de absorção, a emissão polarizada dependente do tempo reflete no movimento molecular das cadeias alifáticas que o circundam [28].

Figura 2.7: Formato da molécula 1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno. Fonte: [48].

Uma diferença importante entre o DPH e outras sondas comumente estudadas no monitoramento das bicamadas lipídicas é que estas podem ser ancoradas na interface formada pelas cabeças polares dos fosfolipídios, enquanto o DPH por sua total hidrofobicidade pode mover-se restritamente dependente das cadeias alifáticas. Embora seja comum assumir que moléculas de DPH são intercaladas entre as cadeias fosfolipídicas das membranas, alguns estudos indicam que há uma fração substancial da sonda paralelamente à superfície da membrana, em meio às monocamadas [47].

2.2.2 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD)

O fluoróforo NBD, assim como o DPH, tem sido largamente utilizado nos estudos de monitoramento de sistemas biomiméticos como as bicamadas lipídicas. Vários fosfolipídios e colesterol têm sido sintetizados com o grupo NBD, podendo estar ligado tanto na cabeça polar quanto nas cadeias alifáticas dos lipídios. Estes lipídios são utilizados como análogos fluorescentes de lipídios constituintes de membranas modelo, tanto para o estudo de diversos processos induzidos pela interação de drogas ou peptídeos com as bicamadas lipídicas como também para o estudo de processos espontâneos, como transição de fase, fusão de membranas, atividades de transporte lipídico em células vivas e difusão lateral dos lipídios [10, 11].

A molécula NBD possui importantes características espectroscópicas que a classifica como excelente fluoróforo no estudo de membranas modelo, principalmente pela grande diferença entre a fraca emissão de fluorescência em soluções aquosas e alta em ambientes hidrofóbicos e solventes orgânicos [9]. Ainda não está bem elucidado o comportamento da molécula ligada nas diferentes posições dos fosfolipídios inseridos nas membranas lipídicas [49], principalmente na fase gel, porém entende-se que o grupo NBD tem preferência pela região da interface da membrana, tanto na situação em que se encontra ligado aos carbonos de uma das cadeias de ácido graxo da região hidrofóbica, como o C6-NBD-PC e o C12-NBD-PC, como ligado à cabeça polar do fosfolipídio, como o NBD-PE [10]. Abaixo estão representadas diferentes localizações do NBD nas moléculas fosfolipídicas.

Figura 2.8: Estrutura química da molécula NBD e de três análogos fluorescentes lipídicos ligados a este fluoróforo em diferentes posições. Fonte: [49]

2.2.3 2-amino-N-hexadecil-benzamida (Ahba)

A molécula Ahba, Figura 2.9, é formada pela ligação covalente do fluoróforo ácido *orto*-aminobenzóico a uma cadeia alifática de 16 carbonos (hexadecila) através de um grupo carbonila. Esta sonda tem a vantagem de apresentar um grupo fluorescente de tamanho reduzido em relação às outras sondas de membranas já conhecidas, como o DPH e o NBD aqui citados. Este fato torna-se benéfico principalmente quando se pretende estudar a dinâmica de estruturas micro-heterogêneas, como as membranas modelo, uma vez que a sonda afeta minimamente a estrutura da bicamada e os resultados obtidos a partir das medidas de fluorescência utilizando estas sondas são unicamente dependentes de processos naturais das bicamadas lipídicas ou da sua interação com fármacos e peptídeos.

Figura 2.9: Estrutura química da molécula Ahba. Fonte [19].

O Ahba, por apresentar mudanças espectroscópicas em diferentes tipos de sistemas, mostra-se dependente da polaridade do meio e de sua conformação, que pode ser modificada através da formação de agregados em diferentes tipos de solventes. A sonda possui afinidade por solventes orgânicos e por sistemas anfipáticos como as bicamadas lipídicas, estando preferencialmente em sua forma monomérica [19]. Já em água, o Ahba possui baixa solubilidade, agregando-se por interações não-covalentes.

2.3 Espectroscopia de UV-Vis

2.3.1 Espectroscopia de Absorção Óptica

A incidência de radiação eletromagnética numa determinada molécula pode resultar em dois processos: ela pode ser espalhada, onde sua direção de propagação é modificada ou ela pode ser absorvida, onde há transferência de energia da radiação para a molécula. No processo de absorção da radiação, a energia a ser absorvida deve estar relacionada com a frequência (ν) desta radiação, através da relação

$$\Delta E = h\nu \quad (2.1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s).

Num dado estado, a energia potencial (num modelo diatômico simples) dependerá da distância entre os núcleos dos átomos. Em cada estado eletrônico da molécula, há um conjunto de níveis de energia vibracional e rotacional permitidos, como representado pela Figura 2.10.

Figura 2.10: Níveis de energia de uma molécula diatômica simples.

As transições que envolvem apenas os níveis rotacionais estão relacionadas com a faixa de micro-ondas, enquanto que as transições que envolvem somente níveis vibracionais estão relacionadas com o espectro do infravermelho. As transições eletrônicas abrangem o espectro UV-Visível e constituem o fundamento do estudo das técnicas espectroscópicas de absorção óptica e fluorescência [50].

Em consequência da ocorrência desta transição eletrônica, a densidade de elétrons aumenta em determinadas regiões da molécula diminuindo em outras. Os núcleos inicialmente em equilíbrio estacionário sofrem a ação de um novo campo de forças, respondendo a esse campo entrando em vibrações e oscilando. Pelo princípio de Franck-Condon, uma transição eletrônica ocorre com rapidez muito maior do que os núcleos podem responder em virtude destes serem muito mais massivos que os elétrons. Assim, as transições eletrônicas mais prováveis são aquelas cuja separação entre os núcleos seja a separação de equilíbrio. Elas são originadas do centro do nível eletrônico fundamental para o nível de estado eletrônico excitado, verticalmente acima do fundamental, como mostrado nas curvas de potencial (Figura 2.10) [51].

A probabilidade de absorção de luz pela molécula num dado comprimento de onda é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar ($\epsilon(\lambda)$). A molécula pode ser excitada em muitos níveis de rotação-vibração do primeiro estado eletrônico excitado, resultando num espectro de absorção com muitas bandas espectrais bastante próximas, sendo que, na prática, essas bandas são observadas por um envelope espectral relativamente suavizado.

A Figura 2.11 ilustra uma medida de absorção de luz por uma amostra, onde I_0 é a radiação incidente de intensidade no comprimento de onda λ que, ao ser refratada, percorre o interior da amostra com caminho óptico (l). A luz que não é absorvida pela amostra emerge com intensidade (I).

Figura 2.11: Representação da absorção de luz por uma amostra, em função da distância percorrida pela luz no caminho óptico. Fonte [52].

No caso da amostra conter apenas um tipo de cromóforo com concentração molar C , podemos relacionar estas intensidades I e I_0 por

$$I = I_0 10^{-\epsilon l C} \quad (2.2)$$

ou

$$-\log(I / I_0) = \epsilon l C \quad (2.3)$$

A relação $-\log(I/I_0)$ é chamada de absorbância, representada por A . Substituindo este termo na expressão acima, a igualdade pode ser escrita por

$$A = \epsilon l C \quad (2.4)$$

Estas relações são conhecidas como *Lei de Lambert-Beer*, sendo a forma mais usual a descrita pela Equação 2.4. Valores mais precisos da absorbância são obtidos no intervalo de 0,1 a 2, pois valores menores significam que somente uma fração muito pequena da luz foi absorvida, e valores maiores mostram que somente uma pequena fração da luz emergente atinge o detector.

O aparelho utilizado para a realização das medidas de absorção óptica é o espectrofotômetro. Este aparelho consiste de uma fonte emissora de luz branca e através de um monocromador são selecionados comprimentos de onda definidos. O feixe de determinado comprimento de onda incide sobre uma amostra e um sensor (fotomultiplicadora, fotodiodo, etc) registra a intensidade de luz que atravessa na amostra.

2.3.2 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é a técnica que resulta no espectro da radiação emitida por um átomo ou molécula quando esta relaxa do estado excitado para o estado fundamental. A molécula quando excitada pode sofrer colisões com as moléculas do meio circundante e ceder energia de forma não-radiativa, passando do nível vibracional de mais alta energia para o nível de vibração de mais baixa energia do estado eletrônico excitado da molécula. Se a energia de relaxação que leva a molécula do nível mais baixo de energia do estado excitado até o estado eletrônico fundamental não for cedida às moléculas vizinhas, a molécula excitada pode sofrer emissão espontânea no tempo característico de 10^{-9} s, emitindo o excesso de energia na forma de radiação.

O decaimento radiativo deve-se à emissão de um fóton pela molécula para perder a energia antes ganhada como forma de absorção. O processo de decaimento não-radiativo é mais comum, onde a perda de energia é transferida principalmente para vibrações e rotações de moléculas vizinhas, ou seja, a energia é transformada no

movimento térmico do ambiente, na forma de calor. Os processos não-radiativos (*nr*) que competem com a fluorescência incluem a conversão interna (*CI*), cruzamento inter-sistemas (*CIS*) e outros tipos de supressões.

A radiação espontaneamente emitida pode ocorrer tanto pelo processo de fluorescência, onde esta radiação é interrompida no instante em que se cessa a radiação incidente, como também pelo processo de fosforescência, que ocorre após o cruzamento inter-sistemas, onde a emissão espontânea persiste durante intervalos de tempos longos após a excitação. A Figura 2.12 ilustra o diagrama de Jablonski com principais tipos de processos radiativos e não-radiativos após a absorção de luz.

Figura 2.12: Diagrama de Perrin-Jablonski representando os processos de excitação eletrônica e emissão característica de processos radiativos e não-radiativos.

Devido à perda de energia de excitação por processos não-radiativos até atingir o nível mais baixo de energia do estado excitado, a fluorescência ocorre em frequências mais baixas do que a radiação de excitação. Assim, o espectro de emissão sempre está deslocado para maiores comprimentos de onda em relação ao espectro de absorção. A diferença entre os comprimentos de onda de emissão e de excitação é chamada de *deslocamento de Stokes*.

O estudo da fluorescência pode ser realizado tanto por um equipamento que mede a emissão por excitação contínua de intensidade de luz ou por pulso de luz extremamente curto, podendo ser obtidos parâmetros fluorescentes como os espectros de emissão, espectros de excitação, rendimento quântico, tempo de vida e anisotropia.

A espectroscopia de fluorescência por excitação contínua, ou do estado estacionário, necessita de um espectrofluorímetro para que sejam realizadas as medidas. Este equipamento possui uma fonte de luz contínua que produz um amplo espectro de energia. O feixe produzido pela fonte atinge o monocromador de excitação que transmite luz seletivamente em um estreito intervalo centrado e comprimento de onda específico. A luz transmitida passa através de fendas ajustáveis que controlam sua magnitude e resolução por limitá-la. Quando “filtrada”, esta luz passa pelo centro da amostra excitando as moléculas, que emitem um feixe referente à emissão da fluorescência, que atinge o monocromador posicionado num ângulo de 90° do caminho de luz de excitação para que seja eliminado qualquer tipo de luz espalhada, ou seja, a luz que não foi absorvida. A luz emitida após passar por fendas ajustáveis atinge o tubo fotomultiplicador, onde o sinal é amplificado e é criada uma voltagem proporcional à intensidade emitida. O diagrama esquemático pode ser visualizado pela Figura 2.13.

Figura 2.13: Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro. Fonte: [53].

Na fluorescência excitada com pulso de luz, ou resolvida no tempo, a largura do pulso é muito curta, preferencialmente muito menor que o tempo de decaimento (τ) da amostra. A intensidade em função do tempo é medida após o pulso de excitação e o tempo de decaimento característico (τ) é calculado pela inclinação de uma dependência linear do logaritmo da intensidade pelo tempo.

Quando uma amostra contendo uma molécula que pode emitir fluorescência (fluoróforo) é excitada com um pulso de luz infinitamente curto, ela possui uma população inicial (N_0) no estado excitado. A taxa de decaimento desta população inicialmente excitada é:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_{fl} + k_{CI} + k_{CIS})N(t) \quad (2.5)$$

onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas em um tempo t após a excitação, k_{fl} é a taxa de emissão da fluorescência, k_{CI} e k_{CIS} são as taxas de decaimento não-radiativos

(k_{nr}) de conversão interna e cruzamento inter-sistema. Sendo $N(t) = N_0$ em $t = 0$, integramos a relação (2.5):

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \quad (2.6)$$

onde $\tau = (k_{fl} + k_{nr})^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado.

Esperamos que a intensidade de fluorescência $F(t)$ seja proporcional à população do estado excitado

$$F(t) = k_{fl} N(t) \quad (2.7)$$

O tempo de vida da fluorescência é o tempo necessário para que a intensidade decaia para $1/e$ de seu valor inicial, que é $(k_{fl} + k_{nr})^{-1}$. Alternativamente, o tempo de vida pode ser determinado da curva $\log F(t)$ versus t .

O tempo de vida também pode ser considerado o valor médio de tempo que um fluoróforo permanece no estado excitado. Essa média é dada por:

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i t_i N(t)}{\sum_i N_i(t)} \quad (2.8)$$

Para um elevado número de fluoróforo e pequenos intervalos de tempo, podemos considerar a equação 2.8 como:

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^\infty t N(t) dt}{\int_0^\infty N(t) dt} = \frac{\int_0^\infty t e^{-t/\tau} dt}{\int_0^\infty e^{-t/\tau} dt} \quad (2.9)$$

o denominador é igual a τ , e integrando por partes a expressão 2.9, encontramos o numerador como sendo τ^2 . Portanto, para um decaimento exponencial, o tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado é igual ao tempo de vida

$$\langle t \rangle = \tau \quad (2.10)$$

Muitas amostras podem conter apenas um tipo de molécula fluorescente, porém podem apresentar decaimentos bem mais complexos que uma exponencial simples, como por exemplo, se estiverem em diferentes espécies, sendo que uma espécie pode estar exposta à água e a outra blindada. Nos casos em que isso ocorre, é importante notar que a equação 2.10 não é verdadeira, pois o ajuste dos decaimentos é dado por uma soma de exponenciais associada a cada um desses estados, do tipo

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (2.11)$$

onde τ_i representa os tempos de decaimento e α_i a amplitude das componentes no tempo $t=0$.

Cada valor (τ_i) representaria então uma espécie individual, e a intensidade fracional f_i de cada uma destas espécies é dada por

$$f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_i a_i \tau_i} \quad (2.12)$$

Uma das técnicas utilizadas para obtenção do decaimento da intensidade de fluorescência baseia-se no método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (*Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC), esquematizada na Figura 2.14. Neste método, a amostra é excitada por um pulso de luz e fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. A essência desse método é o conversor tempo-amplitude (TAC), que pode ser considerado um análogo de um cronômetro de tempos muito curtos.

Figura 2.14: Diagrama esquemático para medida de fluorescência temporal pelo método TCSPC. Fonte: [53].

A amostra é repetidamente excitada usando uma fonte de pulso de luz de um *laser*. Cada pulso é opticamente monitorado por uma fotomultiplicadora, para produzir um sinal de partida usado como gatilho na rampa de voltagem do TAC. Esta rampa é interrompida quando o primeiro fóton fluorescente proveniente da amostra é detectado. O TAC fornece um pulso de saída cuja amplitude é proporcional ao tempo entre os sinais de partida e de interrupção. Um analisador multicanal (MCA) converte essa voltagem para um canal de tempo usando um conversor analógico (ADC). O MCA constrói um histograma de probabilidades de contagens em função dos canais de tempo somados sobre vários pulsos. O experimento geralmente transcorre até atingir um pico de 10.000 contagens do canal. Não deve haver mais que um fóton detectado em 100 pulsos do *laser*.

