UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO
PRETO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“INFLUÊNCIA DA ÂNCORA DE GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL
NA IMOBILIZAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA IMOBILIZADA EM
SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS CELULARES:
MONOCAMADAS DE LANGMUIR E FILMES LANGMUIR-BLODGETT
DE FOSFOLIPÍDIOS”

LUCIANO CASELI
ORIENTADORA: MARIA ELISABETE DARBELLO ZANIQUELLI

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE FILOSOFIA,
CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, COMO PARTE DAS
EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS, ÁREA: QUÍMICA

CAPÍTULO 1

MIMETIZAÇÃO DE MEMBRANAS CELULARES

1.1. Fundamentos

As membranas externas de muitas células são películas finas (6 a 9nm), flexíveis, fluídas, constituídas por uma bicamada com uma grande variedade de lipídios e proteínas. Dentre os lipídios, destacam-se os fosfoglicerídios (ou fosfolipídios) e, em menor quantidade, os esfingolipídios. Muitas células possuem também quantidades consideráveis de colesterol e ésteres de colesterol. Esses lipídios estão dispostos na membrana de tal forma que a parte hidrofílica esteja exposta para o exterior ou interior aquoso da célula, e a parte hidrofóbica esteja voltada para o interior da bicamada (Figura 1). A parte hidrofílica é usualmente chamada de “cabeça polar”, e a parte hidrofóbica de “cauda apolar”.

Entre as proteínas de membrana, há uma grande variedade de tipos. As chamadas extrínsecas ou periféricas têm a cadeia polipeptídica interagindo com as cabeças polares dos lipídios. Normalmente, essas proteínas são fracamente ligadas à superfície membranosa. Outras podem estar parcial ou totalmente embebidas dentro da estrutura da bicamada, interagindo com as caudas apolares dos lipídios constituintes. Essas proteínas são conhecidas como intrínsecas ou integrais. Outras são chamadas de proteínas ancoradas de membrana, possuindo a cadeia polipeptídica voltada para a parte aquosa, mas ligada covalentemente a um lipídio da bicamada.

Um primeiro modelo unificador a respeito da estrutura da membrana foi proposto em 1972 [Singer e Nicolson, 1972], sendo chamado de “mosaico fluido”. Nesse modelo, as proteínas integrais de membrana possuem grupos laterais de resíduos de aminoácidos

hidrofóbicos na sua superfície, o que as forçariam a se “dissolver” na porção hidrofóbica central da bicamada. As proteínas periféricas, por outro lado, possuem grupos laterais hidrofílicos, interagindo com o meio externo aquoso celular, e, também, interagindo eletrostaticamente com os lipídios eletricamente carregados da bicamada. Nesse modelo, as proteínas se movem lateralmente pela superfície da membrana, podendo formar aglomerados. As interações dos resíduos de aminoácidos com a membrana seriam o fator chave que determinaria a estrutura terciária da proteína.

Figura 1: Modelo simplificado para uma membrana biológica mostrando os lipídios e as proteínas de membrana (adaptado de “LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p. Tradução de: Principles of Biochemistry)

Cada membrana tem uma composição de lipídios e proteínas característica, o que vai lhe conferir suas propriedades físico-químicas típicas. A distribuição de seus constituintes não é homogênea, nem comparando a camada externa com a interna, tampouco analisando lateralmente a membrana. Sabe-se, por exemplo, que alguns lipídios se agregam formando domínios “jangada” (*rafts*). Esses agregados possuem grau de compactação superior ao meio circundante e têm composição lipídica e protéica característica [Simons e Ikonen, 1997].

1.2. Modelos para biomembranas

Dois dos modelos mais classicamente empregados para se mimetizar membranas biológicas são as dispersões multi ou unilamelares (lipossomos) e as monocamadas de Langmuir formadas por lipídios e proteínas. Essas últimas são películas monomoleculares formadas na interface ar/água, podendo ter composição e grau de compactação variáveis. Apesar delas mimetizarem apenas metade de uma membrana e terem uma certa limitação quando se estuda proteínas-transmembrana, as monocamadas podem ser consideradas como excelentes ferramentas para se investigar interações das espécies constituintes da membrana em arranjos bidimensionais [Brockman, 1999; Marsh, 1996; Brezesinski e Möhwald, 2003].

Particularmente, o uso de lipossomos como sistema biomimético para membranas têm algumas significantes limitações frente ao uso de monocamadas. Primeiro, a extensão sobre a qual a composição lipídica possa ser variada sem mudar a curvatura superficial, e, também, o estado de fase, é limitado [Micol et al., 1996]. Uma segunda limitação é sua

inabilidade em regular a densidade e a composição lipídica independentemente. Ainda, o estado físico e a composição dependem do método de preparação. Por último, a composição lipídica e a área exposta para o meio aquoso não são exatamente conhecidas. Em contrapartida, as monocamadas de Langmuir superam essas limitações. Além disso, a relação termodinâmica entre uma bicamada e uma monocamada é direta [Feng, 1999].

Lipídios transferidos para suportes sólidos também têm sido empregados como modelos para biomembranas. Dentre eles, destacam-se os filmes “negros” (black films), filmes Langmuir-Blodgett (LB), filmes automontados e dispersões aderidas a suportes sólidos. Normalmente, esses filmes têm alto grau de compactação, e, portanto, fluidez reduzida, mas são úteis para se investigar interações proteína-membrana, além de poderem servir para o estudo na fabricação de biossensores.

CAPÍTULO 2

USO DE MONOCAMADAS COMO SISTEMAS MODELO PARA BIOMEMBRANAS

2.1. Princípio da técnica

A técnica de Langmuir é baseada no espalhamento de substâncias anfifílicas em interfaces ar/água [Pockels, 1891; Rayleigh, 1899; Langmuir, 1917]. Tais substâncias são usualmente insolúveis em água e constituídas por longas cadeias alquílicas e por uma região polar, orientando-se na interface para minimizar sua energia livre. Classicamente são empregados os ácidos graxos e os fosfolípídios de cadeia longa (usualmente com mais que doze carbonos). Esses materiais são dissolvidos em solventes orgânicos (clorofórmio ou n-hexano, por exemplo) em concentrações da ordem de 1.10^{-4} a $2.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Alíquotas microlítricas são tomadas dessas soluções por uso de uma microseringa e dispensadas gota a gota sobre uma solução aquosa contida num compartimento revestido internamente por um material hidrofóbico (usualmente teflon). Tal compartimento é conhecido como cuba de Langmuir (Figura 2).

Figura 2: Esquema para uma cuba de Langmuir

O procedimento de dispensar a solução orgânica do material anfifílico sobre a solução aquosa é conhecido como “espalhamento”, pois o anfifílico irá se difundir lateral e homogeneamente ao longo de toda a superfície aquosa. Após a evaporação do solvente, será formado um filme de espessura monomolecular, conhecido como “filme ou monocamada de Langmuir”, ou simplesmente “monocamada”.