O decaimento da fluorescência por TCSPC é afetada pela largura finita do pulso de excitação e pela eletrônica de detecção, originando a função de resposta do

instrumento (IRF). Essa função, também conhecida como perfil da lâmpada, pode ser obtida experimentalmente utilizando uma solução espalhadora, como a água. O decaimento obtido experimentalmente é uma convolução do perfil da lâmpada e o decaimento real da fluorescência, que pode ser obtido por procedimento de desconvolução.

Uma característica importante do perfil do decaimento da fluorescência é sua apresentação em escala logarítmica, que pode indicar se o decaimento é mono ou multiexponencial. Um decaimento monoexponencial, que possui apenas um tempo de vida, é representado por uma reta na escala logarítmica, o que não acontece quando há dois ou mais tempos de vida na amostra.

2.3.2.1 Rendimento Quântico de Fluorescência (ϕ_F)

O rendimento quântico de fluorescência é definido como sendo a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, em uma determinada amostra. Seja k_f a taxa de emissão fluorescente de um dado fluoróforo e k_{nr} sua taxa de decaimento por processos não-radiativos. Podemos definir a fração que representa a desexcitação por fluorescência como:

$$\phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad (2.13)$$

O tempo de vida do fluoróforo é o inverso da taxa de emissão fluorescente, escrito por:

$$\tau_n = \frac{1}{k_f} \quad (2.14)$$

onde τ_n é o chamado tempo de vida natural ou intrínseco, referente ao tempo de decaimento na ausência de processos de decaimento não-radiativos. O tempo de vida é então o inverso de todas as taxas, resultando em:

$$\tau = \tau_n \phi_f \quad (2.15)$$

2.3.2.2 Anisotropia de Fluorescência

Muitas amostras, ao serem excitadas por uma luz polarizada, apresentam a emissão de luz também polarizada. O grau de polarização desta emissão é descrito em termos da anisotropia (r). A origem de tais fenômenos deve-se à existência de momentos de absorção e de emissão posicionados em direções específicas da estrutura do fluoróforo quando excitado. Em uma solução homogênea, fluoróforos no estado fundamental se encontram todos orientados aleatoriamente. Quando expostos à luz polarizada, são excitados aqueles que possuem componentes dos momentos de transição orientados na mesma direção do vetor elétrico da luz incidente, de modo que a população no estado excitado não é aleatoriamente orientada. A despolarização da emissão pode ser causada por vários fenômenos dependentes do tipo de amostra investigada. A causa mais comum é a difusão rotacional, e medidas de anisotropia revelam o deslocamento angular médio que ocorre entre a absorção e consequente emissão de um fóton. Tais movimentos de rotação, por sua vez, dependem da viscosidade do solvente, da dimensão da molécula e do sistema em que ela está inserida. Assim uma variação na viscosidade do solvente tende a alterar a anisotropia de fluorescência. Para pequenas moléculas em soluções de baixa viscosidade, a taxa de difusão rotacional é tipicamente mais rápida do que a taxa de emissão. Sob tais condições, a emissão é despolarizada e a anisotropia é próxima de zero.

Figura 2.15: Esquema de medida de fluorescência polarizada. Adaptado de: [53].

A Figura 2.15 mostra um esquema de como podem ser obtidas medidas de anisotropia do estado estacionário. A amostra é excitada com luz verticalmente polarizada, onde o vetor elétrico da luz excitada é orientado paralelamente à direção do eixo z. No caminho óptico de emissão da luz são adicionados polarizadores ora orientado verticalmente ora paralelamente à direção da excitação polarizada. A intensidade de emissão que passa pelo polarizador orientado paralelamente é representada por $I_{||}$ e a que passa pelo polarizador orientado perpendicularmente é representada por $I_{\perp}$. Estes valores são utilizados para o cálculo da anisotropia:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.16)$$

A anisotropia é uma quantidade adimensional que independe da intensidade total da amostra, pois a diferença do numerador é normalizada pela intensidade total, dada pelo denominador.

Podemos ainda referir as medidas de fluorescência com polarizadores cruzados pelo termo polarização, que é dado por

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \quad (2.17)$$

Algumas publicações ainda trazem este termo ao invés de anisotropia. Embora não haja nada de errado com a noção de polarização, o seu uso é desencorajado, pois as expressões numéricas trazidas em termos dos parâmetros de anisotropia são mais simples quando expressas. Como exemplo pode-se considerar uma mistura de fluoróforos, cada um com polarização P_i e intensidade de fluorescência fracional f_i . A polarização desta mistura (P) é dada por:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right)^{-1} = \sum_i \frac{f_i}{\left(\frac{1}{P_i} - \frac{1}{3}\right)} \quad (2.18)$$

enquanto a anisotropia média é dada por

$$\bar{r}(t) = \sum_i f_i r_i \quad (2.19)$$

onde r_i indica as anisotropias de cada espécie individual.

Consideremos o caso em que determinado fluoróforo não apresente difusão rotacional e tenha seu momento de dipolo de absorção paralelo ao seu momento de dipolo de emissão. Vamos assumir também que o ângulo entre estes momentos de dipolo e os eixos z e y da Figura 2.15, sejam θ e φ , respectivamente. Nesse caso, devido à intensidade de emissão de um dipolo ser proporcional ao seu vetor projetado no eixo de observação e sabendo-se que a intensidade que passa através de um polarizador é proporcional ao quadrado desta projeção em seu eixo, observamos que as intensidades

que são observadas nos polarizadores orientados paralelamente e perpendicularmente à luz polarizada são:

$$I_{//}(\theta, \varphi) = \cos^2 \theta \quad (2.20)$$

e

$$I_{\perp}(\theta, \varphi) = \sin^2 \theta \sin^2 \varphi \quad (2.21)$$

Ainda levemos em conta que a solução contém muitos fluoróforos com distribuição aleatória. A anisotropia é calculada pela realização de uma média com base no princípio da fotoseleção e quanto que cada fluoróforo contribui em cada intensidade projetada. Podemos eliminar a dependência de φ na equação 2.21, pois a população de fluoróforos excitados será simetricamente distribuída ao longo do eixo z . Então, integrando-se fazendo uma média na coleção de fluoróforos excitados relativamente orientado ao eixo- z e utilizando a equação 2.16, a anisotropia também pode ser dada como

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (2.22)$$

Porém, não é possível obter uma população no estado excitado perfeitamente orientada a partir da excitação óptica de soluções homogêneas e raramente os momentos de absorção e emissão são paralelos. Então, devemos considerar que a média de $\cos^2 \theta$ da equação 2.22 depende da excitação fotosselativa dos fluoróforos e de um ângulo β entre os momentos de transição. A existência deste ângulo implica em uma perda da anisotropia. Ao observarmos o valor anisotrópico em uma solução “congelada” (ou seja, quando é possível que os momentos de dipolo estejam paralelamente orientados), verificamos que o valor máximo encontrado não é 1, como deveria ser para este caso, mas sim é reduzido por um fator de 0.4 devido à fotoseleção.

Então, o valor da anisotropia fundamental para um fluoróforo é dado por

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (2.23)$$

O termo r_0 refere-se à anisotropia observada na ausência de outros processos de despolarização, tais como a difusão rotacional ou transferência de energia. Para algumas moléculas, β é próximo de zero. Por exemplo, para o DPH já foram obtidos valores de r_0 iguais a 0.39, o que corresponde a $\beta = 7,4^\circ$ [54]. Para $r_0 = 0.4$, temos $\beta = 0^\circ$. É interessante notar que a anisotropia fundamental é zero quando $\beta = 54,7^\circ$. Acima desse valor de β , os valores de anisotropia tornam-se negativos e o valor máximo para anisotropia negativa (- 0,20) é encontrado para $\beta = 90^\circ$. Para muitos fluoróforos, o valor da anisotropia com os momentos de dipolo de absorção e emissão colineares (r_0) ainda são menores que 0.4 por um deslocamento angular dos dipolos.

Mudanças na anisotropia fundamental podem ocorrer em função do comprimento de onda de excitação. Isso pode ser interpretado em termos de uma rotação do momento de dipolo de absorção ou, mais precisamente, pode estar havendo a contribuição de duas ou mais transições eletrônicas, cada uma com diferentes valores de β . Com a mudança do comprimento de onda de excitação, a fração de luz absorvida em cada transição também mudará.

Nas medidas de anisotropia obtidas pelo método do Formato-L, ou canal único, como representado pela Figura 2.15, é considerado a sensibilidade da fotomultiplicadora, que é dependente das direções dos polarizadores adicionados. Esta sensibilidade pode ser corrigida pela razão das medidas da luz de excitação verticalmente e horizontalmente polarizadas, conhecida com Fator-G, descrita por

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2.24)$$

Figura 2.16: Esquema de medida de anisotropia com a adição de polarizadores perpendicularmente e paralelamente orientados.

Na Figura 2.16, V corresponde aos polarizadores orientados na vertical e H na horizontal. VV e HH correspondem à excitação e emissão polarizadas paralelamente, enquanto que VH e HV correspondem à excitação e emissão polarizadas perpendicularmente. Ao final, o valor de anisotropia calculado com a correção pelo Fator-G torna-se

$$R = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.25)$$

Diversos fenômenos podem diminuir os valores de anisotropia em relação àqueles máximos valores teóricos calculados a partir da equação 2.23. A causa mais comum é a difusão rotacional que ocorre durante o tempo de vida do estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo. Medidas desse parâmetro nos dão informações a respeito da mudança angular relativa dos momentos do fluoróforo entre os tempos de absorção e emissão. Os efeitos da difusão rotacional podem ser diminuídos se o fluoróforo estiver ligado a uma macromolécula, como as membranas modelo e, nesse caso, teríamos um aumento no valor anisotrópico.

Os primeiros estudos de anisotropia foram realizados por Gregorio Weber como forma de analisar o tempo de correlação rotacional de moléculas de proteínas, utilizando medidas de polarização estática. Era esperado que estes valores anisotrópicos em função da temperatura fornecessem parâmetros como forma, tamanho e flexibilidade destas moléculas, porém notou-se que estas medidas não eram tão simples de serem interpretadas, pois o tempo de correlação rotacional precisava ser medido. Passado alguns anos, Jablonski apontou que medidas da fluorescência polarizada era uma função do decaimento da anisotropia de fluorescência, que poderia revelar informações sobre o movimento Browniano rotacional dos fluoróforos baseado na teoria de despolarização de Perrin. Estas medidas foram realizadas por um fluorímetro de fase para determinar o tempo de correlação rotacional de uma dada molécula, num dado solvente e numa certa temperatura [55].

Estas mesmas medidas podem ser obtidas por um fluorímetro temporal baseada na técnica de TCSPC, excitando um fluoróforo com um pulso de luz polarizada. O decaimento da anisotropia é determinado pela medida do decaimento da fluorescência das componentes de emissão polarizadas verticalmente $I_{\parallel}(t)$ e horizontalmente $I_{\perp}(t)$. Se os momentos de transição da absorção e emissão são colineares, então a anisotropia no instante $t = 0$ é 0,4. Nesse caso, a intensidade inicial da componente paralela é maior que a componente perpendicular. O decaimento resultante da diferença entre $I_{\parallel}(t)$ e $I_{\perp}(t)$, quando normalizado corretamente pela intensidade total, é o decaimento da anisotropia, dado por

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (2.26)$$

O decaimento da anisotropia é então analisado para determinar qual modelo será o mais consistente com os dados. Para uma molécula esférica, por exemplo, o decaimento da anisotropia é uma monoexponencial, apresentando um único tempo de correlação rotacional (ϕ). No entanto, devido a diversos fatores, podemos observar decaimentos multiexponenciais para a anisotropia. Por exemplo, no caso de moléculas com geometria elipsoidal, os tempos de correlação rotacional são determinados pelas taxas de rotação em torno dos vários eixos da molécula.

Baseado na equação de Perrin, como descrito por Jablonski, para um rotor esférico pode-se relacionar o decaimento da anisotropia com a difusão rotacional como descrito pela equação 2.27,

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\phi} = 1 + 6D\tau \quad (2.27)$$

onde τ é o tempo de vida de fluorescência, ϕ o tempo de correlação rotacional, r é a anisotropia medida e D o coeficiente de difusão rotacional. Se o tempo de correlação rotacional for muito maior do que o tempo de vida ($\phi \gg \tau$), então a anisotropia medida é igual à anisotropia fundamental r_0 . Se o tempo de correlação rotacional for menor muito menor do que o tempo de vida ($\phi \ll \tau$), então a anisotropia é nula.

Dentro dessas considerações, podemos descrever o decaimento da anisotropia através de uma função monoexponencial:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\phi} = r_0 e^{-6D\tau} \quad (2.28)$$

Nessa equação, o tempo de correlação rotacional do fluoróforo pode ser escrito como:

$$\phi = \frac{\eta V_{Hid}}{KT} \quad (2.29)$$

onde η é a viscosidade da solução em que a molécula encontra-se inserida, T a temperatura (K) e V_{Hid} representa o volume hidrodinâmico da molécula que está rotacionando.

No caso de macromoléculas, os decaimentos são em geral descritos por multiexponenciais.

Se uma molécula não é esférica, podem-se imaginar diferentes tempos de correlação rotacional, atribuídos às rotações em torno dos diferentes eixos dessa molécula. Suponha que tal molécula tenha a forma de um disco plano. Espera-se então

que as rotações no plano sejam mais rápidas que as rotações fora do plano, pois estas requerem um deslocamento maior das moléculas do solvente. Uma molécula desse tipo é chamada de rotor anisotrópico. A teoria para a difusão rotacional de rotores anisotrópicos é bastante complexa e há controvérsias sobre como estabelecer as leis de decaimento para essas moléculas. Todavia, é esperado que a anisotropia apresente um decaimento complexo, descrito por uma soma de exponenciais, como:

$$r(t) = \sum_i r_{0i} e^{-t/\phi_i} \quad (2.30)$$

expandindo-se a somatória:

$$r(t) = r_{\infty} + r_{0_1} e^{-t/\phi_1} + r_{0_2} e^{-t/\phi_2} + \dots \quad (2.31)$$

r_{∞} é a anisotropia limite alcançada no equilíbrio, observadas em tempos muito maiores que o tempo de vida.

O tratamento do decaimento da anisotropia, dependendo do meio em que o fluoróforo está inserido, pode não só depender da teoria de difusão rotacional descrita por Perrin. Um exemplo é para as sondas incorporadas em membranas modelo. Nesta situação, o meio em que a sonda se encontra não é homogêneo, podendo então estar restrita numa certa região particular. Kinoshita propôs um modelo de que a sonda pode rotacionar livremente num cone [56], que possui seu eixo em torno da normal da membrana. Neste modelo, o tempo de correlação rotacional obtido pelo decaimento da anisotropia corresponde ao tempo de relaxação que a sonda necessita para aproximar-se da distribuição de equilíbrio anisotrópico, dependente da abertura do cone. Estas dependências podem ser relacionadas de acordo com a equação 2.32:

$$\frac{r_{\infty}}{r_0} = \left[\frac{1}{2} \cos \theta_c (1 + \cos \theta_c) \right]^2 \quad (2.32)$$

onde θ_c é o ângulo de abertura do cone.

2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica bastante utilizada no estudo da variação energética dependente da conformação de biopolímeros, quando estes são submetidos a uma variação de temperatura controlada. Com isso, torna-se possível a determinação de dados termodinâmicos absolutos para transições termicamente induzidas. O DSC tem sido aplicado nos estudos de muitos sistemas, inclusive na caracterização conformacional dos lipídios em membranas modelo no momento da transição de fase.

No equipamento, uma amostra e uma referência são aquecidas ou resfriadas a uma taxa constante pré-determinada (dT/dt). A diferença entre o fluxo de calor da cela da amostra e da cela de referência é medida, calibrada em unidade de potência. Com o intuito de verificar se a interação de moléculas como as sondas fluorescentes afetam as propriedades termodinâmicas das membranas, suspensões lipídicas puras ou com as sondas são usadas na cela da amostra e uma solução tampão, a qual foi preparada a suspensão, é posta na cela de referência.

Quando a amostra se encontra longe do evento térmico, as temperaturas de ambas as celas mudam linearmente com o tempo à mesma taxa dT/dt , e a diferença entre elas permanece zero. Na prática, isto se reflete numa linha de base horizontal e reta. No momento em que a amostra sofre uma transição de fase termotrópica, há uma diferença detectável de temperatura entre as celas da amostra e de referência, fazendo com que o calorímetro modifique ativamente a entrada de fluxo de calor para a cela da amostra anulando este diferencial de temperatura. Esta diferença de fluxo de calor para ambas as celas se reflete numa deflexão positiva ou negativa da linha de base original, dependendo se o evento é endotérmico ou exotérmico. Terminada a transição de fase, a condição de linha de base original é restabelecida ou uma nova linha de base se estabelece se houver mudança na capacidade térmica da amostra.

Como resposta da técnica, há a medida da razão entre a quantidade de calor fornecida a um sistema fechado à pressão constante, e a consequente variação na temperatura. Na teoria, esta é a própria definição de Capacidade Térmica (C_p).

$$C_p = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{\Delta Q}{\Delta T} \bigg|_{p,V} \quad (2.33)$$

Considerando uma suspensão homogênea de bicamadas lipídicas, as mudanças conformacionais dos lipídios nas diferentes fases, como mostrado pela Figura 2.2, difere muito nos valores de entropia do sistema. Pela termodinâmica, sabemos que $\Delta Q = T\Delta S$, então, a equação 2.33 pode ser escrita como

$$C_p = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} T \frac{\Delta S}{\Delta T} \bigg|_{p,V} = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right) \bigg|_{p,N} \quad (2.34)$$

Por isso a brusca diferença de entropia dada por uma transição ordem/desordem pode ser evidenciada como um pico na capacidade calorífica.

De acordo com a Primeira Lei da Termodinâmica,

$$dU = dQ + dW \quad (2.35)$$

onde dW corresponde ao trabalho fornecido ao sistema. Também podemos escrever

$$dU = TdS - pdV \quad (2.36)$$

e através de uma transformada de Legendre para a energia $U(S, V, N)$, podemos obter o potencial termodinâmico conhecido por Entalpia

$$H(S, p, N) = U + pV \quad (2.37)$$

portanto

$$dH = dU + Vdp \quad (2.38)$$

Substituindo a equação 2.36 na equação 2.38, obtemos

$$dH = TdS + Vdp \quad (2.39)$$

Como as medidas são realizadas a pressão constante, a relação final é descrita como

$$dH = TdS \quad (2.40)$$

Substituindo a equação 2.40 na equação 2.34, podemos escrever a equação final da Capacidade Calorífica como

$$C_p = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} T \frac{\Delta S}{\Delta T} \Big|_{p,V} = \left(\frac{\partial H}{\partial S} \right) \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right) \Big|_{p,N} = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right) \Big|_{p,N} \quad (2.41)$$

Então, a integral sob a curva de C_p , em função da temperatura, corresponde à entalpia envolvida na transição de fase, como representado pela Figura 2.17.

Figura 2.17: Representação esquemática de uma endoterma caracterizando um evento térmico. Adaptado de: [57].

2.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz mede a radiação espalhada em comprimentos de onda ligeiramente diferentes daqueles do feixe incidente em um ângulo determinado. Moléculas em movimento alteram o comprimento de onda de radiação devido ao efeito *Doppler*. Se não há um movimento líquido resultante, as flutuações no número de moléculas espalhadoras resultam em uma distribuição de comprimentos de onda da luz espalhada. A distribuição é bastante estreita, e uma fonte de luz extremamente monocromática é necessária.

Partículas com diâmetros de 1 a 5000 nm, dependendo da amostra e da potência do laser disponível, podem ser medidas utilizando um método de espectroscopia de correlação de fótons (PCS, do inglês Photon Correlation Spectroscopy). Uma das características das partículas em solução é que elas estão em constante movimento Browniano devido à agitação térmica do sistema. Este movimento provoca um padrão de *speckle* de movimento na intensidade de luz espalhada pelas partículas. Ainda, ele pode ser detectado como uma variação na intensidade com o tempo a partir de uma óptica e uma fotomultilicadora adequada. Partículas grandes se movem mais lentamente que as partículas pequenas, portanto a taxa de flutuação da luz espalhada por elas é também mais lenta, como mostrado na Figura 2.18. A espectroscopia de correlação de fótons utiliza a taxa de variação dessas flutuações para determinar a distribuição de tamanhos das partículas espalhadoras de luz [51].

Figura 2.18: Representação de medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz por PCS em uma amostra de partículas grandes e outra de partículas pequenas. A intensidade de luz espalhada é medida em função do tempo.

Os canais do correlacionador multiplicam as intensidades da luz separadas por um tempo de atraso. Para menores tempos de atraso, os quais são pequenos quando comparados às flutuações, o produto das intensidades é grande, ou seja, o grau de correlação é alto. Para canais com tempos de correlação longos, quando não há correlação entre as intensidades, o produto das intensidades é muito pequeno, o que resulta em uma função de correlação que decai exponencialmente. A Figura 2.19 representa a obtenção da curva de intensidade.

Figura 2.19: Intensidade de luz espalhada e a obtenção da função de auto-correlação de intensidade espalhada em função do tempo, em unidades arbitrárias. Adaptado de: [58]

A análise da função de auto-correlação obtida permite o cálculo do coeficiente de difusão translacional das partículas (D_0) que estão em movimento Browniano, livre de interações com relação aos demais centros (regime de diluição infinita). O tamanho da partícula pode então ser calculado a partir deste coeficiente, da temperatura e da viscosidade do meio pela equação de Stokes-Einstein,

$$D_0 = \frac{K_B T}{3\pi\eta d_{ef}} \quad (2.42)$$

onde K_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura (K), η é a viscosidade do solvente e d_{ef} o diâmetro hidrodinâmico das partículas.

3. METODOLOGIA

Neste capítulo estão descritos os materiais que foram utilizados nas medidas, as condições experimentais e também uma abordagem técnica dos equipamentos utilizados.

3.1 Materiais

O fosfolípido zwitteriônico 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), Figura 3.1, que foi utilizado na formação das membranas modelo, bem como as sondas fluorescentes C6-NBD-PC, C12-NBD-PC E NBD-PE, foram fornecidos pela Avanti Polar Lipids. A sonda fluorescente DPH foi fornecida pela Sigma-Aldrich. O Ahba foi sintetizado no laboratório do grupo de Biofísica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Juliano e da Dra. Isaura Y. Hirata. O tampão Hepes 10 mM, pH 7,4 e o solvente etanol são de qualidade analítica.

Figura 3.1: Estrutura molecular do fosfolípido DPPC.

3.2 Condições Experimentais e Preparação das Soluções Estoque

Controlamos durante todo o desenvolvimento do trabalho a temperatura desejada das amostras com o auxílio de um termopar, com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$, aquecendo ou resfriando-as pela mudança da temperatura no banho térmico. Para todos os experimentos, exceto para o DSC, utilizamos cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Soluções estoque das sondas fluorescentes foram preparadas medindo-se as suas massas em uma balança analítica de precisão e solubilizando-as em etanol, a fim de que a solução estoque final estivesse na ordem de 1 mM, mantendo-as sob refrigeração. Pequenas alíquotas desses estoques (5 μM para DPH e NBD marcado em lipídios e 20

μM para a sonda Ahba) foram dissolvidas em clorofórmio na presença de lipídios, em tubos de ensaio, para a preparação das suspensões lipídicas marcadas.

3.3 Preparação das Vesículas Fosfolipídicas de DPPC

As vesículas do tipo LUV utilizadas no trabalho foram obtidas pelo método da extrusão [34], por um sistema automatizado de passagem da suspensão lipídica pela membrana de polycarbonato de poros de $0.1\ \mu\text{m}$, inseridas no extrusor *Mini-Extruder Avanti*, como mostrado na Figura 3.2.

Figura 3.2: Sistema automatizado de Extrusão para obtenção de vesículas unilamelares grandes (LUVs).

Para a preparação da suspensão lipídica, filmes finos de fosfolipídios na composição e concentração desejadas são obtidos dissolvendo-os em clorofórmio em tubos de vidro de fundo arredondado, seguido da adição de alíquotas da suspensão estoque das sondas fluorescentes e de evaporação do solvente sob fluxo de N_2 . O filme resultante, totalmente seco sob vácuo durante no mínimo de três horas, é então hidratado pela adição de solução tampão em temperatura acima da temperatura de

transição (T_c), controlada por um termopar durante todo o processo da extrusão. A suspensão obtida é então colocada em uma seringa que posteriormente é injetada em um dos lados do mini-extrusor. No outro extremo é colocada uma seringa vazia, para que receba a suspensão após a passagem pelo filtro. A pressão exercida nas seringas pelo sistema de extrusão automatizada faz com que a suspensão passe por onze vezes pela membrana de poros de $0.1\ \mu\text{m}$ para que ela esteja uniforme. A última extrusão deve preencher a segunda seringa, para reduzir a contaminação com as partículas maiores da filtração inicial. A seringa é removida e a suspensão extrusada é logo transferida para a cubeta.

3.4 Medidas de Espectroscopia de Absorção

As medidas realizadas em um espectrofotômetro envolvem uma fonte que emite luz em diversos comprimentos de onda e um monocromador que a seleciona e a transmite em um comprimento de onda específico. Uma fração da luz monocromática atravessa a cubeta de caminho óptico de 1 cm que não é absorvida pela amostra. A outra fração que é absorvida depende da concentração dos cromóforos na amostra e, de acordo com a equação 2.4, podemos obter a absorção referente à amostra inserida no espectrofotômetro. O equipamento utilizado para estas medidas é o espectrômetro *Amersham Ultrospec 2100 pro*, mostrado na Figura 3.3, que está disponível em nosso laboratório de Fotobiofísica, no Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) na Universidade de São Paulo. O equipamento permite medidas em intervalos de comprimento de onda de 190 nm a 900 nm, com largura de banda de 3 nm e intervalos de absorbância de -3,0 a 3,0.

Figura 3.3: Espectrômetro *Ultrospec 2100 pro*.

3.5 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência do Estado Estacionário

Como descrito na seção 2.3.2, o espectrofluorímetro fundamentalmente baseia-se na obtenção de um espectro de emissão produzido por uma fonte de luz após atingir uma amostra que contém fluoróforos. As fendas contidas no interior do equipamento foram ajustadas com abertura de 5 nm, controlando a magnitude e a resolução, limitando a luz transmitida. A temperatura da amostra foi controlada por um banho com água circulante, que passa através do porta-amostra termostatizado.

Estas medidas foram realizadas no espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* (Figura 3.4), que possui uma lâmpada de xenônio de 150 W como fonte de luz de excitação, podendo varrer o intervalo de comprimento de onda de excitação e emissão de 200 nm a 750 nm. Este equipamento, assim como o espectrofotômetro, está disposto em nosso grupo de Fotobiofísica.

Para medidas de anisotropia do estado estacionário, adicionamos filmes polarizadores nos feixes de excitação e de emissão.

Figura 3.4: Espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*.

3.6 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo

Para medidas com resolução temporal, o laboratório possui um sistema baseado no método de correção temporal de fótons únicos (TCSPC), em que a fonte de excitação é um *laser* pulsado *Tsunami 3950* (*Spectra Physics*) de titânio-safira (*Ti:sapphire*) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*), mostrado na Figura 3.5.

Figura 3.5: Lasers (a) *Millenia* e (b) *Tsunami*, utilizados como fonte de excitação nos experimentos de fluorescência com resolução temporal.

O laser de estado sólido tem uma saída com potência máxima de 10W, no comprimento de onda de 532 nm. É bombeado por diodo *FCbarTM*. O meio de ganho é o Nd:YVO₄. O cristal dobrador é de triborato de lítio (LBO), com tecnologia QMAD.

A frequência dos pulsos gerados no *Tsunami* foi ajustada por um *Pulse Picker 3986 (Spectra Physics)*. A saída do laser é dada entre 850 e 930 nm. O comprimento de onda pode ser escolhido com o auxílio de geradores harmônicos, com o *Flexibe Harmonic Generator (FHG)* da *Spectra Physics*, que podem dobrar ou triplicar a frequência. O pulso de excitação é direcionado por auxílio de espelhos para o espectrômetro *Edinburgh FL900* com configuração em formato-L. O comprimento de onda de emissão é selecionado por um monocromador e os fótons emitidos são detectados por uma fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu C4878* e correlacionados temporalmente com os pulsos de excitação por meio do TAC. A largura à meia altura da função de resposta do instrumento é tipicamente 0,2 a 0,5 ns. As medidas foram feitas com uma resolução temporal de 24 ps por canal. O *software F900* fornecido pela *Edinburgh Instruments* foi utilizado para análise dos perfis de decaimento obtidos. A

inspeção do ajuste dado pelo *software* foi feita pela observação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico χ^2 (*chi-square*) reduzido.

Para as medidas dos perfis de decaimento da anisotropia foi utilizado um compensador *Babinet-Soleil BSC100* da *Halbo Optics* no feixe de excitação e um polarizador *P920* da *Endinburgh Instruments* de prisma *Glan-Tompson* no feixe de emissão.

A temperatura da amostra foi controlada por um banho com água circulante, que passa através de um porta-amostras termostatizado dentro do espectrômetro. Este sistema de medida da fluorescência resolvida no tempo também se encontra instalado em nosso grupo de pesquisa.

3.7 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os estudos de calorimetria foram realizados utilizando um aparelho *N-DSC II: Differential Scanning Calorimeter*, da *Calorimetry Sciences Corporation*. O equipamento encontra-se instalado no Departamento de Química da FFCLRP, no Laboratório de Nanotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas.

A suspensão contendo vesículas a 0,5 mM de DPPC e a referência (tampão) foram inicialmente desaeradas e aplicadas nas celas do calorímetro (~300 μ L de cada). Foi realizada uma varredura de temperatura de no mínimo 10°C a no máximo 55°C, com velocidade de aquecimento de 0,5 °C/min. Esse ciclo foi repetido por pelo menos mais uma vez.

Um gráfico da energia fornecida pelos aquecedores é formado, possibilitando quantificar as transformações, uma vez que a compensação de potência é proporcional à energia envolvida na reação.