Os materiais anfifílicos formadores das monocamadas são tensoativos por agirem na superfície aquosa. Apesar dos materiais insolúveis serem os mais idealmente empregados na fabricação de monocamadas, materiais aquo-solúveis podem ser também estudados como formadores desses filmes, tais como alguns polímeros e proteínas [Bull, 1937]. No entanto, condições especiais devem ser empregadas na solução aquosa suporte da monocamada (subfase), como por exemplo, o uso de alta força iônica [Bull, 1945a; Bull, 1945b; Bull, 1945c].

Além disso, as interações dos materiais formadores da monocamada com outros materiais presentes na subfase podem ser também estudadas. Sais, polímeros, peptídios, proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas são exemplo de substâncias frequentemente empregados nas subfases de filmes de Langmuir.

Particularmente, o uso de monocamadas mistas de lipídios com proteínas como modelos para membranas celulares têm interesse crescente na comunidade científica [Doty e Schulman, 1949; Brezesinski e Möhwald, 2003]. Para se formar filmes mistos, pode-se co-espalhar uma solução orgânica mista que contenha o lipídio e a proteína de interesse. No entanto, nessa técnica, a solução orgânica pode desnaturar a estrutura protéica. Num outro método, injeta-se uma solução aquosa da proteína no interior da subfase aquosa e espera-se que, por difusão, a proteína atinja a interface ar/água. Nesse método, o fosfolipídio pode ser espalhado na interface antes ou depois da injeção da proteína. Também, pode-se espalhar a solução de proteína na interface ar/água, desde que ela tenha baixa solubilidade na subfase aquosa. Em muitos casos, uma alta força iônica é usada na subfase, para que, por efeito de expulsão por salinidade (*salting-out*), a proteína permaneça na interface [Bull, 1945a; Bull, 1945b; Bull, 1945c]. O espalhamento do lipídio é feito em separado, antes ou depois do espalhamento da proteína.

2.2. Caracterização das monocamadas

2.2.1. Isotermas de pressão de superfície-área (π -A)

Quando uma substância anfifílica é espalhada ou adsorvida na interface ar/água, ela vai provocar uma redução na tensão superficial da água (γ_o), levando a uma tensão γ . A redução da tensão superficial ($\gamma_o - \gamma$) é chamada de pressão de superfície (π), propriedade que é a mais freqüentemente empregada para caracterizar monocamadas de Langmuir. A tensão superficial é usualmente medida por uma placa feita com um material hidrofílico,

interceptando a interface ar/água, e conectada a uma balança. Tal placa é conhecida como placa de Wilhelmy.

Numa cuba de Langmuir, uma barreira móvel é colocada na interface, sendo acionada de tal forma que a monocamada formada seja comprimida. A compressão da monocamada provocará sua compactação sucessiva, e, conseqüentemente, a pressão de superfície aumentará no decorrer da compressão. Uma curva relacionando a pressão de superfície com a área disponível por molécula de tensoativo (normalmente na ordem de ângstrons) é conhecida como isoterma pressão de superfície-área (π -A), que será obtida a uma temperatura, T, invariável.

A relação $-1/A (\partial\pi/\partial A)_T$, (que matematicamente é o inverso da compressibilidade superficial) é conhecida como módulo compressional de superfície (*surface compressional factor*) [Davies e Rideal, 1963], ou elasticidade no plano (*in-plane elasticity*) [Smaby et al., 1997]. Graficamente, é proporcional à medida da inclinação da curva π -A, ou seja, quanto maior o aumento da pressão de superfície devido a uma compressão que provocará uma dada diminuição de área, menor será a compressibilidade (ou maior a elasticidade) do filme. Analisando o perfil de uma isoterma, é possível identificar várias “regiões de compressibilidade” (veja, como exemplo, a Figura 3). Nela, é possível notar três estágios de diferentes compressibilidades, identificados cada um a diferentes estados físicos, atribuídos de forma análoga aos estados tridimensionais da matéria. Assim, temos os estados gasoso, líquido-expandido, líquido-condensado e sólido. Regiões com pressão superficial constante (patamares ou platôs), mesmo com constante redução da área disponível por molécula, são atribuídas às transições de fases. A extrapolação da região com a menor compressibilidade para pressões de superfície igual a zero são conhecidas como área mínima ou área

limitante; e a pressão máxima atingida numa compressão é conhecida como pressão de colapso. No colapso, a estrutura em monocamada é desfeita, e bi ou policamadas começam a serem formadas de forma desorganizada.

Figura 3: Esquema para uma isoterma pressão de superfície (π)-área (A), mostrando os estados superficiais gasoso (G), líquido-expandido (LE), líquido-condensado (LC) e sólido (S). X_n corresponde à posição da barreira móvel. l é a largura da cuba. As áreas A_0 , A_1 , A_2 , A_3 , correspondem respectivamente a X_0 , X_1 , X_2 e X_3 .

2.2.2. Isotermas de potencial de superfície-área (ΔV -A)

Na interface ar/água, há uma diferença de potencial (ΔV_1) provocada pela orientação preferencial das moléculas de água interfaciais, de tal forma que o oxigênio esteja voltado em direção ao ar. A presença de um tensoativo criará uma nova diferença de potencial (ΔV_2) entre a interface e a subfase. A diferença $\Delta V_2 - \Delta V_1$ é conhecida como potencial de superfície, ΔV , que pode ser relacionado com os momentos dipolares das moléculas presentes na interface, sendo expresso como:

$$\Delta V = \mu \cdot (A \epsilon_0 \epsilon_r)^{-1}$$
, onde A é a área disponível por molécula, ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo, ϵ_r é a permissividade relativa do meio, μ é a projeção, na reta normal à interface, do momento dipolar das moléculas presentes na superfície. O momento dipolar expresso é o resultado da soma não somente da contribuição do anfifílico formador da monocamada, mas também das moléculas de água próximas à interface.

Se a monocamada for ionizada, deve-se somar à contribuição do momento de dipolo, o potencial ψ , expresso pela teoria de Gouy-Chapman [Gouy, 1910; Chapman, 1913].

O potencial de superfície é medido pelo método da placa vibrante ou do eletrodo ionizante. Nesse último, um eletrodo emissor de partículas α é colocado muito próximo à superfície aquosa (1-5mm), ionizando o ar entre o eletrodo e a monocamada e, portanto, tornando o ar condutor. Um outro eletrodo de referência (pode ser Ag/AgCl ou de calomelano saturado) é colocado no interior da solução. Conjuntamente com as curvas π -A, as curvas ΔV -A são obtidas durante a compressão da monocamada. Numa curva ΔV -A

(Figura 4), normalmente se obtém a área crítica [Morgan et al.,1989; Oliveira e Bonardi, 1999], na qual um aumento mais considerável no potencial é observado depois de iniciada a compressão. Outra propriedade importante é o potencial de compressão máxima, correspondente ao valor quando o colapso é atingido. Esses valores são característicos de cada monocamada formada.

Figura 4: Esquema para a medida de potencial de superfície

2.2.3. *Microscopia de Fluorescência*

Para se analisar a morfologia de monocamadas líquidas, técnicas de microscopia, como de fluorescência [McConnel et al, 1983] e no ângulo de Brewster [Höning e Möbius, 1991; Mëunier, 2000] são as mais classicamente empregadas para se estudar filmes de Langmuir.

Para a microscopia de fluorescência na interface (ou epifluorescência), utiliza-se uma sonda fluorescente que se misture no material formador da monocamada. Durante a compressão interfacial, regiões de transição de fase podem surgir na monocamada e a sonda provavelmente se dissolverá em uma das fases. Assim, na análise das imagens registradas por um microscópio de fluorescência, é possível observar a formação de domínios, pois aparecerão regiões claras, onde a sonda está presente, e regiões escuras, onde a sonda está ausente.

Em monocamadas mistas, é freqüente a formação de multidomínios, e, assim, o uso de um material marcado fluorescentemente identificará os domínios dos compostos formadores das monocamadas. A objetiva e a luz de incidência podem estar ambos acima da cuba, ou então, numa adaptação, a luz de incidência provém por baixo da cuba, passando através de uma janela transparente no fundo da cuba e atingindo a objetiva depois de passar por subfase e monocamada. Essa última adaptação faz parte de um chamado “microscópio invertido”.

2.2.4. Microscopia no ângulo de Brewster

Na microscopia no ângulo de Brewster, diferentemente da microscopia de epifluorescência, não é necessário ter uma sonda. Um feixe luminoso, incidindo na interface no ângulo de Brewster, refletirá e será captado por um detector situado num outro braço localizado no lado oposto do braço de incidência (Figura 5). No ângulo de Brewster, não há refletividade para uma interface de Fresnel (uma interface de Fresnel é aquela sem rugosidade e cujo índice de refração varie abruptamente entre uma fase mais condensada e outra menos condensada). Porém, para uma monocamada de Langmuir, uma interface real, essa refletividade é mínima no ângulo de Brewster (para a água, próximo de 54°), o que proporcionará à técnica uma alta sensibilidade com a morfologia superficial.

Assim, a microscopia no ângulo de Brewster é uma excelente ferramenta para se estudar *morfologias* interfaciais [Meunier, 2000], por proporcionar diferentes contrastes dependentes não só dos estados de condensação de fases presentes na interface, mas também da espessura da monocamada formada.

Figura 5: Esquema para a técnica da Microscopia no ângulo de Brewster

2.2.5. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível.

Espectroscopias RAMAN [Chamberlain e Pemberton, 1997, Fendler e Meldrum, 1985], de fluorescência [Kjaer et al., 1987], na região do ultravioleta-visível [Decher et al. 1991, Dziri et al., 1997], e na região do infravermelho [Mendelson et al, 1995, Mitchell e Dluhy, 1988] têm sido freqüentemente usadas para caracterizar monocamadas de Langmuir.

Particularmente, a espectroscopia na região do ultravioleta (UV)-visível pode ser usada para identificar tanto os materiais formadores da monocamada [Dziri et al. 1997,

Decher e Klinhammer, 1991], quanto para identificar e quantificar a formação de materiais na subfase, oriundos de reações na interface, cujo produto é solúvel na subfase aquosa [Caseli et al., 2003a]. Nesse último caso, amostras da subfase podem ser amostradas continuamente através de tubos de fluxo contínuo que passam pela subfase aquosa, coletando a amostra que passa por uma cubeta onde a absorbância na região do UV-visível será medida. Uma adaptação para esse método, é injetar uma ponta na subfase aquosa, que coleta temporariamente amostras da subfase levando-as a um compartimento. Nesse compartimento, um feixe luminoso proveniente de uma fibra óptica o atinge e passa por ele, refletindo num espelho localizado em seu fundo, para, posteriormente, voltar pela fibra óptica a um analisador (Figura 6).

Uma outra adaptação é usar a própria cuba como “compartimento de análise”. A luz incidente passa por uma janela transparente localizada no fundo da cuba. O analisador é localizado acima da interface, de tal forma que o caminho óptico corresponda à profundidade da cuba. Nesse caso, podem-se identificar tanto espécies presentes na subfase como na interface. O aumento da intensidade de uma banda de absorção conforme se comprime a monocamada pode ser atribuído a uma espécie presente na interface ar/água, cuja densidade superficial aumenta progressivamente devido à compressão do filme monomolecular.

Figura 6: Esquema para a análise espectroscópica na subfase

2.2.6. Espectroscopia na região do infravermelho.

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma boa ferramenta para a caracterização molecular de espécies presentes na interface, especialmente de lipídios e proteínas, pois as frequências observadas são dependentes das configurações e conformações moleculares. A espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho (IRRAS – “*absortion infrared reflection spectroscopy*”) tem sido usada para se obter

informações estruturais de monocamadas em interfaces ar/água [Mendelson et al, 1995, Mitchell e Dluhy, 1988]. No entanto, as aplicações da técnica, nesse caso, têm basicamente três problemas. Primeiro, os momentos de transição no infravermelho são relativamente fracos, pois os coeficientes de extinção na superfície são tipicamente de 20 a 1000 vezes menos intensos do que seriam em solução. Segundo, a refletividade da luz infravermelha na água é baixa. Finalmente, as bandas do vapor d'água interferem em algumas regiões espectrais de interesse.

No entanto, em séries de trabalhos iniciados em 1985, Dluhy e colaboradores obtiveram espectros IRRAS de monocamadas de anfifílicos com uma e duas cadeias na interface ar/água. Um esquema para a montagem do experimento de IRRAS em monocamadas de Langmuir é mostrado na Figura 7. Nela, podemos observar que o feixe IV pode ser diretamente incidido na superfície da água, em diferentes ângulos de incidência, com um conveniente caminho óptico para a inserção de um polarizador. A introdução da cuba dentro de uma câmara saturada de gás nitrogênio evitará a absorção de bandas relativas ao vapor de água.

A técnica da modulação por polarização da luz infravermelha foi introduzida [Buffeteau et al., 1991], e, nela, o sinal devido à interferência do vapor de água é diminuído devido à independência do feixe refletido em relação à absorção isotrópica.

Figura 7: Esquema para a técnica de espectroscopia de absorção-reflexão na região do infravermelho na interface ar/água.

2.2.7. Reologia superficial

A elasticidade superficial, E , é definida segundo Gibbs:

$$E = d\gamma/d\ln A_s$$

Onde $d\gamma$ é uma variação infinitesimal da tensão superficial e $d\ln A_s$ relaciona-se com uma variação infinitesimal da área da superfície. Essa propriedade mede o quanto a tensão superficial pode variar com uma perturbação mecânica que provocará uma variação de área dA .