3.8 Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para as medidas de tamanho das suspensões de vesículas obtidas pelo método da extrusão, foi utilizado o método de espalhamento dinâmico de luz. O equipamento utilizado, um *Zetasizer 3000 HS_A* da *Malvern Instruments*, possui um *laser* de 10 mW e

lâmpada de HeNe (633 nm), e pertence ao laboratório de Físico-Química de Partículas do Departamento de Química da FFCLRP-USP de Ribeirão Preto. Abaixo é ilustrado um modelo de espalhamento dinâmico com ângulo de 90° .

Figura 3.6: Diagrama esquemático de um equipamento de espalhamento dinâmico de luz de 90° convencional.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados dos experimentos realizados e suas análises, seguidos de uma posterior discussão.

4.1 Caracterização das sondas fluorescentes em meio isotrópico

As sondas fluorescentes utilizadas neste trabalho foram estudadas primeiramente na ausência de membranas lipídicas, solubilizadas em etanol, a fim de caracterizarmos suas propriedades espectroscópicas em meio isotrópico.

4.1.1 DPH

4.1.1.1 Cálculo do coeficiente de absorção molar (ϵ)

Durante todo o desenvolvimento do trabalho, a concentração de DPH inserida nas suspensões lipídicas foi de 5 μM , cuja concentração era verificada através do valor do coeficiente de absorção molar encontrado pela medida de espectros de absorção de alíquotas de uma solução estoque a 1 mM da sonda, como ilustrado na Figura 4.1. Relacionamos através de uma dependência linear cada concentração medida com seu respectivo pico de absorção molar (no caso do DPH o pico foi de 350 nm) e através da lei de Lambert-Beer, podemos verificar que a dependência de $A \times C$ é uma reta que passa pela origem, onde o coeficiente angular desta reta nos fornece o valor do coeficiente de absorção molar. O valor médio obtido através de três experimentos realizados independentemente foi de $\epsilon = (124,7 \pm 0,4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 4.1: à esquerda - Espectros de absorção da molécula DPH em etanol, em sete diferentes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µM; à direita - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda DPH para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ).

4.1.1.2 Medida de anisotropia de fluorescência do estado estacionário

Uma sonda na forma monomérica inserida em um meio isotrópico, com liberdade rotacional, não possui nenhuma orientação preferencial. Assim, a intensidade de emissão quando são inseridos polarizadores orientados paralelamente e perpendicularmente à polarização de excitação deve ser praticamente a mesma, e os resultados de medidas de anisotropia de fluorescência devem estar próximos de zero.

Por medidas de anisotropia de fluorescência do estado estacionário, verificamos que o DPH em etanol tem um comportamento típico de um monômero em meio isotrópico, comprovado pelo baixo valor de anisotropia próximo a 0,001, à temperatura de 25°C. Este valor foi comparado com os valores de anisotropia de fluorescência estática medidos para a sonda em suspensão lipídica, no terceiro tópico deste capítulo.

4.1.1.3 Medidas de fluorescência e anisotropia resolvida no tempo

Através da excitação por *laser* pulsado no comprimento de onda de 355 nm e emissão em 430 nm, foram obtidos experimentalmente perfis de decaimentos da sonda DPH a 5 μM em etanol à temperatura de 25°C, como mostrado pela Figura 4.2. Os decaimentos foram mais bem ajustados por curvas biexponenciais, comprovado pelos valores de χ^2 , como mostrado na Tabela 4.1. De acordo com o ajuste, a contribuição do tempo de vida τ_1 é bem mais significativo no decaimento, de modo que podemos tratar o decaimento praticamente por uma monoexponencial e atribuir o valor encontrado do tempo de vida da sonda DPH à sua forma monomérica. B_1 e B_2 representam os valores pré-exponenciais das componentes τ_1 e τ_2 , respectivamente. Com a adição de polarizadores combinados paralelamente e perpendicularmente no caminho óptico de excitação e emissão do fluorímetro temporal, foram medidos também quatro perfis de decaimentos de fluorescência para posterior obtenção do decaimento da anisotropia (Figura 4.3).

Figura 4.2: Ajuste do perfil de decaimento da fluorescência do DPH a 5 μM em etanol, com pulso de excitação (IRF) em 355 nm e emissão em 430 nm.

Pelo ajuste monoexponencial do perfil do decaimento de anisotropia, foi obtido um rápido tempo de correlação rotacional da sonda (ϕ) durante a permanência no estado excitado e obtido também o valor da anisotropia residual (r_∞), como mostrado na Tabela 4.1.

Figura 4.3: à esquerda - Obtenção dos decaimentos da fluorescência do DPH a 5 μM em etanol, com a adição de polarizadores cruzados (paralelos e perpendiculares) na excitação e emissão da amostra para obtenção do decaimento da anisotropia; à direita - Decaimento da anisotropia do DPH a 5 μM em etanol e seus respectivos resíduos para obtenção de um melhor valor de χ^2 para ajuste da curva.

Tabela 4.1: Parâmetros de ajuste do perfil do decaimento da fluorescência e da anisotropia do DPH a 5 μM em etanol.

Sonda	τ_1 (ns)	B_1	τ_2 (ns)	B_2	ϕ (ns)	r_∞	% ₁
DPH em etanol	$5,36 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,001$	$1,16 \pm 0,06$	$0,032 \pm 0,001$	$0,12 \pm 0,01$	0,03	97

4.1.2 Lipídios marcados com NBD

Devido às diferentes posições as quais o fluoróforo NBD está ligado nos fosfolipídios, os experimentos aqui realizados destes três análogos foram obtidos e comparados a fim de verificar se a ligação do fluoróforo NBD em diferentes regiões dos fosfolipídios altera suas propriedades espectroscópicas observadas em etanol.

4.1.2.1 Cálculo do coeficiente de absorção molar (ϵ)

Assim como para a sonda DPH, controlamos a concentração utilizada durante o trabalho dos três análogos lipídicos através do valor do coeficiente de absorção molar, obtido pelas medidas de espectros de absorção. As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 correspondem ao C6-NBD-PC, C12-NBD-PC e NBD-PE, respectivamente.

Figura 4.4: à esquerda - Espectros de absorção do C6-NBD-PC em etanol, em sete diferentes concentrações: 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 μM ; à direita - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda C6-NBD-PC para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ).

Figura 4.5: à esquerda - Espectros de absorção do C12-NBD-PC em etanol, em sete diferentes concentrações: 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 μM ; à direita - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda C12-NBD-PC para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ).

Figura 4.6: à esquerda - Espectros de absorção do NBD-PE em etanol, em sete diferentes concentrações: 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 μM; à direita - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda NBD-PE para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ).

Os espectros de absorção obtidos correspondem a uma faixa de concentração de 3 μM a 20 μM, e pela relação linear dada pela lei de Lambert-Beer, podemos verificar que através de três experimentos independentes, os valores dos coeficientes de absorção molar médio encontrado para o NBD nas diferentes posições lipídicas tiveram uma pequena diferença, como mostrado na Tabela 4.2, porém estão dentro do intervalo de valores estimados pela literatura para absorção do NBD em lipídios marcados [11].

Tabela 4.2: Valores dos coeficientes de absorção molar das sondas C6-NBD-PC, C12-NBD-PC e NBD-PE em etanol.

Sonda (etanol)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)x10 ³
C6-NBD-PC	18,9±0,4
C12-NBD-PC	21,1±0,6
NBD-PE	23,5±1

4.1.2.2 Medida de anisotropia de fluorescência do estado estacionário

O experimento realizado com a adição de polarizadores cruzados no caminho óptico de excitação e emissão da amostra a 5 μM da sonda NBD ligado nas três diferentes posições lipídicas aqui estudadas, em etanol, indica que a sonda apresenta baixo valor de anisotropia, próximo a 0,02, inferindo que em baixa concentração o fluoróforo possui um movimento de rotação livre de possíveis restrições impostas pelo meio.

4.1.2.3 Medidas de fluorescência e anisotropia resolvida no tempo

Nestes experimentos, através da excitação por *laser* pulsado no comprimento de onda de 470 nm e emissão em 530 nm, foram obtidos os perfis de decaimentos dos diferentes análogos lipídicos marcados com a sonda NBD a 5 μM em etanol à temperatura de 25°C, como mostrado pela Figura 4.7. Os parâmetros extraídos dos decaimentos ajustados por curvas biexponenciais estão mostrados na Tabela 4.3. De acordo com o ajuste, há duas contribuições de tempo de vida, sendo o de maior contribuição o que chamamos de τ_1 , responsável por cerca de 98% da intensidade total nos três decaimentos. A pequena contribuição de τ_2 torna-o praticamente desprezível, levando-nos a considerar que τ_1 seja praticamente o tempo de vida total das sondas com NBD nas três diferentes posições estudadas. Pela Tabela 4.3, verificamos que os valores encontrados de τ_1 são bastante similares nas três situações, inferindo que não há mudança significativa no tempo de vida entre estas sondas em etanol. B_1 e B_2 representam os valores pré-exponenciais das componentes τ_1 e τ_2 das sondas fluorescentes, respectivamente.

Figura 4.7: Perfis de decaimento da fluorescência do NBD ligado em três diferentes posições lipídicas a 5 μM em etanol, com pulso de excitação em 470 nm e emissão em 530 nm.

Além das medidas de tempo de vida, também foram medidos quatro decaimentos de fluorescência, com adição de polarizadores cruzados para a obtenção do perfil de decaimento da anisotropia das três moléculas, como representado pela Figura 4.8 para a sonda C6-NBD-PC. O melhor ajuste para o decaimento foi obtido por uma curva monoexponencial, inferindo um rápido tempo de correlação rotacional para os três análogos fluorescentes marcados com a sonda NBD, como mostrado na Tabela 4.3. Ainda pelo ajuste, foram medidos os valores residuais de anisotropia (r_∞), indicando que não há restrição no movimento rotacional em etanol nestes três casos, confirmando que o fluoróforo encontra-se livre neste solvente.

Figura 4.8: Decaimento da anisotropia da molécula C6-NBD-PC a 5 µM em etanol.

Tabela 4.3: Parâmetros de ajuste do perfil do decaimento da fluorescência e da anisotropia do NBD nas diferentes posições lipídicas a 5 µM, em etanol.

Sonda (etanol)	τ_1 (ns)	B_1	τ_2 (ns)	B_2	ϕ (ns)	r_∞	% ₁
C6-NBD-PC	6,6±0,1	0,105±0,001	2,2±0,5	0,016±0,001	0,29±0,01	0,01	97,2
C12-NBD-PC	6,8±0,2	0,44±0,01	2,1±0,3	0,04±0,001	0,27±0,01	0,02	97,8
NBD-PE	6,9±0,1	0,10±0,001	1,9 ±0,5	0,04±0,001	0,20±0,01	0,01	98

4.1.3 Ahba

4.1.3.1 Cálculo do coeficiente de absorção molar (ϵ)

A sonda Ahba, sintetizada pela ligação de uma longa cadeia hidrocarbônica aminada ligada covalentemente ao grupo carboxila do *o*-Abz [19], foi utilizada durante todo o trabalho à concentração de 20 μM controlada pelo valor do coeficiente de absorção molar, obtido experimentalmente a partir dos espectros de absorção da sonda em etanol, como mostrado na Figura 4.9. O valor do coeficiente de absorção molar encontrado pela média de três experimentos independentes foi de $\epsilon = (2,75 \pm 0,05) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 4.9: à esquerda - Espectros de absorção da sonda Ahba em etanol, em sete diferentes concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM ; à direita - Gráfico da absorbância em função da concentração molar da sonda Ahba para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ).

4.1.3.2 Medida de anisotropia de fluorescência do estado estacionário

Medidas de anisotropia no estado estacionário da sonda Ahba a 20 μM em etanol foram obtidas por adição dos polarizadores cruzados no caminho óptico do feixe, utilizando comprimento de onda de excitação de 330 nm e emissão de 405 nm. A partir destas condições experimentais, o valor de anisotropia obtido foi de 0,006, inferindo um movimento livre da sonda no solvente devido a sua permanência na forma monomérica.

4.1.3.3 Medidas de fluorescência e anisotropia resolvida no tempo

Por medidas de resolução temporal, obtivemos o perfil do decaimento da fluorescência da sonda Ahba a 20 μM em etanol, como mostra a Figura 4.10. A curva biexponencial ajusta bem o decaimento, indicando que a sonda possui dois tempos de vida, sendo um mais longo que contribui com 99% da intensidade total no decaimento, e outro mais curto, que é responsável pelo 1% restante, como mostrado na Tabela 4.4. Devido ao tempo de vida mais curto contribuir muito pouco na intensidade total do decaimento, podemos dizer que o decaimento é praticamente monoexponencial. B_1 e B_2 representam os valores pré-exponenciais das componentes τ_1 e τ_2 das sondas fluorescentes, respectivamente.

Figura 4.10: Perfil de decaimento da fluorescência da sonda Ahba 20 μM em etanol, com pulso de excitação em 330 nm e emissão em 405 nm.

Através do ajuste monoexponencial do perfil de decaimento da anisotropia da sonda Ahba a 20 μM em etanol, como mostra a Figura 4.11, obtivemos um rápido tempo de correlação rotacional e também um valor de anisotropia residual (r_∞) próximo de 0,007, confirmando que a sonda possui movimento livre em etanol devido à sua forma monomérica.

Figura 4.11: Decaimento da anisotropia da sonda Ahba a 20 μ M em etanol.

Tabela 4.4: Parâmetros de ajuste do perfil do decaimento da fluorescência e da anisotropia da sonda Ahba a 20 μ M em etanol.

Sonda Ahba (20 μ M) em etanol	τ_1 (ns)	B_1	τ_2 (ns)	B_2	ϕ (ns)	r_∞	% ₁
	$6,86 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,001$	$1,23 \pm 0,26$	$0,017 \pm 0,001$	$0,20 \pm 0,01$	0,006	99

4.2 Estudo de transição de fase, tamanho e propriedades ópticas por DSC e espalhamento de luz das vesículas de DPPC

4.2.1 Temperatura de transição (T_c) das vesículas de DPPC

Pela técnica de DSC, verificamos a temperatura em que ocorre o processo de transição de fase da bicamada lipídica constituída unicamente por DPPC, analisando-se a variação nos

valores de entalpia que correspondem a mudanças na capacidade calorífica (C_P) dos fosfolípidios, como mostrado na Figura 4.12.

Figura 4.12: C_P (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para suspensão de vesículas de DPPC a 0,5 mM, após subtração da linha de base.

Pela realização de cinco experimentos independentes, os valores médios da temperatura de transição das membranas de DPPC e da variação de entalpia encontrados foram $T_c = (40,82 \pm 0,03) ^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H = (6,9 \pm 0,6) \text{ Kcal/mol}$, respectivamente. Estes valores foram comparados com os resultados obtidos para os experimentos de DSC realizados com a inserção de sondas fluorescentes em suspensões de vesículas de DPPC e serão mostrados mais adiante. Esta comparação foi feita para verificarmos se as sondas em baixa concentração influenciam as propriedades termotrópicas da bicamada.