No entanto, diversas contribuições têm sido feitas por diversos grupos de pesquisas [Lucassen e van den Tempel, 1972; Benjamins et al., 1972; Lunkenheimer e Kretzschmar,

1975; Ting et al., 1985; Tian et al., 1977; Benjamins et al., 1996; Warszynski et al., 2001] para se determinar a elasticidade de superfícies. Entre as técnicas desenvolvidas, destaca-se o método do formato da gota eixo-simétrica [Rotenberg et al., 1983; Zholkovskij et al.; 2000; Cheng et al., 1990], onde uma gota, suspensa por um tubo de uma seringa, é sujeita a deformações periódicas em sua área. A tensão superficial é medida a cada deformação, e duas curvas oscilatórias (área x tempo e tensão superficial x tempo) são obtidas. Se elas estiverem em fase, a superfície da gota é perfeitamente elástica. Se houver um atraso de fase, definido pelo ângulo θ , então haverá um componente viscoso para a elasticidade superficial dilatacional.

Assim, E pode ser considerando como uma grandeza complexa, formada por um componente real (ou elástico), E_1 , e um componente imaginário (ou viscoso), E_2 :

$$E = E_1 + E_2 = |E| \cos\theta + i |E| \sin\theta$$

O componente viscoso é proporcional à viscosidade dilatacional (η_d) e à frequência (f) aplicada à interface. Assim, tem-se:

$$|E| \sin\theta = 2 \pi f \eta_d$$

A importância em determinar a elasticidade superficial vem de sua capacidade em se relacionar com outras propriedades físicas, tais como empacotamento superficial e efeitos difusivos.

CAPÍTULO 3

USO DE FILMES LANGMUIR-BLODGETT (LB) COMO SISTEMAS

MODELO PARA BIOMEMBRANAS

3.1. Princípio da técnica

A técnica de transferência de monocamadas para suportes sólidos foi primeiramente introduzida por Irving Langmuir em 1919 e aperfeiçoada por Katharine Blodgett [Blodgett, 1934; Blodgett, 1935, Blodgett, 1937; Blodgett e Langmuir, 1937]. Ela consiste em inicialmente comprimir o filme de Langmuir até que ele atinja um grau de compactação razoável (usualmente uma pressão de superfície acima de 20mN/m). Quando tal grau é atingido, o suporte sólido é imerso verticalmente na subfase aquosa, de forma que, ao passar pela interface ar/água, uma camada do filme de Langmuir será transferido para o suporte sólido (Figura 8). Se o filme for emerso da subfase, uma segunda camada será transferida. Assim, o número de camadas e, conseqüentemente, a espessura do filme serão controlados pelo número de imersões e emersões do filme pela interface. Em variações desse procedimento, pode-se iniciar a deposição pela emersão do suporte sólido, se esse for hidrofílico, uma vez que a interação monocamada-suporte será via cabeça polar do anfifílico.

Quando a monocamada transferida for formada por um lipídio (um fosfolipídio, por exemplo), podemos formar uma bicamada através de uma emersão seguida por uma imersão. Se esse suporte, com duas camadas de lipídio, for imerso numa solução contendo

uma proteína de membrana, tal proteína poderá, por adsorção física, ser imobilizada no filme, e, assim, teremos um modelo simplificado para uma membrana biológica.

Também, uma monocamada mista de lipídio/proteína pode ser diretamente transferida para o suporte sólido, e suas propriedades estudadas no estado sólido.

Figura 8: Esquema para a deposição de filmes Langmuir-Blodgett (LB)

3.2. Caracterização dos filmes LB

3.2.1. Razão de transferência

A primeira caracterização quando se imobiliza uma monocamada de Langmuir a um suporte sólido na forma de filmes LB é o cálculo da razão de transferência.

Antes da imersão ou emersão do suporte, a barreira móvel deve estar parada e a pressão de superfície constante. Quando a placa passa verticalmente pela monocamada, se houver transferência do filme presente na interface ar/água para a interface sólido/água ou sólido/ar, a pressão de superfície sofrerá um decréscimo devido à retirada de material da superfície aquosa. A barreira então é acionada para comprimir a interface e restaurar a pressão de superfície inicial. O deslocamento de área na cuba (ΔC) deve ser igual à área do suporte sólido que passou verticalmente pela monocamada em contato com ela (ΔS).

Assim, a razão de transferência (R) pode ser calculada como:

$$R = \Delta S / \Delta C$$

Dessa forma, quanto mais próxima da unidade for o valor da razão calculada, mais perto a idealidade de transferência.

3.2.2. Microbalança a cristal de quartzo

Uma microbalança a cristal de quartzo (MCQ) consiste de um fino disco de quartzo, com filmes metálicos depositados em ambas as faces, que servem como eletrodos, que são conectados a um freqüencímetro (Figura 9). A freqüência fundamental do cristal depende de sua estrutura química, de sua espessura, de seu formato e de sua massa. Assim, a deposição de um material sobre esse cristal terá sua massa proporcional à variação da freqüência de oscilação, segundo a equação de Sauerbrey [Saubrey, 1959]:

$$\Delta m = - \Delta f A_c (2,26 \cdot 10^6 F_o^2)^{-1}$$

Onde Δm é a massa depositada sobre o cristal em nanogramas, Δf é a variação de frequência de oscilação do cristal em Hz, A_c é a área ativa do cristal (ou seja, a área compreendida entre os eletrodos), Δm é a massa depositada em gramas, e F_o é a frequência inicial do cristal em MHz.

Assim, a massa depositada em filmes LB, na ordem de nanogramas, pode ser estimada via MCQ [Okahata e Ariga, 1987] . De fato, essa técnica tem sido usada para se determinar microgravimetricamente não somente a massa depositada por camada em filmes LB [Okahata e Ariga, 1989, Damos et al., 2004], como também para estimar a massa adsorvida de proteínas e outras macromoléculas, a partir de solução, em filmes LB pré-preparados [Okahata et al., 1989].

Figura 9: Esquema para um cristal de quartzo folheado com ouro (eletrodo) para medidas de microgravimetria.

3.2.3. *Técnicas espectroscópicas*

Técnicas espectroscópicas podem ser aplicadas em filmes LB, dependendo do material imobilizado. Particularmente, para proteínas imobilizadas em filmes LB lipídicos, a espectroscopia na região do infravermelho tem se mostrado útil por poder identificar as bandas amida das ligações peptídicas. Também, a espectroscopia na região do ultravioleta-visível pode ser capaz não somente de caracterizar espécies imobilizadas, como também para estudar a atividade catalítica em meio heterogêneo [Petrigliano et al., 1996; Paddeu et al., 1996].

Assim, como exemplo, um catalisador biológico, uma enzima, imobilizado no suporte sólido, é imerso num compartimento que contém o substrato que sofrerá catálise. Se o produto da catálise tiver absorção na região do ultravioleta-visível, sua formação pode ser monitorada continuamente com o tempo através da análise das intensidades de suas bandas de absorção. Esse método tem se mostrado útil no estudo da construção de biossensores das mais variadas espécies [Petrigliano et al., 1996].

A espectroscopia na região do infravermelho tem sido útil também na identificação de proteínas e lipídios adsorvidos [Berzina et al., 1986; Pastorino et al; 2002].

3.2.4. *Microscopia de força atômica*

A microscopia de força atômica (MFA) é freqüentemente usada para se estudar morfologia de filmes finos nanoestruturados [Meyer, 1991]. Nessa técnica, uma ponta fina é colocada muito próxima à amostra (Figura 10). Essa ponta varrerá a superfície, e as

interações interatômicas entre a ponta e amostra provocarão a deflexão da alavanca, à qual a ponta encontra-se ligada. Um feixe de “laser” estará incidindo na alavanca, e uma deflexão dessa alavanca provocará um desvio da luz refletida. A deflexão da alavanca dependerá da intensidade da interação entre a ponta e a amostra, e tal interação dependerá da distância entre eles. Assim, o desvio da luz incidente sobre a alavanca será dependente da topografia da amostra, e conseqüentemente de sua rugosidade.

Figura 10: Esquema para a determinação da morfologia de uma amostra sólida por Microscopia de força atômica.

Assim, a varredura da ponta sobre uma dada área da amostra provocará uma imagem que indicará a morfologia pela captação de sua topografia (modo altura). Num outro modo, o modo fase, a alavanca estará sujeita a uma oscilação periódica. A interação da ponta com a amostra provocará uma alteração da frequência de oscilação da alavanca, que será característica de cada material presente. Por consequência, em vez da topografia, a imagem obtida será dependente do tipo da espécie presente na amostra.

Filmes LB, por terem uma estrutura fina e pouco rugosa, podem ser estudados através de microscopia de força atômica. De fato, diversos trabalhos [como revisão, Hansma et al., 1994] têm empregado MFA para caracterização morfológica de filmes nanoestruturados.

3.2.5. *Elipsometria*

Nessa técnica, medem-se as mudanças no estado de polarização da luz devido à reflexão numa interface [Rothen, 1945]. Assim, uma luz incidente (i), linearmente polarizada, incidirá sobre uma superfície coberta com um material e será refletida (r). A componente elétrica da luz refletida poderá ser decomposta em duas partes, ou seja, haverá a componente que vibrará paralelamente (E_p) e outra perpendicularmente (E_s) em relação ao plano de incidência.

E_p e E_s podem estar fora de fase, e o ângulo de defasagem (conhecido como ângulo de fase) será definido por Δ_e . Também, as amplitudes das componentes paralela e perpendicular serão diferentes, e a razão entre elas será definida por ψ_e . A relação entre Δ_e e ψ_e será expressa através da introdução de um coeficiente de reflexão complexo, ρ :

$$\rho = \operatorname{tg}(\psi_e) \cdot e^{(i \Delta_e)}$$

No qual, ρ dependerá dos índices de refração do ambiente, do filme e do substrato, do comprimento de onda da luz incidente, do ângulo de incidência e da espessura do filme.

Assim, um elipsômetro determinará os parâmetros Ψ_e e Δ_e , e, conseqüentemente, a espessura da amostra poderá ser obtida.

Dessa forma, filmes Langmuir-Blodgett, por serem extremamente finos (na ordem de ângstrons), podem ter suas espessuras determinadas pela técnica de elipsometria [Gavrilyuk et al., 1990; Ohmori et al., 1991; Bonh e Walls, 1991].

CAPÍTULO 4

PROTEÍNAS GFI E INCORPORAÇÃO A SISTEMAS BIOMIMÉTICOS

4.1. Proteínas ancoradas a membranas por âncora de glicosilfosfatidilinositol

Proteínas ancoradas à membrana plasmática, via um fosfolipídio, são consideradas anfifílicas. Tais como os lipídios de membrana, elas possuem uma “cabeça” polar, ou seja, a cadeia polipeptídica, voltada para o meio aquoso extracelular, e uma “cauda” apolar, correspondente às cadeias alquílicas do fosfolipídio, enterradas na camada externa da membrana celular de células eucarióticas [Nosjean, 1998].

Em 1980 [Low e Zilversmit, 1980], sugeriu-se que as proteínas ancoradas possuem uma cadeia glicosídica entre o grupo carboxi-terminal da cadeia polipeptídica e o grupo fosfato do fosfolipídio enterrado na membrana, ou, mais precisamente, o resíduo de aminoácido carboxi-terminal estaria ligado ao fosfolipídio, via uma cadeia constituída de uma “ponte” de fosfoetanolamina e uma cadeia de glicana contendo manose, glucosamina e fosfatidilinositol (Figura 11).

A âncora, desde o resíduo de aminoácido carboxi-terminal até as cadeias de fosfolipídio enterrada na membrana, foi chamada de glicosilfosfatidilinositol (GFI), e as proteínas que tivessem essa estrutura, de proteínas ancoradas via GFI (ou, em inglês, *GPI-anchored proteins*), ou simplesmente, proteínas GFI (em inglês, *GPI-proteins*).

Figura 11: Esquema geral de uma proteína GFI mostrando a cadeias polipeptídica, glicana e alquílica.

Em 1997, havia cerca de 130 proteínas GFI conhecidas [Nosjean et al., 1997], encontradas em quase todos seres vivos, e em vários tipos de células. Entre essas proteínas destacam-se as fosfatases alcalinas, a acetilcolinesterase, a 5' nucleotidase e a anidrase carbônica. Essas proteínas estão localizadas em microdomínios celulares com alto grau de condensação em relação ao meio circundante, ou seja, uma fase líquido-cristalina em meio a uma fase líquido-ordenada. A fase cristalina seria constituída essencialmente por esfingolipídios e colesterol, o que proporciona ao domínio uma maior compactação. Essas

duas fases têm sido chamadas também de mais ordenadas e menos ordenadas [Dietrich et al., 2001].

Uma vez que tais domínios estão “flutuando” em meio à camada externa da membrana celular, eles foram primeiramente chamados de “jangadas” (*rafts*) [Simons e Ikonen, 1997]. Os autores propõem que, no plano da membrana, certos lipídios se agregam espontaneamente via diversas interações intermoleculares, incluindo interações de van der Waals entre as cadeias alquílicas dos esfingolipídios e o colesterol [Dietrich et al., 2001]. Além disso, estudos têm revelado que esses agregados são extremamente pequenos (com até 700nm de diâmetro) [Jacobson e Dietrich, 1999].