4.2.2 Tamanho das Vesículas de DPPC

Cubetas contendo vesículas formadas através da extrusão da suspensão obtida pela adição de tampão Hepes 10 mM a pH 7,4 em filme lipídico de DPPC a 0,5 mM, como descrito na seção 3.3, foram medidas por espalhamento dinâmico de luz para obtenção de suas

dimensões, tanto na fase gel (temperatura abaixo da temperatura de transição) como em fase líquido-cristalina (temperatura acima da temperatura de transição). Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 4.13.

Figura 4.13: Distribuição de tamanho das vesículas obtidas por extrusão da suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, calculada pelo método automático do *software*. **À esquerda** – medida a 25°C (abaixo da transição); **à direita** – medida a 50°C (acima da transição).

As duas medidas apresentaram baixo índice de polidispersividade (PDI), sendo que para as medidas abaixo da temperatura de transição dos fosfolipídios de DPPC, foram obtidos dois picos de intensidade de espalhamento. O pico próximo a 127 nm indica que houve formação de vesículas com diâmetro próximo ao valor esperado de 100 nm, enquanto o segundo, que está acima de 1000 nm, pode estar relacionado à intensidade de espalhamento causado pela turbidez da suspensão, consequente da diminuição da área ocupada pela cabeça polar nas bicamadas e à possível formação de aglomerados das vesículas unilamelares [59]. Esta diminuição na área de ocupação das cabeças dos fosfolipídios na interface da membrana faz com que a diferença entre o índice de refração da água e da bicamada lipídica seja grande, reduzindo-se a hidratação na suspensão. De acordo com os resultados obtidos para a suspensão de vesículas acima da temperatura de transição, há apenas um pico de intensidade de espalhamento próximo a 127 nm, confirmando que o tamanho do diâmetro das vesículas

formadas está em torno deste valor. A ausência do segundo pico nestas medidas permite-nos inferir que há mudanças de propriedades ópticas da bicamada nas duas fases distintas.

4.3 Monitoramento das propriedades estruturais e dinâmicas de vesículas de DPPC por sondas fluorescentes

Neste tópico abordaremos um estudo detalhado das propriedades das bicamadas lipídicas de DPPC, realizado pelo monitoramento de sondas fluorescentes que são inseridas em suspensões aquosas de vesículas fosfolipídicas e que podem marcar tanto a região da interface quanto diversas posições das cadeias de ácido graxo das membranas. Os resultados que serão mostrados são procedentes da interação, com bicamadas lipídicas de DPPC, de três tipos de sondas fluorescentes cujas propriedades em meio isotrópico já foram abordadas anteriormente: (i) DPH; (ii) NBD e (iii) Ahba, sendo que o NBD encontra-se ligado em três diferentes posições (carbono 6 e 12 de uma das cadeias de ácido graxo do lipídio PC e cabeça polar do lipídio PE).

4.3.1 Interação da sonda DPH com vesículas de DPPC

4.3.1.1 Estudo de transição de fase, tamanho e propriedades ópticas por DSC e espalhamento dinâmico de luz

Estas medidas foram realizadas para verificar se a inserção de 5 μM da sonda fluorescente DPH afeta a formação das bicamadas lipídicas de DPPC, alterando suas propriedades termodinâmicas, ópticas e seu empacotamento. Pela Figura 4.14, encontramos o valor da temperatura de transição (T_C) das vesículas de DPPC dentro do intervalo da temperatura de transição na ausência da sonda, e o valor da variação de entalpia (ΔH) igual a 5,56 Kcal/mol, indicando que há uma pequena alteração somente neste último valor. Esta ligeira diminuição na variação da entalpia pode estar associada ao caráter hidrofóbico da sonda, que tem afinidade pela região das cadeias de ácido graxo das vesículas [47]. Os valores estão mostrados na Tabela 4.5.

Figura 4.14: C_p (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença da sonda DPH a 5 μM incorporada às vesículas, após subtração da linha de base.

Tabela 4.5: Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença de 5 μM da sonda DPH incorporada às vesículas.

DPPC (0,5 mM)	T_C ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (Kcal/mol)
Puro	$40,82 \pm 0,03$	$6,9 \pm 0,6$
DPH (5 μM)	40,8	5,6

Realizamos também medidas de DLS a fim de verificar o diâmetro médio das vesículas formadas e possíveis diferenças entre as propriedades ópticas nas diferentes fases das bicamadas lipídicas de DPPC. A Figura 4.15 mostra que para medidas realizadas abaixo da temperatura de transição ainda há turbidez na suspensão, comprovado pelo largo pico da intensidade total de luz espalhada. Na fase líquido-cristalina, onde há maior fluidez dos

fosfolipídios na membrana, a intensidade total de luz espalhada está centrada no valor do diâmetro médio encontrado para a vesícula na ausência do DPH, indicando que as formações das vesículas nestes dois experimentos obtiveram tamanhos aproximados. Em ambas as medidas, foram obtidos baixos valores de PDI.

Figura 4.15: Distribuição de tamanho das vesículas obtidas por extrusão da suspensão lipídica de DPPC 0,5 mM com DPH a 5 μ M incorporado às vesículas, calculada pelo método automático do *software*. À esquerda – medida a 25°C (abaixo da transição); à direita – medida a 50°C (acima da transição).

4.3.1.2 Medidas de fluorescência e anisotropia do estado estacionário

Foram obtidos espectros de intensidade de fluorescência para a sonda DPH a 5 μ M incorporado à suspensão de vesículas fosfolipídicas de DPPC a 0,5 mM em várias temperaturas, tanto acima como abaixo da temperatura de transição, utilizando polarizadores de excitação a 0° e de emissão inclinado no ângulo mágico, a 54,7°, mostrados na Figura 4.16.

Figura 4.16: Espectros de fluorescência da sonda DPH a 5 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, com excitação e emissão polarizada, obtidas em temperaturas compreendidas entre 25°C e 46°C.

Observamos que há um ligeiro deslocamento do pico de máxima emissão para o vermelho ($\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$), partindo de 430 nm na fase gel para 432 nm na fase fluida, além da diminuição na intensidade de fluorescência na transição de fase do DPPC. Este deslocamento espectral indica aumento na polaridade onde o DPH está localizado [28]. A mudança na polaridade acontece devido à penetração de moléculas de água da suspensão na vesícula fosfolipídica, que se torna possível devido à desordem dos fosfolipídios promovida por maior agitação térmica na fase fluida [49].

Por medidas de anisotropia estática, podemos verificar a dependência do movimento rotacional do DPH a 5 μM com a microviscosidade do meio em que ele é inserido, como mostrado na Figura 4.17.

Figura 4.17: Anisotropia estática em função da temperatura para o DPH a 5 μM incorporado às vesículas de DPPC a 0,5 mM.

Pela figura, verificamos uma acentuada queda nos valores de anisotropia em torno de 41°C, indicando uma grande diferença no comportamento rotacional do DPH em ambas as fases das vesículas de DPPC. Os valores refletem os diferentes comportamentos das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios tanto acima como abaixo da temperatura de transição, indicando que na fase líquido-cristalina há uma maior desordem no empacotamento lipídico, levando aos baixos valores de anisotropia encontrados, mais próximos ao valor de anisotropia medido para o fluoróforo em etanol. Com isso, podemos inferir que a temperatura de transição das membranas pode ser monitorada também por estudos de anisotropia de fluorescência, mostrando boa concordância entre o valor aqui estimado e o obtido pelas medidas de calorimetria.

4.3.1.3 Medidas de Fluorescência e Anisotropia resolvida no tempo

Foram obtidos os perfis de decaimento da fluorescência da sonda DPH a 5 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM com a adição de polarizadores do caminho óptico de excitação e de emissão, para a obtenção dos valores de tempo de vida da sonda e perfis de decaimento da anisotropia nas diferentes fases das membranas lipídicas, como mostrado pela Figura 4.18.

Figura 4.18: Decaimento da fluorescência da sonda DPH a 5 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em 25°C e 50°C, com adição de polarizadores de excitação (0°) e emissão ($54,7^\circ$), com comprimentos de onda de 330 nm e 405 nm, respectivamente.

Os decaimentos medidos foram melhor ajustados por curvas biexponenciais, indicando contribuição de dois tempos de vida da sonda na membrana de DPPC em ambas as fases, como mostrado na Tabela 4.6. Os valores encontrados foram comparados com o resultado obtido para a sonda em etanol.

Tabela 4.6: Parâmetros de ajuste do perfil de decaimento da fluorescência da sonda DPH a 5 μM com suas respectivas contribuições percentuais e χ^2 , em etanol e incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em temperaturas acima e abaixo da transição.

DPH (5 μM)	τ_1	B_1	τ_2	B_2	% ₁	% ₂	χ^2
etanol	5,46 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,001	1,2 $\pm$ 0,1	0,032 $\pm$ 0,001	95,3	4,7	1,18
DPPC (25°C)	10,62 $\pm$ 0,01	0,057 $\pm$ 0,001	1,98 $\pm$ 0,06	0,017 $\pm$ 0,001	94,8	5,2	1,20
DPPC (50°C)	7,87 $\pm$ 0,01	0,055 $\pm$ 0,001	1,2 $\pm$ 0,1	0,017 $\pm$ 0,001	95	5	1,10

Na presença de vesículas de DPPC, como mostrado para medidas de fluorescência no estado estacionário, há uma alteração nos parâmetros obtidos devido à interação da sonda com este tipo de agregado, como também pode ser observado pelo aumento do longo tempo de vida do DPH em ambas as fases das vesículas, que se deve à afinidade da sonda pela região hidrofóbica da bicamada lipídica. Se comparados os resultados obtidos para ambas as fases, observamos que após a passagem da fase gel para a líquido-cristalina há uma considerável diminuição no valor do tempo de vida do DPH, consequência do aumento da penetração de moléculas de água da suspensão na membrana lipídica. A pequena contribuição de τ_2 permite que o tornemos desprezível nos sistemas estudados, caracterizando o decaimento do tempo de vida da sonda DPH em vesículas de DPPC somente pelo longo tempo de vida. Ainda, o valor de τ_2 para ambas as fases, como pode ser observado pela Tabela 4.6, permaneceu próximo ao valor encontrado para a sonda em etanol.

As medidas de tempo de correlação rotacional obtidas por decaimento da anisotropia para a sonda DPH em bicamadas lipídicas confrontaram algumas teorias encontradas para o estudo de polarização de sondas fluorescentes. A equação de Perrin (equação 2.29) nos mostra que o tempo de correlação rotacional é proporcional à microviscosidade do meio, porém, não é apropriado que seja estimada esta dependência quando a difusão rotacional da sonda sofre restrição causada pelo movimento de outras moléculas, como o movimento molecular das cadeias de hidrocarboneto das bicamadas lipídicas [28]. A Figura 4.19 mostra alguns dos perfis de decaimento de anisotropia da sonda a 5 μM , incorporadas às vesículas de DPPC 0,5 mM, tanto em fase gel como na líquido-cristalina.

Figura 4.19: Perfis de decaimento da anisotropia para a sonda DPH a 5 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM: na fase gel (29°C e 37°C) e na fase líquido-cristalina (45°C e 53°C).

Os decaimentos foram melhor ajustados por curvas biexponenciais, comprovado pelo valor reduzido de χ^2 , obtendo-se assim duas contribuições de tempo de correlação rotacional como mostra a Figura 4.20.

Figura 4.20: Tempos de correlação rotacional ϕ_1 e ϕ_2 da sonda DPH a 5 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, na faixa de temperatura de 22°C a 53°C.

Os dois tempos de correlação rotacional encontrados para a sonda nas diferentes temperaturas aqui estudadas possivelmente são atribuídos a duas populações da sonda nas bicamadas lipídicas, uma na direção perpendicular à superfície, entre as cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios de DPPC, e outra população que está localizada no meio das vesículas, entre suas monocamadas, paralela à superfície [47], como mostra a Figura 4.21.

Figura 4.21: Modelo esquemático de representação das localizações da sonda DPH nas bicamadas lipídicas de DPPC.

Os ajustes indicam que a contribuição de ϕ_1 nos decaimentos da anisotropia é cerca de 10 a 30% da contribuição total, para ambas as fases das vesículas de DPPC. Esta pequena fração da sonda intercalada entre as cadeias de hidrocarboneto é resultado da competição entre as interações de moléculas de DPH com as cadeias dos lipídios e sua tendência a acessar regiões de volume excluído por efeito entrópico, como no meio da bicamada lipídica [47]. A nítida diferença dos valores encontrados para os tempos de correlação rotacional ϕ_1 acima e abaixo da transição reflete a relaxação do movimento rotacional da sonda confinada entre as cadeias lipídicas em um modelo de cone em torno da normal da membrana, como mostrado na Figura 4.22. A este movimento foi dado o nome de “*wobbling in a cone*” [56]. O tempo ϕ_1 intensifica com o aumento da abertura do ângulo do cone ($0^\circ < \theta < 90^\circ$) e diminui com o desordenamento das cadeias lipídicas. Abaixo da temperatura de transição das membranas de DPPC as cadeias estão mais ordenadas, restringindo o movimento orientacional do DPH pela diminuição do ângulo do cone. O contrário ocorre para a fase fluida, pois nesta fase há menor ordem das cadeias e, conseqüentemente, o tempo de reorientação do DPH é maior. Outro parâmetro que pode ser obtido para estimar particularidades do movimento rotacional da sonda entre as bicamadas lipídicas é a constante de difusão “*wobbling*” (D_w), porém seu cálculo é complexo e além de dados experimentais, demanda de soluções de modelos matemáticos. Estes cálculos estão sendo obtidos teoricamente pela Profa. Dra. Vera

Bohomoletz Henriques e o aluno de mestrado Jozismar Rodrigues Alves, do grupo de Biofísica do IF-USP de São Paulo, com colaboração experimental de nosso grupo.

Figura 4.22: Sistema esquemático de movimento “*wobbling in a cone*” da sonda DPH restrito pelas cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios nas bicamadas. Fonte: [60].

O valor do ângulo de abertura do cone para os decaimentos de anisotropia obtidos é relacionado com a razão de anisotropia no equilíbrio, como mostra a equação 2.32, onde $r(0)$ é o valor pré-exponencial da curva de decaimento obtida pelo experimento. Na fase gel, abertura máxima do cone calculada é aproximadamente 30° , enquanto que na fase fluida esta abertura é próximo a 60° . A Figura 4.23 mostra os valores calculados das aberturas nas diferentes temperaturas.

Figura 4.23: Ângulo de abertura do “cone wobbling” referente ao movimento da sonda DPH inserida entre as cadeias fosfolipídicas das vesículas de DPPC.

Os parâmetros obtidos pelo ajuste dos dez decaimentos de anisotropia estão mostrados na Tabela 4.7.

Pelos valores encontrados de ϕ_2 , inferimos que as propriedades de movimento rotacional da sonda localizada entre as monocamadas das vesículas estão livre de qualquer restrição imposta pelo movimento das cadeias de hidrocarboneto, não sendo um parâmetro que monitora intimamente as propriedades das bicamadas lipídicas [47].

Tabela 4.7: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do DPH 5 μ M em vesículas de DPPC 0,5 mM.