4.2. Fosfatase Alcalina

As fosfatases alcalinas formam uma família de proteínas, comum a todos os organismos vivos [Le Du e Millán, 2002]. Elas são diméricas, expressadas por diferentes genes no intestino, placenta, fígado, rim ou osso. Catalisam a hidrólise não específica de monoésteres de fosfato e requerem os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} para serem ativas [Ciancaglini et al., 1999].

A fosfatase alcalina de placenta humana teve sua estrutura recentemente elucidada [Le Du et al., 2001], e cada monômero possui 486 aminoácidos e uma âncora GPI. Além disso, a enzima possui estruturas β -folha no centro do monômero, envolvidas por estruturas α -hélice que estão orientadas na mesma direção. A massa molecular da proteína foi calculada em cerca de 130kDa, possuindo um formato tridimensional alongado. Foi

proposto recentemente [Rieu et al., 2002], que a estrutura da fosfatase alcalina de mamíferos pode ter sua estrutura simplificada, ou seja, ela pode ser considerada como um elipsóide com eixos medindo 100, 50 e 50Å² aproximadamente (Figura 12).

Figura 12: Esquema de uma proteína GFI em uma membrana biológica.

A fosfatase alcalina de placenta humana tem homologia na faixa de 70-90% em relação a outras fosfatases alcalinas de mamíferos, incluindo a de ossos [Hoylaerts et al., 1997, Le Du e Millán, 2002; Mornet et al., 2001].

Especificamente, a fosfatase alcalina de ossos tem um provável papel no processo de biomineralização com um mecanismo ainda desconhecido [Leone et al., 1997]. A fosfatase alcalina de osso de rato tem sido estudada, e sendo uma proteína GFI [Pizauro et al., 1994], o processo de extração e purificação da enzima pode levar a duas formas (Figura 13). A primeira, extraída e solubilizada por meio de um tensoativo não-iônico, o éter de

dodecil-polioxietileno (polidocanol, $C_{12}(EO)_9$, com massa molecular de 583Da) [Ciancaglini et al., 1990], mantém a âncora GFI intacta. A segunda é extraída da membrana, através de clivagem enzimática por fosfolipase-C [Pizauro et al., 1995], e possui as cadeias alquílicas do fosfolípido ausente (essas cadeias serão chamadas de âncora hidrofóbica). Nesse trabalho, a primeira forma será chamada de fosfatase alcalina solubilizada por tensoativo (FAT), e a segunda por fosfatase alcalina clivada por fosfolipase (FAC). Em meio homogêneo, FAT e FAC apresentam propriedades estruturais e catalíticas semelhantes [Leone et al., 1997], mostrando que a presença da âncora hidrofóbica não influencia tais propriedades.

Figura 13: Esquema para a obtenção das duas formas da fosfatase alcalina: solubilizada por detergente (ou tensoativo não-iônico) – FAT, e solubilizada através de clivagem com uma fosfolipase-C específica – FAC. O detergente usado foi o éter de dodecil-polioxietileno, , conhecido também como polidocanol ($C_{12}(EO)_9$).

4.3. Incorporação de fosfatase alcalina em sistemas modelo para biomembranas.

Vários trabalhos têm investigado a adsorção de fosfatases alcalinas e outras proteínas GFI em lipossomos e lipídios suportados [Agrand et al., 1997; Nosejan et al., 1999; Camolezi et al., 1999; Saslowsky et al., 2002; Milhiet et al., 2002, Camolezi et al., 2002, Ronzon et al., 2004], e eles têm focado a importância da âncora GFI na incorporação nesses sistemas. Em trabalhos recentes [Lehto e Sharom, 2002; Sharom e Lehto, 2002], interessante, mostra-se que a cadeia polipeptídica de uma proteína GFI está localizada muito próxima à superfície da membrana (10-14Å), devido, provavelmente, ao dobramento das cadeias glicanas da âncora GFI. A âncora hidrofóbica tem se mostrado importante na incorporação de proteínas GFI em lipossomos [Camolezi et al., 1999; Camolezi et al., 2002, Nosjean et al., 1999, Agrand et al., 1997, Ronzon et al., 2004], sem perda significativa da atividade catalítica da proteína [Camolezi et al., 1999; Nosjean et al., 1999, Lehto e Sharom, 2002].

A incorporação de fosfatase alcalina de placenta humana na interface ar/água foi estudada recentemente [Ronzon et al., 2002a; Ronzon et al., 2002b, Ronzon et al., 2002c]. Nesses trabalhos, mostrou-se que a enzima incorpora-se à interface ar/água na ausência ou presença do lipídio e independente do lipídio estudado. Nesse caso, a proteína não mudou significativamente sua estrutura secundária, mesmo a um alto estágio de empacotamento superficial.

A adsorção de fosfatases alcalinas em suportes sólidos [Petrigliano et al., 1996; Rieu et al., 2002; Milhiet et al., 2002; Rieu et al., 2004] tem sido investigada, mostrando

que a enzima perde parte de sua atividade catalítica [Petrigliano et al., 1996] e forma espontaneamente agregados [Rieu et al., 2002]. Também, tem-se mostrado que as proteínas GFI se inserem espontaneamente numa matriz sólida coberta por lipídios [Rieu et al., 2004; Milhiet et al., 2002], se particionando em agregados lipídicos mais condensados [Milhiet et al., 2002,].

Num trabalho recente, pelo nosso grupo [Caseli, 2001; Caseli et al., 2002], o efeito do tensoativo não iônico (polidocanol) presente na forma FAT foi estudado. Assim, a fosfatase alcalina foi adsorvida a partir da solução em filmes LB de DMPA. A isoterma de adsorção (Figura 14B), comparada com a curva de cinética de agregação do sistema misto polidocanol/FAT (Figura 14A) permitiu afirmar que o mecanismo de adsorção protéica depende da concentração de polidocanol em solução.

A concentração de polidocanol, correspondente ao máximo da curva 14B, era aproximadamente equivalente ao ponto na curva de tensão *versus* concentração correspondente a uma estabilização nos valores de tensão para uma certa faixa de variação na concentração de tensoativo. Isso correspondeu à agregação do tensoativo à macromolécula (proteína) em solução, cuja concentração onde ela começa a ocorrer é conhecida como concentração de agregação crítica (CAC). Assim, abaixo da concentração CAC, a fosfatase alcalina adsorve desordenadamente ao filme, formando multicamadas, atingindo um pico na CAC. No entanto, acima da CAC, a formação de agregados coloidais polidocanol/fosfatase alcalina aumenta a solubilidade em água da enzima, e a adsorção da fosfatase alcalina nos filmes LB de DMPA ocorre mais ordenadamente, com saturação da imobilização quando uma monocamada completa é formada.

Figura 14: (Acima) Curvas de tensão superficial x concentração de polidocanol (círculos) e para o sistema FAT/polidocanol (quadrados). (Abaixo) isoterma de adsorção de uma solução de fosfatase alcalina em função da concentração de polidocanol. O “pico” na isoterma de adsorção equivale à concentração de agregação crítica do polidocanol na presença proteína.