Temp. (°C)	Fator G	ϕ_1 (ns)	ϕ_2 (ns)	Pré-exp ₁ (r ₁)	Pré-exp ₂ (r ₂)	r _∞	% ₁	% ₂	χ^2
22	1,01	0,11±0,01	5,6±2,4	0,35±0,04	0,020±0,002	0,21	29	71	1,03
25	1,07	0,10±0,01	2,9±0,5	0,32±0,03	0,036±0,003	0,24	22	78	1,04
29	1,09	0,10±0,01	7,8±2,5	0,33±0,03	0,021±0,002	0,24	16	84	1,01
33	1,16	0,10±0,01	4,5±1,0	0,35±0,03	0,027±0,003	0,25	22	78	0,98
37	1,14	0,09±0,01	2,3±0,4	0,38±0,03	0,039±0,004	0,23	27	73	1,06
39	1,13	0,11±0,01	1,6±0,2	0,30±0,03	0,036±0,006	0,25	28	72	0,99
42	1,13	0,21±0,03	1,8±0,1	0,16±0,01	0,17±0,01	0,04	10	90	0,98
45	1,15	0,24±0,04	1,6±0,1	0,16±0,01	0,20±0,01	0,05	11	89	1,04
48	1,14	0,24±0,04	1,5±0,1	0,17±0,01	0,18±0,01	0,04	13	87	0,96
53	1,14	0,24±0,05	1,0±0,1	0,18±0,02	0,20±0,03	0,03	17	83	1,05

4.3.2 Interação das sondas NBD-lipídios com vesículas de DPPC

4.3.2.1 Estudo de transição de fase, tamanho e propriedades ópticas por DSC e espalhamento dinâmico de luz

Diferentemente do DPH, as outras sondas que foram utilizadas neste trabalho não são totalmente hidrofóbicas. Os análogos lipídicos fluorescentes que possuem o fluoróforo NBD ligado em suas estruturas, como o C6-NBD-PC, C12-NBD-PC e o NBD-PE, são inseridos nas vesículas e por apresentarem propriedades estruturais similares aos lipídios de DPPC, possuem a cabeça polar do lipídio na região hidrofílica da bicamada. Esta afinidade da cabeça polar pela superfície funciona como uma âncora, fazendo com que o análogo não possa orientar-se paralelamente à interface da bicamada lipídica, entre as monocamadas interna e externa, como acontece para o DPH. Para verificar as propriedades da membrana através do fluoróforo NBD ligado ao carbono 6 e ao carbono 12 de uma das cadeias de ácido graxo dos lipídios de PC e à cabeça polar do lipídio PE, primeiramente verificamos se após a inserção de

5 μM do análogo fluorescente em suspensões contendo vesículas de DPPC a 0,5 mM houve alguma alteração nas propriedades termodinâmicas, ópticas e no empacotamento das bicamadas. Pela Figura 4.24 verificamos que a temperatura de transição dos fosfolipídios de DPPC manteve-se a mesma, assim como também o valor do ΔH para as três sondas nesta concentração encontra-se dentro do erro estimado para a transição de fase das vesículas formadas na ausência dos fosfolipídios marcados, inferindo que não há alteração no empacotamento lipídico das vesículas neste experimento realizado. Os valores da temperatura de transição e de ΔH são mostrados na Tabela 4.8.

Figura 4.24: C_p (Kcal/mol K) em função da Temperatura (°C) para suspensão lipídica de vesículas de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença de 5 μM das moléculas C6-NBD-PC (**à esquerda**), C12-NBD-PC (**à direita**) e NBD-PE (**abaixo**) incorporadas às vesículas, após subtração da linha de base.

Tabela 4.8: Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para suspensão lipídica de vesículas de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença de 5 μ M da sonda NBD em diferentes posições lipídicas incorporadas às vesículas.

DPPC (0,5 mM)	T_c (°C)	ΔH (Kcal/mol)
Puro	40,82 $\pm$ 0,03	6,7 $\pm$ 0,6
C6-NBD-PC (5 μM)	40,8	6,8
C12-NBD-PC (5 μM)	40,8	6,9
NBD-PE (5 μM)	40,8	7,2

Medidas de espalhamento dinâmico de luz também foram realizadas, a fim de verificarmos o diâmetro médio das vesículas formadas e também as diferenças nas propriedades ópticas das vesículas tanto acima como abaixo da temperatura de transição do DPPC, na ausência e na presença de 5 μ M das sondas NBD-lipídios incorporadas às vesículas. A Figura 4.25 ilustra os resultados obtidos das medidas para a sonda C6-NBD-PC a 5 μ M, indicando que nas duas fases há um pico de espalhamento próximo a 130 nm, porém em diferentes intensidades. Pelo baixo índice de PDI, confirmamos que há formação das vesículas com diâmetro próximo ao esperado. O alargamento do pico da intensidade de luz espalhada na fase gel comprova também a turbidez da suspensão nesta fase, causada possivelmente devido à diferença entre índice de refração da água e o da bicamada lipídica, como mencionado para experimentos anteriores. Estas mesmas medidas foram realizadas para a interação das bicamadas lipídicas de DPPC a 0,5 mM com 5 μ M das sondas C12-NBD-PC e NBD-PE, obtendo-se resultados similares ao mostrado na Figura 4.25.

Figura 4.25: Distribuição de tamanho das vesículas obtidas por extrusão da suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM com 5 μ M de C6-NBD-PC, calculada pelo método automático do *software*. À **esquerda** – medida a 25°C (abaixo da transição); à **direita** – medida a 50°C (acima da transição).

4.3.2.2 Medidas de fluorescência e anisotropia do estado estacionário

Os espectros de intensidade de fluorescência para as sondas em várias temperaturas foram obtidos acima e abaixo da temperatura de transição, utilizando um polarizador de excitação a 0° e o polarizador de emissão inclinado em 54,7°, como mostrado na Figura 4.26.

Figura 4.26: Espectros de fluorescência em diferentes temperaturas da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM, incorporadas às vesículas de DPPC a 0,5 mM. **À esquerda** – C6-NBD-PC; **à direita** – C12-NBD-PC; **abaixo** – NBD-PE. As amostras foram excitadas em 465 nm.

A intensidade de emissão do fluoróforo NBD localizado na cadeia alquila tanto na posição C6 quanto na posição C12, a 5 μM, cresce continuamente até a obtenção da temperatura de transição das vesículas, diferentemente do que ocorre para as medidas quando este fluoróforo encontra-se ligado na cabeça polar. Este fato possivelmente está associado ao aumento do rendimento quântico de fluorescência do NBD inserido na região hidrofóbica (de baixa polaridade) com o aumento da temperatura [10]. Após a passagem da fase gel para a fase fluida, observamos que a intensidade de fluorescência diminui de acordo com o aumento

da temperatura. Nesta fase, as cadeias na região hidrofóbica tornam-se mais flexíveis, possibilitando que o NBD, antes localizado na região hidrofóbica devido à rigidez das cadeias ordenadas, aloque-se próximo à interface da membrana devido à sua afinidade por esta região, possibilitando que ocorram ligações de hidrogênio dos átomos NH e NO₂ da molécula com átomos de O da cabeça polar dos fosfolipídios de DPPC e átomos da molécula de água da suspensão, respectivamente [18, 49]. Isto se torna possível devido ao dobramento na cadeia de ácido graxo do fosfolipídio PC ao qual o NBD está ligado [49], como ilustrado na Figura 4.28. O aumento da penetração das moléculas de água da suspensão na membrana promovida por maior agitação térmica do sistema, de acordo com o aumento da temperatura, resulta na diminuição do rendimento quântico de fluorescência da sonda NBD pelo aumento de ocorrências de processos não-radiativos [10]. Estes dados concordam com os espectros obtidos para o fluoróforo NBD ligado à cabeça polar do lipídio PE, que permanece na interface em ambas as fases e tem seus picos de intensidade de emissão diminuídos de acordo com o aumento da temperatura do sistema (Figura 4.27).

Figura 4.27: Gráfico das intensidades dos picos de emissão das sondas C6-NBD-PC, C12-NBD-PC E NBD-PE a 5 μ M em vesículas de DPPC a 0,5 mM, obtidas na faixa de temperatura de 28 a 54°C.

Figura 4.28: Ilustração das diferentes localizações do fluoróforo NBD ligado na cadeia de ácido graxo em vesículas fosfolipídicas abaixo da temperatura de transição ($T < T_C$) e acima da temperatura de Transição ($T > T_C$). Fonte: [49].

A mudança mais significativa quando comparados os valores de anisotropia estática obtidos em ambas as fases da membrana é para a sonda ligada à cabeça polar do lipídio PE, que pode estar associado ao fato de que o NBD neste lipídio possui uma localização precisa quando incorporado às vesículas de DPPC, tanto na fase gel como na fase líquido-cristalina. Os valores obtidos de anisotropia para esta medida refletem particularmente a ordem/desordem das cadeias alifáticas, o que não pode ser afirmado para as medidas de NBD ligado na cadeia de ácido graxo nas diferentes posições devido ao dobramento induzido por sua afinidade à região da interface [49]. As medidas de anisotropia estática obtidas para estes três análogos lipídicos marcados por NBD a $5 \mu\text{M}$ em bicamadas lipídicas de DPPC a $0,5 \text{ mM}$ estão mostradas na Figura 4.29.

Figura 4.29: Anisotropia estática em função da temperatura para o fluoróforo NBD ligado à cadeia de ácido graxo na posição C6 e C12 e na cabeça polar do lipídio PE a 5 μM , incorporados às vesículas de DPPC a 0,5 mM.

4.3.2.3 Fluorescência e Anisotropia resolvida no tempo

Os perfis de decaimento da fluorescência do NBD ligado nas diferentes posições lipídicas incorporadas às vesículas de DPPC foram obtidos com a adição de polarizadores no caminho óptico de excitação e emissão, para a obtenção dos valores de tempo de vida da sonda e perfis de decaimento da anisotropia, tanto acima como abaixo da temperatura de transição das membranas de DPPC. A Figura 4.30 mostra o perfil do decaimento da fluorescência das sondas C6-NBD-PC, C12-NBD-PC E NBD-PE a 5 μM em temperatura acima e abaixo da transição.

Figura 4.30: Decaimento da fluorescência da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM incorporadas às vesículas de DPPC a 0,5 mM, com adição de polarizadores de excitação (0°) e emissão ($54,7^\circ$). À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. As amostras foram excitadas em 465 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 530 nm.

Os decaimentos medidos foram melhor ajustados por curvas biexponenciais, indicando contribuição de dois tempos de vida do análogo fluorescente nas vesículas de DPPC em ambas as fases, como mostrado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Tempos de vida da sonda NBD em diferentes posições de lipídios a 5 μM , com suas respectivas contribuições percentuais e χ^2 em etanol e incorporada às de vesículas de DPPC a 0,5 mM, em temperaturas acima e abaixo da transição.

Sonda (5 μM)	Meio	Temp. (°C)	τ_1	B_1	τ_2	B_2	% ₁	% ₂	χ^2
C6-NBD-PC	Etanol	25°C	6,6 $\pm$ 0,1	0,105 $\pm$ 0,001	2,2 $\pm$ 0,5	0,016 $\pm$ 0,001	97,2	2,8	1,1
	DPPC	25°C	6,7 $\pm$ 0,02	0,065 $\pm$ 0,001	1,77 $\pm$ 0,03	0,052 $\pm$ 0,001	82,4	17,6	1,1
		50° C	5,00 $\pm$ 0,01	0,096 $\pm$ 0,001	1,32 $\pm$ 0,04	0,029 $\pm$ 0,001	92,52	7,48	1,1
C12-NBD-PC	Etanol	25°C	6,8 $\pm$ 0,2	0,44 $\pm$ 0,01	2,1 $\pm$ 0,3	0,04 $\pm$ 0,001	97,8	2,2	1,2
	DPPC	25°C	6,70 $\pm$ 0,01	0,053 $\pm$ 0,008	1,7 $\pm$ 0,02	0,047 $\pm$ 0,003	77,7	22,3	1,2
		50°C	4,30 $\pm$ 0,01	0,048 $\pm$ 0,003	0,92 $\pm$ 0,04	0,033 $\pm$ 0,002	87	13	1,1
NBD-PE	Etanol	25°C	6,9 $\pm$ 0,1	0,10 $\pm$ 0,001	1,9 $\pm$ 0,5	0,04 $\pm$ 0,001	98	2	1,1
	DPPC	25°C	8,90 $\pm$ 0,03	0,088 $\pm$ 0,001	1,50 $\pm$ 0,04	0,042 $\pm$ 0,001	90,69	9,31	1,3
		50°C	5,90 $\pm$ 0,10	0,079 $\pm$ 0,001	0,96 $\pm$ 0,03	0,046 $\pm$ 0,002	91,27	8,73	1,2

Para ambas as fases das vesículas, há uma pequena contribuição de τ_2 no decaimento, que é um tempo mais curto. Pela contribuição predominante do longo tempo τ_1 , atribuímos que o decaimento é praticamente monoexponencial em todos os casos. Similarmente às análises de tempo de vida do DPH em membranas de DPPC, os tempos de vida τ_1 das três moléculas diferem nas diferentes fases da membrana lipídica devido à penetração das moléculas de água da suspensão na fase fluida da membrana lipídica.

Pela obtenção de quatro perfis de decaimentos de tempo de vida resultantes da combinação de polarizadores cruzados, foram obtidos os decaimentos da anisotropia do NBD nas três diferentes posições lipídicas, mostrados na Figura 4.31.

Figura 4.31: Perfis de Decaimento da anisotropia da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μ M incorporados às vesículas de DPPC a 0,5 mM. À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. As amostras foram excitadas em 465 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 530 nm.

Os valores de anisotropia residual (r_∞) concordam com o esperado pelas medidas de anisotropia estática, fornecendo informações que indicam a distribuição orientacional das sondas no equilíbrio anisotrópico. Devido à mudança na fluidez das cadeias de hidrocarboneto na transição de fase, o movimento rotacional da sonda é mais restrito na fase gel, tendendo a valores residuais de anisotropia maiores do que para a fase fluida, como podemos observar

para o NBD nas diferentes posições. Outra concordância corresponde à variação dos valores de r_∞ nas diferentes fases para as três moléculas, onde a mudança relativa maior é para o NBD-PE, associado ao fato de que não há alteração conformacional da molécula na fase gel ou líquido-cristalina, como ocorre para as outras duas moléculas. Os tempos de correlação rotacional da Figura 4.32 foram obtidos pelo ajuste biexponencial dos perfis de decaimento da anisotropia.

Figura 4.32: Tempos de correlação rotacional ϕ_1 e ϕ_2 da sonda NBD em lipídios marcados a 5 μM incorporados às vesículas de DPPC a 0,5 mM. À esquerda – C6-NBD-PC; à direita – C12-NBD-PC; abaixo – NBD-PE. Os valores obtidos são de medidas de decaimento da anisotropia na faixa de temperatura de 23°C a 52°C.