Estudos da atividade catalítica mostraram que a atividade por molécula de enzima é diminuída em casos extremos. Isso acontece ou quando ela está adsorvida em multicamadas (abaixo da CAC), ou quando ela atingiu a saturação máxima na formação da monocamada, estando com um empacotamento superficial máximo (patamar atingido após a CAC, em concentrações de polidocanol acima de 6,5µg/ml). Assim, uma maior atividade enzimática foi encontrada em concentrações de polidocanol na faixa 4,0-6,0µg/ml, ou seja, no regime de formação de monocamadas (acima da CAC), mas sem ter atingido ainda o grau de empacotamento máximo.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS E MOTIVAÇÃO

5.1. Objetivos gerais

O principal objetivo desse trabalho foi estudar comparativamente a adsorção das duas formas de fosfatase alcalina, extraídas de placa óssea de ratos, uma com a âncora GFI intacta (FAT) e outra sem a parte hidrofóbica dessa âncora (FAC), em dois tipos de sistemas-modelo para membranas celulares: monocamadas de Langmuir e Filmes LB de lipídios.

5.2. Objetivos específicos

As duas formas de enzima foram estudadas para que se fossem compreendidos os papéis da cadeia polipeptídica e da âncora GFI na adsorção da proteína aos filmes. Ainda não é claro o papel da âncora nas propriedades físico-químicas da fosfatase alcalina. Assim, esse trabalho objetivou, através de diversas técnicas, investigar diversos aspectos da proteína adsorvida ou imobilizada nos sistemas-modelo empregados, tais como atividade catalítica, densidade superficial, empacotamento lateral, elasticidade dilatacional, conformação, orientação e morfologia.

CAPÍTULO 6

MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Materiais utilizados

Todas as soluções foram preparadas usando água purificada pelo sistema Milli-Q[®] da Milli-Pore. Éter de dodecil-polioxietileno ($C_{12}(EO)_9$), ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), 2-amino-2-metil-propanol-1 (AMPOL) e p-nitrofenolfosfato (PNFF) foram adquiridos da Sigma. Clorofórmio, metanol, acetato de zinco, cloreto de cobalto foram comprados da Merck. Fosfatase alcalina solubilizada com tensoativo (FAT) foi obtida pelo procedimento descrito por Curti et al., [Curti et al., 1986], ao passo que fosfatase alcalina solubilizada pela clivagem da âncora GFI (FAC) foi obtida pelo procedimento relatado por Pizauro et al., [Pizauro et al., 1995]. Extração e purificação da fosfatase alcalina foi realizada pelo grupo do Prof. F.A. Leone e da Profa. R.P.M. Furriel (Departamento de Química –FFCLRP –USP), e cedida para nosso grupo. Todos os outros materiais utilizados foram da mais alta pureza disponível. DMPA foi escolhido como lipídio padrão para o trabalho não somente pela sua estrutura simples, mas também pela experiência do nosso grupo no estudo de monocamadas e filmes LB desse lipídio.

6.2. Preparação das monocamadas

As monocamadas de DMPA foram preparadas espalhando uma solução 1mmol.l^{-1} do lipídio dissolvido em clorofórmio/metanol (proporção 3:1 em volume) sobre uma

interface ar/tampão pH 7,5 (Tris HCl com 1mmol.l^{-1} de MgCl_2). O tampão estava ou contido numa cuba de Langmuir revestida em teflon, ou numa recipiente circular de vidro. Diversas cubas foram usadas, de acordo com a técnica utilizada para caracterizar a monocamada. Elas serão descritas nos itens subseqüentes. Após espalhamento, de 10 a 15 minutos eram esperados antes da inserção da proteína e/ou caracterização da monocamada.

6.3. Adsorção à Interface líquido/ar e medidas de elasticidade

As duas formas enzimáticas (FAT e FAC) foram adsorvidas na interface líquido/ar. Para isso, injetaram-se alíquotas da proteína em cubetas de vidro de 8ml e área aproximada de $5,0\text{cm}^2$. Após isso, esperou-se que a tensão superficial de equilíbrio fosse atingida. As medidas de tensão superficiais foram feitas por um tensiômetro KSV (modelo Sigma 70), através de uma placa de platina rugosa interceptando a interface (método de Wilhelmy).

A tensão superficial dinâmica e a elasticidade superficial foram determinadas usando o mesmo aparelho: um tensiômetro dinâmico pelo método do formato da gota (OCA-20 da Dataphysics- Alemanha). A imagem de uma gota do líquido, suspensa a partir de uma seringa dentro de uma cubeta de vidro óptico, termostatizada, contendo água para evitar evaporação da gota, é gravada usando uma câmera CCD. A gravação é feita usando um sistema de engatilhamento (Figura 15). O tempo é definido imediatamente após a formação completa da gota. A tensão superficial é determinada primeiramente digitalizando e analisando o perfil da gota. Os dados obtidos a partir do formato da gota são adequados à equação de Young-Laplace: $\Delta P = (\rho_d - \rho_l) g h = (\gamma/R_1) + (\gamma/R_2)$, onde ΔP é a diferença de pressão na interface, $\rho_d - \rho_l$ são as densidades das fases mais densa e menos densa

respectivamente, g é a aceleração da gravidade, h é a altura da coluna líquida na gota, e R_1 + R_2 os dois principais raios de curvatura.

Figura 15: Esquema para a formação da gota. A tensão superficial começa a ser medida após a gota, durante sua formação, passar pela linha de engatilhamento.

O programa de computador também calcula dois parâmetros básicos da gota: área e volume. Para evitar mudanças drásticas na tensão superficial durante os experimentos, as medidas de elasticidade começam assim que a tensão superficial torna-se estável após a formação da gota. Um piezo é conectado sobre a agulha que suspende a gota, e um gerador de função produz um movimento senoidal da gota numa frequência especificada. Para as medidas de elasticidade, as imagens são repetidamente registradas com a videocâmera a um mínimo de 200 fotos por segundo. Ao final do experimento, o programa retorna as imagens gravadas e calcula as alterações na área e as respectivas mudanças na tensão superficial

para cada ciclo. Usando uma transformada de Fourier, a elasticidade e o atraso de fase entre a área e a tensão superficial são determinados.