O curto tempo de correlação rotacional que varia em até 1 ns em ambas as fases das bicamadas lipídicas de DPPC possivelmente está associado ao movimento rotacional do fluoróforo NBD em torno da sua ligação ao lipídio. O tempo mais longo deve-se ao movimento rotacional da molécula como um todo. Embora não seja aplicável a equação de Perrin para estimar a dinâmica rotacional da sonda restrita em membranas, verificamos que o tempo de correlação rotacional ϕ_1 diminui intensamente em torno da temperatura de transição das vesículas de DPPC no experimento realizado com o NBD-PE a 5 μM , confirmando que esta mudança seja particularmente pela diferença no empacotamento lipídico da bicamada em ambas as fases. Diferentemente do que ocorre para o DPH, esta diminuição nos tempos de correlação rotacional pode estar associada à formação da âncora pela cabeça polar da sonda na interface da membrana, que faz com que o movimento rotacional não esteja somente restrito ao movimento “*wobbling in a cone*” causado pelas caudas alifáticas na região hidrofóbica como acontece para sondas com afinidade somente por estas regiões. Os tempos de correlação rotacional ϕ_1 para o NBD ligado tanto na posição C6 quanto na posição C12 não mostram diferenças significantes no monitoramento da transição, fortalecendo o fato de que os valores de anisotropia obtidos podem estar relacionados não somente à diferença de empacotamento lipídico das vesículas, mas também ao dobramento das cadeias devido à afinidade do NBD pela interface da bicamada lipídica. Nas Tabelas 4.10, 4.11 e 4.12 estão mostrados todos os ajustes obtidos para os experimentos realizados de anisotropia resolvida no tempo das sondas C6-NBD-PC, C12-NBD-PC e NBD-PE, respectivamente, em diferentes temperaturas, tanto na fase gel como na fase líquido cristalina das vesículas de DPPC.

Tabela 4.10: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia da sonda C6-NBD-PC 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.

Temp. (°C)	Fator G	ϕ_1 (ns)	ϕ_2 (ns)	Pré-exp ₁ (r ₁)	Pré-exp ₂ (r ₂)	r _∞	% ₁	% ₂	χ^2
24	1,67	4,3±0,3	0,34±0,03	0,080±0,002	0,090±0,004	0,072	91	9	1,03
27	1,63	4,2±0,3	0,35±0,03	0,080±0,002	0,080±0,004	0,057	92	8	1,04
31	1,69	3,2±0,2	0,23±0,02	0,090±0,002	0,14±0,006	0,07	90	10	1,01
37	1,87	3,1±0,1	0,21±0,01	0,13±0,002	0,24±0,01	0,07	89	11	0,99
42	1,64	2,5±0,3	0,75±0,05	0,12±0,005	0,13±0,006	-0,001	84	16	0,99
45	1,78	2,4±0,1	0,40±0,03	0,14±0,006	0,14±0,006	0,035	85	15	0,98
49	1,68	2,1±0,1	0,46±0,05	0,12±0,001	0,11±0,006	0,003	83	17	1,00
52	1,68	1,5±0,1	0,23±0,02	0,17±0,007	0,16±0,006	-0,002	85	15	1,00

Tabela 4.11: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do C12-NBD-PC 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.

Temp. (°C)	Fator G	ϕ_1 (ns)	ϕ_2 (ns)	Pré-exp ₁ (r ₁)	Pré-exp ₂ (r ₂)	r _∞	% ₁	% ₂	χ^2
25	1,68	4,7±0,5	0,44±0,04	0,080±0,003	0,090±0,004	0,085	90	10	0,99
28	1,67	3,0±0,2	0,32±0,03	0,10±0,004	0,090±0,005	0,079	91	9	1,01
32	1,69	5,0±0,5	0,46±0,04	0,080±0,003	0,090±0,004	0,09	91	9	0,94
36	1,66	4,1±0,3	0,45±0,03	0,10±0,003	0,13±0,004	0,052	88	12	1,04
42	1,70	3,6±0,3	0,59±0,05	0,11±0,01	0,13±0,01	0,036	84	16	0,99
45	1,65	2,5±0,2	0,46±0,04	0,13±0,01	0,13±0,01	0,037	85	15	0,98
48	1,69	2,8±0,3	0,50±0,05	0,11±0,01	0,14±0,01	0,038	80	20	1,01
52	1,70	2,9±0,4	0,50±0,04	0,09±0,01	0,16±0,01	0,036	76	24	0,99

Tabela 4.12: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do NBD-PE 5 μM em vesículas de DPPC 0,5 mM.

Temp. (°C)	Fator G	ϕ_1 (ns)	ϕ_2 (ns)	Pré-exp ₁ (r ₁)	Pré-exp ₂ (r ₂)	r _∞	% ₁	% ₂	χ^2
24	1,83	5,8±0,6	0,93±0,12	0,088±0,006	0,082±0,007	0,095	87	13	0,95
27	1,76	4,7±0,3	0,66±0,10	0,11±0,006	0,080±0,006	0,082	91	9	0,96
31	1,78	5,1±0,4	0,71±0,10	0,10±0,01	0,087±0,006	0,07	89	11	1,00
37	1,81	4,8±0,2	0,39±0,05	0,13±0,01	0,090±0,006	0,062	92	8	1,04
42	1,78	2,6±0,2	0,54±0,06	0,13±0,01	0,13±0,01	0,032	83	17	1,01
45	1,77	2,0±0,1	0,40±0,05	0,14±0,01	0,12±0,01	0,015	85	15	1,01
49	1,78	1,8±0,2	0,42±0,06	0,12±0,01	0,12±0,01	-0,002	81	19	1,01
52	1,78	2,0±0,3	0,49±0,06	0,09±0,02	0,16±0,02	0,001	70	30	0,99

4.3.3 Interação da sonda Ahba com vesículas de DPPC

4.3.3.1 Estudo de transição de fase, tamanho e propriedades ópticas por DSC e espalhamento dinâmico de luz

Assim como para as sondas estudadas anteriormente, realizamos experimentos para verificar se a inserção de 20 μM do fluoróforo na formação das vesículas afeta as propriedades termodinâmicas, ópticas e empacotamento das bicamadas. Pela Figura 4.33, verificamos que o pico referente à temperatura de transição dos fosfolipídios de DPPC nas vesículas com a sonda nesta concentração foi de 40,8°C e a variação de entalpia (ΔH) igual a 6,6 Kcal/molK, indicando que 20 μM da sonda Ahba não altera o empacotamento lipídico das membranas fosfolipídicas. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 4.13.

Figura 4.33: C_p (Kcal/mol K) em função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para suspensão lipídica de DPPC a 0,5 mM, na ausência e na presença da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas, após subtração da linha de base.

Tabela 4.13: Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para suspensão lipídica a 0,5 mM de DPPC, na ausência e na presença de 20 μM da sonda Ahba incorporada às vesículas.

DPPC (0,5 mM)	T_c ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (Kcal/mol)
Puro	40,82 $\pm$ 0,03	6,9 $\pm$ 0,6
Ahba (20 μM)	40,8	6,6

Pela Figura 4.34, verificamos que o diâmetro das vesículas formadas foi em média 140 nm, tendo um pico de intensidade total de espalhamento mais bem definido na fase fluida do que em fase gel, como obtido para experimentos anteriores. Esta diferença está associada à mudança nas propriedades ópticas da suspensão de vesículas nas diferentes fases. Para ambas as medidas, foram obtidos baixos índices de PDI.

Figura 4.34: Distribuição de tamanho da suspensão de vesículas de DPPC a 0,5 mM com a sonda fluorescente Ahba a 20 μM incorporada às vesículas, obtida na fase gel a 25°C (à esquerda) e na fase líquido-cristalina a 50°C (à direita), calculada pelo método automático do software.

4.3.3.2 Medidas de fluorescência e anisotropia do estado estacionário

Foram obtidos espectros de intensidade de fluorescência para a sonda Ahba a 20 μM em temperaturas acima e abaixo da temperatura de transição das vesículas de DPPC a 0,5 mM, utilizando um polarizador de excitação a 0° e o polarizador de emissão inclinado em 54,7°, como mostrado na Figura 4.35.

Figura 4.35: Espectros de fluorescência da sonda Ahba 20 μM com excitação em 350 nm, incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, em diferentes temperaturas compreendidas entre 25°C e 46°C.

Pelos espectros, verificamos que há um ligeiro deslocamento do pico de máxima emissão para o vermelho ($\Delta\lambda = 3 \text{ nm}$), partindo de 503 nm na fase gel para 506 nm na fase fluida, além de uma modificação na intensidade de fluorescência de acordo com o aumento da temperatura da amostra. Este deslocamento espectral, como já citado anteriormente, indica aumento na polaridade devido à penetração de moléculas de água da suspensão na membrana lipídica.

Por medidas de anisotropia estática, podemos verificar a restrição do movimento rotacional da sonda Ahba a 20 μM nas vesículas de DPPC a 0,5 mM em ambas as fases, como mostrado na Figura 4.36.

Figura 4.36: Anisotropia estática em função da temperatura da sonda Ahba 20 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM.

Pelas medidas, verificamos uma acentuada queda nos valores de anisotropia em torno da temperatura de transição, como esperado, devido à maior liberdade do movimento rotacional da sonda pela desordem dos fosfolipídios na fase líquido-cristalina das vesículas. Devido ao caráter anfifílico da sonda Ahba, a diferença entre os valores de anisotropia acima e abaixo da transição não difere tanto quanto para sondas que estão restritas somente na região hidrofóbica, como é mostrado pelos experimentos de anisotropia realizados com a sonda DPH, possivelmente devido à âncora formada na interface da membrana pelo anel benzeno do fluoróforo.

4.3.3.3 Medidas de Fluorescência e Anisotropia resolvida no tempo

Perfis de decaimento da fluorescência da sonda Ahba a 20 μ M incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM foram obtidos com a adição de polarizadores do caminho óptico de excitação e emissão. Pelo ajuste biexponencial do decaimento, foram medidos dois tempos de vida da sonda, como mostrado pela Figura 4.37. Estes tempos estão mostrados na Tabela

4.14, onde verificamos um tempo mais longo com maior contribuição (~97%) e um mais curto, tanto na fase gel como na fase líquido-cristalina das vesículas. Os dois tempos originam-se dos dois isômeros gerados pela ligação do ácido aminobenzóico à cadeia hexadecila.

Figura 4.37: Decaimento da fluorescência da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, a 25°C e a 50°C, com adição de polarizadores de excitação (0°) e emissão ($54,7^\circ$). As amostras foram excitadas em 330 nm e os perfis de decaimento foram obtidos em 405 nm.

Tabela 4.14: Tempos de vida da sonda Ahba 20 μM com suas respectivas contribuições percentuais e χ^2 , em etanol e incorporada às vesículas de DPPC a 0.5 mM, em temperaturas acima e abaixo da transição.

Ahba (20 μM)	τ_1	B_1	τ_2	B_2	% ₁	% ₂	χ^2
Etanol	6,86 $\pm$ 0,03	0,141 $\pm$ 0,001	1,23 $\pm$ 0,26	0,017 $\pm$ 0,001	99	1	1,01
DPPC (25°C)	9,34 $\pm$ 0,02	0,080 $\pm$ 0,001	2,0 $\pm$ 0,2	0,053 $\pm$ 0,002	97,42	2,58	1,20
DPPC (50°C)	8,09 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,004	1,5 $\pm$ 0,1	0,025 $\pm$ 0,003	96,43	3,57	1,10

A diferença entre os parâmetros medidos da sonda Ahba ($20\ \mu\text{M}$) em etanol e incorporados às vesículas fosfolipídicas ($0,5\ \text{mM}$ DPPC) reflete na sua interação com estas estruturas, como pode ser observado pela diferença dos longos tempos de vida da sonda nestes sistemas. A pequena contribuição de τ_2 permite que o tornemos desprezível, caracterizando o decaimento do tempo de vida da sonda nas bicamadas lipídicas por uma monoexponencial. Como esperado, observamos que o valor do tempo de vida do Ahba é maior na presença de vesículas de DPPC do que para valores encontrados em etanol, estando principalmente associado à diferença nas polaridades destes sistemas. Quando nas vesículas, devido à localização precisa do anel benzeno na interface da bicamada lipídica, os valores de tempo de vida não se alteram consideravelmente tanto acima como abaixo da transição de fase.

Perfis de decaimento da anisotropia para a sonda Ahba a $20\ \mu\text{M}$ foram obtidos acima e abaixo da temperatura de transição de vesículas de DPPC a $0,5\ \text{mM}$, como mostrados pela Figura 4.38.

Figura 4.38: Decaimento da anisotropia para a sonda Ahba $20\ \mu\text{M}$ incorporada às vesículas de DPPC $0,5\ \text{mM}$, na fase gel (28°C e 37°C) e na fase líquido-cristalina (46°C e 54°C). As amostras foram excitadas em $330\ \text{nm}$ e os perfis de decaimento foram obtidos em $405\ \text{nm}$.

Os decaimentos foram mais bem ajustados por curvas biexponenciais, comprovado pelo valor reduzido de χ^2 , obtendo-se assim duas contribuições de tempo de correlação rotacional como mostra a Figura 4.39.

Figura 4.39: Tempos de correlação rotacional ϕ_1 e ϕ_2 da sonda Ahba 20 μM incorporada às vesículas de DPPC a 0,5 mM, para temperaturas compreendidas entre 22°C e 53°C.

O longo tempo ϕ_1 diminui de acordo com o aumento da temperatura, tendo uma queda mais acentuada em torno da temperatura de transição. Estes tempos estão associados ao movimento rotacional da molécula Ahba como um todo, que aumenta de acordo com o aumento da fluidez da bicamada lipídica. O ligeiro aumento no curto tempo de correlação rotacional pode estar refletindo uma menor mobilidade do anel benzeno na interface da membrana, associado à limitação imposta pelo movimento da sonda como um todo [19]. Na Tabela 4.15 estão mostrados todos os ajustes obtidos para os experimentos realizados de anisotropia resolvida no tempo em diferentes temperaturas, tanto na fase gel como na fase líquido cristalina das vesículas de DPPC.

Tabela 4.15: Parâmetros de ajuste dos decaimentos de anisotropia do Ahba 20 μM em vesículas de DPPC a 0,5 mM.

Temp. (°C)	Fator G	ϕ_1 (ns)	ϕ_2 (ns)	Pré-exp ₁ (r ₁)	Pré-exp ₂ (r ₂)	r _∞	% ₁	% ₂	χ^2
25	0,87	8,5±0,4	0,17±0,01	0,12±0,01	0,23±0,02	0,10	96	4	1,10
28	0,90	7,4±0,3	0,14±0,01	0,12±0,01	0,22±0,01	0,09	97	3	1,07
31	0,93	8,1±0,3	0,22±0,02	0,13±0,01	0,21±0,01	0,09	96	4	1,07
33	0,95	6,7±0,3	0,21±0,02	0,13±0,01	0,21±0,01	0,09	95	5	1,07
37	0,96	5,5±0,2	0,21±0,01	0,14±0,01	0,24±0,01	0,08	94	6	1,06
43	0,93	2,8±0,2	0,37±0,03	0,13±0,01	0,22±0,01	-0,04	81	19	1,00
46	0,98	2,1±0,1	0,32±0,03	0,14±0,01	0,18±0,01	0,005	84	16	1,01
50	0,97	2,1±0,1	0,28±0,02	0,14±0,01	0,20±0,01	0,014	84	16	1,00
54	0,95	1,7±0,1	0,29±0,03	0,14±0,02	0,20±0,01	0,015	80	20	1,04

5. CONCLUSÕES

1. Por medidas de tempo de vida, anisotropia do estado estacionário e perfis de decaimento da anisotropia, verificamos que baixas concentrações das sondas DPH, NBD em lipídios marcados e o Ahba em etanol possuem comportamento típico de monômeros em meio isotrópico.
2. Pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), verificamos que a adição de baixa concentração das sondas Ahba (20 μM) e NBD em lipídios marcados (5 μM) não altera a temperatura de transição da bicamada lipídica de DPPC (0,5 mM) e sua variação de entalpia, enquanto que para o DPH (5 μM), que localiza-se inserido na região hidrofóbica das vesículas, apenas há uma ligeira alteração na variação da entalpia, indicando que a interação das sondas em baixas concentrações praticamente não afetam o empacotamento lipídico das vesículas.
3. Por medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), verificamos que as vesículas foram formadas uniformemente pelo método da extrusão, comprovado pelo valor do índice de polidispersividade, com diâmetro médio de aproximadamente 130 nm para todas as amostras. Inferimos que a presença de outros picos ou de maior alargamento no pico da intensidade do espalhamento na fase gel é consequência da grande diferença entre o índice de refração da água e das vesículas, causada pela diminuição da área ocupada pela cabeça polar nas bicamadas devido ao enrijecimento das vesículas nesta fase e por uma possível formação de aglomerados das vesículas unilamelares.
4. A principal mudança do valor da intensidade nos espectros de emissão obtidos para o DPH em torno da transição de fase da membrana é relacionada à hidratação da membrana lipídica por moléculas de água da suspensão, que se torna possível devido à desordem dos fosfolipídios. Estas modificações são confirmadas por mudanças dos valores de tempo de vida em ambas as fases. As medidas de anisotropia estática indicam uma grande diferença no grau de restrição orientacional do DPH em ambas as fases das vesículas de DPPC. Os valores refletem os diferentes comportamentos das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios tanto acima como abaixo da temperatura de transição, indicando que na fase líquido-cristalina há uma maior desordem no empacotamento lipídico. Por

medidas de anisotropia resolvida no tempo, encontramos dois tempos de correlação rotacional, possivelmente atribuídos a duas populações da sonda nas bicamadas lipídicas: uma na direção perpendicular à superfície, entre as cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios de DPPC, e outra população que está localizada no meio da bicamada, entre suas monocamadas externa e interna. A nítida diferença dos valores encontrados para os tempos de correlação rotacional ϕ_1 acima e abaixo da transição reflete a relaxação do movimento “*wobbling*” da sonda confinada entre as cadeias lipídicas em um modelo de cone, em torno da normal da membrana. Na fase gel, a abertura máxima do cone calculada é aproximadamente 30°, enquanto que na fase fluida esta abertura é próxima a 60°.

5. A intensidade de emissão do fluoróforo NBD difere nas três posições lipídicas em que ele está ligado, quando em bicamadas fosfolipídicas de DPPC. O aumento desta intensidade até o momento da temperatura de transição das bicamadas lipídicas de DPPC e a conseqüente diminuição após esta temperatura para o fluoróforo ligado no carbono 6 e no carbono 12 das cadeias de ácido graxo da fosfatidilcolina, possivelmente está associado à modificação conformacional destas cadeias na fase líquido-cristalina das vesículas. A maior alteração dos valores de anisotropia estática em torno da temperatura de transição é para a sonda NBD-PE, que pode estar associado ao fato de que o NBD neste lipídio possui uma localização precisa quando inserido nas vesículas de DPPC. A diminuição nos tempos de correlação rotacional obtidos pelo ajuste dos perfis de decaimento da anisotropia pode estar associada à formação da âncora pela cabeça polar dos análogos fluorescentes na interface da membrana, fazendo com que a limitação da difusão rotacional torne-se dependente da microviscosidade das vesículas fosfolipídicas.

6. As mudanças na intensidade da emissão de fluorescência para a sonda Ahba nas diferentes fases são dependentes do aumento do movimento da sonda devido à agitação térmica do sistema, além do aumento da polaridade na membrana onde a sonda é inserida. Por medidas de anisotropia estática, verificamos uma acentuada queda nos valores de anisotropia em torno da temperatura de transição, como esperado, devido à maior liberdade do movimento rotacional da sonda pela

desordem dos fosfolipídios na fase líquido-cristalina das vesículas. Devido à localização precisa do anel benzeno na interface da bicamada lipídica, os valores de tempo de vida não se alteram consideravelmente tanto acima como abaixo da transição de fase das membranas. Os tempos obtidos de correlação rotacional estão associados ao movimento rotacional da molécula Ahba como um todo, que diminui de acordo com o aumento da fluidez da bicamada lipídica. O ligeiro aumento no curto tempo de correlação rotacional pode estar refletindo uma menor mobilidade do anel benzeno na interface da membrana, associado à limitação imposta pelo movimento da sonda como um todo.

Finalizando nosso estudo, verificamos que baixas concentrações das sondas fluorescentes empregadas neste trabalho revelam propriedades estruturais e dinâmicas das bicamadas fosfolipídicas. As diferenças entre as propriedades estruturais e físico-químicas destas sondas mimetizam o comportamento da membrana de diferentes formas, principalmente pela localização de cada fluoróforo dentro da bicamada fosfolipídica, tanto na fase gel como na fase líquido-cristalina. O movimento do DPH está intimamente restrito pelo movimento das cadeias alifáticas, devido à sua afinidade pela região hidrofóbica, enquanto que as outras sondas, ancorando-se na interface da membrana pela cabeça polar, no caso do NBD marcado em lipídios, e pelo anel benzeno, para a sonda Ahba, tem seu movimento restrito principalmente devido à microviscosidade e fluidez da membrana, comprovado principalmente pela diminuição nos tempos de correlação rotacional obtidos por perfis de decaimento da anisotropia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B. B., D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D., *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. 1997, Porto Alegre.
2. KUCERKA, N., NIEH, M. P., and KATSARAS, J., *Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2011. **1808**(11): p. 2761-2771.
3. BAGATOLLI, L. A., et al., *An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes*. *Progress in Lipid Research*, 2010. **49**(4): p. 378-389.
4. BASSO, L. G. M., et al., *Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2011. **1808**(1): p. 55-64.
5. BAGATOLLI, L. A., AMBROGGIO, E. E., *Giant Unilamellar Vesicles, Fluorescence Microscopy and Lipid-Peptide Interactions*, in *Membrane-active peptides, methods and results on structure and function*, M.A.R.B. Castanho, Editor. 2009. p. 171-192.
6. VALEUR, B., *Molecular Fluorescence*. 2002: Wiley-VCH Publishers.
7. VAN HOLDE, K. E., *Physical Biochemistry*. 2 ed. 1985: Prentice Hall.
8. LAKOWICZ, J. R., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Vol. 3, Biochemical applications. 1991: Plenum Press.
9. LOURA, L. M. S., et al., *Effects of fluorescent probe NBD-PC on the structure, dynamics and phase transition of DPPC. A molecular dynamics and differential scanning calorimetry study*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008. **1778**(2): p. 491-501.
10. MAZERES, S., et al., *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-labeled phospholipids in lipid membranes: Differences in fluorescence behavior*. *Biophysical Journal*, 1996. **71**(1): p. 327-335.

11. CHATTOPADHYAY, A., *Chemistry and Biology of N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-Yl)-Labeled Lipids - Fluorescent-Probes of Biological and Model Membranes*. Chemistry and Physics of Lipids, 1990. **53**(1): p. 1-15.
12. LAKOWICZ, J. R., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Vol. 6, Protein Fluorescence. 2000: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
13. VAN DER MEER, B. W., COKER, G., CHEN, S.-Y. S., *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*. 1991: Wiley-VCH Publishers.
14. MARRIOTT, G., PARKER, I., *Methods in Enzymology*. Vol. 360 & 361. 2003: Biophotonics.
15. ITO, A. S., et al., *Structure-Activity Correlations of Melanotropin Peptides in Model Lipids by Tryptophan Fluorescence Studies*. Biochemistry, 1993. **32**(45): p. 12264-12272.
16. DE OLIVEIRA, A. H. C., et al., *A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A(2) abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity*. Biochemistry, 2001. **40**(23): p. 6912-6920.
17. HORNILLOS, V., et al., *Synthesis and spectral properties of fluorescent linear alkylphosphocholines labeled with all-(E)-1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2010. **216**(1): p. 79-84.
18. LOURA, L. M. S. and RAMALHO, J. P. P., *Location and dynamics of acyl chain NBD-labeled phosphatidylcholine (NBD-PQ) in DPPC bilayers. A molecular dynamics and time-resolved fluorescence anisotropy study*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2007. **1768**(3): p. 467-478.
19. MARQUEZIN, C. A., et al., *Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes*. Biophysical Chemistry, 2006. **124**(2): p. 125-133.
20. AZZI, A., *Application of Fluorescent-Probes in Membrane Studies*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1975. **8**(2): p. 237-316.
21. TAKARA, M. and ITO, A. S., *General and specific solvent effects in optical spectra of ortho-aminobenzoic acid*. Journal of Fluorescence, 2005. **15**(2): p. 171-177.

22. MARQUEZIN, C. A., *Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo*, in *Departamento de Física - FFCLRP*. 2008, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto.
23. VAISH, V. and SANYAL, S. N., *Non steroidal anti-inflammatory drugs modulate the physicochemical properties of plasma membrane in experimental colorectal cancer: a fluorescence spectroscopic study*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011. **358**(1-2): p. 161-171.
24. PAUL, B. K. and GUCHHAIT, N., *Spectroscopic probing of location and dynamics of an environment-sensitive intramolecular charge transfer probe within liposome membranes*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011. **363**(2): p. 529-539.
25. ZUNINO, M. P., et al., *Stereoselective Effects of Monoterpenes on the Microviscosity and Curvature of Model Membranes Assessed by DPH Steady-State Fluorescence Anisotropy and Light Scattering Analysis*. *Chirality*, 2011. **23**(10): p. 867-877.
26. CHEN, S. Y. and CHENG, K. H., *Detection of membrane packing defects by time-resolved fluorescence depolarization*. *Biophysical Journal*, 1996. **71**(2): p. 878-884.
27. SATO, N., et al., *Molecular motion in polymer monolayers at the air/water interface. A time-resolved study of fluorescence depolarization*. *Langmuir*, 1997. **13**(21): p. 5685-5690.
28. KAWATO, S., KINOSITA, K., and IKEGAMI, A., *Dynamic Structure of Lipid Bilayers Studied by Nanosecond Fluorescence Techniques*. *Biochemistry*, 1977. **16**(11): p. 2319-2324.
29. HEIMBURG, T., *Thermal Biophysics of Membranes*. 2007: Wiley-VCH.
30. BURGUERA, J. L. and BURGUERA, M., *Analytical applications of organized assemblies for on-line spectrometric determinations: present and future*. *Talanta*, 2004. **64**(5): p. 1099-1108.
31. ISRAELACHVILI, J., *Intermolecular and Surface Forces*. 2 ed. 1991, California: Academic Press.
32. BANGHAM, A. D., *Surrogate Cells or Trojan Horses - the Discovery of Liposomes*. *Bioessays*, 1995. **17**(12): p. 1081-1088.

33. SZOKA, F., et al., *Preparation of Unilamellar Liposomes of Intermediate Size (0.1-0.2-µm) by a Combination of Reverse Phase Evaporation and Extrusion through Polycarbonate Membranes*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1980. **601**(3): p. 559-571.
34. OLSON, F., et al., *Preparation of Liposomes of Defined Size Distribution by Extrusion through Polycarbonate Membranes*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1979. **557**(1): p. 9-23.
35. LASIC, D. D., *Liposomes in Gene Delivery*. 1997, New York: CRC Press.
36. EVANS, E. A. and PARSEGHIAN, V. A., *Energetics of Membrane Deformation and Adhesion in Cell and Vesicle Aggregation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1983. **416**(Dec): p. 13-33.
37. NEW, R. R. C., *Liposomes: A Practical Approach*. 1990, Oxford: Oxford University Press.
38. NAYAR, R., HOPE, M. J., and CULLIS, P. R., *Generation of Large Unilamellar Vesicles from Long-Chain Saturated Phosphatidylcholines by Extrusion Technique*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1989. **986**(2): p. 200-206.
39. SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. (2002) *Lipossomas: a bala mágica acertou?* Quím. Nova [online] **Volume**, DOI: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000700019&lng=en&nrm=iso
40. ANGELOVA, M. I. and DIMITROV, D. S., *Liposome Electroformation*. Faraday Discussions, 1986. **81**: p. 303-+.
41. ENOKI, T. A., *Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos*, in *Instituto de Física*. 2010, Universidade de São Paulo: São Paulo.
42. FERNANDEZ, R. M., et al., *Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2008. **1778**(4): p. 907-916.
43. MANSILHA, C. I. G. R., *Estudos de partição e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas*, in *Faculdade de Ciências*. 2002, Universidade do Porto: Porto.

44. RISKE, K. A., AMARAL, L. Q., and LAMY-FREUND, M. T., *Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2001. **1511**(2): p. 297-308.
45. LAMY-FREUND, M. T. and RISKE, K. A., *The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG*. Chemistry and Physics of Lipids, 2003. **122**(1-2): p. 19-32.
46. BARROSO, R. P., et al., *Ionization and Structural Changes of the DMPG Vesicle along Its Anomalous Gel-Fluid Phase Transition: A Study with Different Lipid Concentrations*. Langmuir, 2010. **26**(17): p. 13805-13814.
47. VANDERHEIDE, U. A., VANGINKEL, G., and LEVINE, Y. K., *DPH is localised in two distinct populations in lipid vesicles*. Chemical Physics Letters, 1996. **253**(1-2): p. 118-122.
48. GLATZ, P., *Limited Rotational Diffusion of Dph in Human Erythrocyte-Membranes*. Analytical Biochemistry, 1978. **87**(1): p. 187-194.
49. RAGHURAMAN, H., SHRIVASTAVA, S., and CHATTOPADHYAY, A., *Monitoring the looping up of acyl chain labeled NBD lipids in membranes as a function of membrane phase state*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2007. **1768**(5): p. 1258-1267.
50. TAKARA, M., *Propriedades Ópticas de Absorção e Emissão Fluorescente do Ácido orto-Aminobenzóico e Derivados em meio solvente*, in Departamento de Física e Matemática. 2006, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto.
51. BERARDI, M., *Análogos fluorescentes de agentes anti-parasitários: interações com agregados anfifílicos*, in Departamento de Física - FFCLRP. 2010, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto.
52. GALO, A. L., COLOMBO, M. F., *Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa*. Quim. Nova, 2009. **32**: p. 488-492.
53. LAKOWICZ, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1999, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
54. WEBER, G., *Uses of Fluorescence in Biophysics - Some Recent Developments*. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 1972. **1**: p. 553-570.

55. WAHL, P., *Fluorescence Anisotropy Decay and Brownian Rotational Motion: Theory And Application in Biological Systems*, in *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*, R.B. Cundall, Dale, R. E., Editor. 1983, Plenum Press: New York. p. 497-522.
56. KINOSITA, K., KAWATO, S., and IKEGAMI, A., *Theory of Fluorescence Polarization Decay in Membranes*. Biophysical Journal, 1977. **20**(3): p. 289-305.
57. BASSO, L. G. M., *Interações de fármacos anti-malária com modelos de membrana*, in *Intituto de Física*. 2009, Universidade de São Paulo: São Carlos.
58. BERNE, B. J., PECORA, R., *Dynamic Light Scattering*. 2000: John Wiley & Sons.
59. NAGLE, J. F. and TRISTRAM-NAGLE, S., *Structure of lipid bilayers*. Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes, 2000. **1469**(3): p. 159-195.
60. SAITO, H., et al., *Physical states of surface and core lipids in lipid emulsions and apolipoprotein binding to the emulsion surface*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(26): p. 15515-15520.