Para os experimentos, medidas de elasticidade e tensão superficial de soluções aquosas do tensoativo não iônico (polidocanol), FAT e FAC foram feitas no tampão pH 7,5 acima, já especificado. As gotas formadas tinham volume aproximado de 40 μ l. Diversas amplitudes e frequências foram testadas, e a amplitude de 0.1mm e a frequência de 0,841Hz foram escolhidas para comparar os diferentes sistemas estudados. Antes do procedimento para oscilação da gota, como já dito acima, esperou-se que a tensão superficial fosse estabilizada após a formação completa da gota. Para isso, curvas relacionando tensão superficial *versus* tempo foram previamente obtidas e tidas como “cinéticas de adsorção na superfície da gota”. Todos os experimentos foram realizados a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.4. Preparação e caracterização das monocamadas de fosfatase alcalina pura e mista com lipídios

As monocamadas de Langmuir da fosfatase alcalina (FAT e FAC) foram estudadas espalhando-se alíquotas de suas soluções em tampão com 5mmol.l⁻¹Tris-HCl, pH 7,5, contendo 2mmol.l⁻¹ de MgCl₂. Em alguns casos, que serão especificados mais à frente, nesta tese, KCl 0,4mol.l⁻¹ foi usado para garantir a permanência da enzima na interface e portanto, impedir sua solubilização na subfase.

Para a incorporação da forma FAT às monocamadas de DMPA, três métodos foram testados: (1) espalhando a enzima antes do lipídio sobre a interface, (2) espalhando a enzima sobre a interface com a monocamada lipídica já formada e (3) injetando a enzima sob a monocamada lipídica já formada e aguardando que a pressão de superfície se estabilizasse. A última condição foi escolhida como padrão para todas as demais medidas, uma vez que ela permitiu maior miscibilidade da proteína na monocamada. Nessa condição, também foi possível a transferência da proteína para suportes sólidos. A forma FAT foi incorporada à interface pelo método da diluição do tensoativo para concentrações abaixo da CAC do sistema proteína/tensoativo [Dietrich et al., 2001b, Caseli et al., 2002]. A forma FAC, totalmente solúvel, foi injetada dentro da subfase suporte a poucos milímetros da interface líquido/ar (equivalente ao método 3, para a FAT).

Assim, para as monocamadas mistas de DMPA/enzima, soluções de DMPA em clorofórmio foram espalhadas, seguidas pelo espalhamento da solução com enzima no intuito de se proporcionar a relação de lipídio/enzima desejada. Antes de qualquer medida, esperava-se que a tensão superficial se estabilizasse para permitir a adsorção da proteína, difusão lateral da proteína e do lipídio, e a evaporação do solvente.

Dessa forma, a incorporação de ambas as formas da enzima às interfaces foi caracterizada por medidas de *tensão superficial* (Tensiômetro KSV-Sigma modelo 701), *potencial de superfície* (Am^{241} , eletrodo de calomelano saturado e eletrômetro Keithley confinado a uma gaiola de Faraday), *microscopia de fluorescência* (Olympus B-max) e *microscopia no ângulo de Brewster* (mini-BAM NFT - Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba, na Argentina, através da colaboração com o Professor Bruno Maggio). A compressão da

interface foi feita por uma barreira móvel de modo a se ensaiar várias pressões de superfície.

Para as medidas de tensão superficial com diferentes concentrações de enzima, uma cubeta de vidro (8ml e área de $5,0\text{cm}^2$) foi usada. Para as medidas de cinética de adsorção da enzima (pressão e potencial de superfície), uma cuba com capacidade aproximada de 650ml e área de $459,4\text{cm}^2$ foi usada. A pressão superficial foi medida usando uma placa feita de papel de filtro (1,1cm de largura; 1,5cm de comprimento) conectada a uma microbalança Cahn C-32. Para as medidas de microscopia de fluorescência, uma cuba de capacidade máxima de 40ml e área de $54,5\text{cm}^2$ foi utilizada, e para as medidas para microscopia no ângulo de Brewster, a cuba utilizada tinha volume de 70ml e área de $115,0\text{cm}^2$.

Para as medidas de espectroscopia no UV-vis na interface ar/água, uma cuba KSV 2000 (área de $350,5\text{cm}^2$ e volume de 200ml) foi acoplada a um espectrofotômetro (Hewlett-Packard). O feixe incidia abaixo da cuba, atingia a subfase através de uma janela de quartzo localizada no fundo da cuba, atravessava verticalmente a subfase e a interface ar/água, e finalmente atingia o detector, localizado logo acima da interface. Esses experimentos foram feitos na Universidade de Miami (University of Miami, Coral Gables, Flórida, Estados Unidos), com colaboração com o professor Roger M. Leblanc

Espectros de absorção-reflexão na região do infravermelho foram obtidos usando um aparelho Bruker IFS66, acoplado a uma cuba de Langmuir (Kibron Inc, Finlândia, 00171, área de $115,0\text{cm}^2$ e volume de 20ml) saturada num ambiente com gás nitrogênio. Diversas pressões de superfície foram investigadas com a barreira parada a uma pressão de superfície estável (diminuição de menos que 1mN/m) durante a obtenção dos espectros. Os espectros na região do UV-vis e os de absorção-reflexão na região do IV foram obtidos na

Universidade de Miami (University of Miami, Coral Gables, Flórida, Estados Unidos), com colaboração com o professor Roger M. Leblanc.

6.5 Preparação dos filmes LB

Filmes LB mistos de FAT e DMPA foram preparados por dois diferentes procedimentos. O primeiro transferindo diretamente a monocamada mista DMPA/FAT, após um ciclo de compressão e expansão, a um filme LB pré-preparado com três camadas de DMPA (este com final hidrofóbico), e o segundo imergindo o filme LB pré-preparado com três camadas de DMPA em uma solução à parte, que continha a proteína (método chamado aqui de recobrimento por imersão).

Filmes LB mistos de FAC e DMPA foram preparados imergindo um filme LB pré-preparado com quatro camadas de DMPA (final hidrofílico) numa solução da proteína. Devido à alta solubilidade da forma FAC na subfase suporte da monocamada mista, não foi possível transferi-la para suportes sólidos a partir da monocamada. Em todos os casos, a pressão de superfície de deposição das monocamadas lipídicas foi mantida em $30 \pm 0,5 \text{ mN/m}$. Como suportes sólidos, foram usados, dependendo da técnica usada para caracterização, placas de vidro, de silício (ambas limpas pelo método RCR [Kern, 1990]) ou microcristais de quartzo recobertos com ouro. A limpeza dos microcristais foi feita através de gotejamento de uma solução de clorofórmio:metanol (3:1), seguido por sonicação em etanol por cinco minutos, e gotejamento com tolueno.

6.6 Caracterização dos filmes LB

A presença da proteína adsorvida aos filmes LB foi identificada por refletância na região do *infravermelho* usando a técnica de refletância total atenuada na superfície – ATR – (ABM Bomem – modelo MB102, Laboratório de Fotoquímica Inorgânica – Professor Elia Tfouni – FFCLRP - USP); a densidade superficial protéica foi obtida por uma *microbalança a cristal de quartzo* (freqüencímetro MF-modelo 6120); a morfologia dos filmes foi caracterizada por *microscopia de força atômica* (Multimode Scanning Probe Digital Instruments – modelo MMAFM-2 – Laboratório de Cerâmica – Departamento de Química - UFSCar); e a espessura do filme foi determinada por elipsometria (elipsômetro DRE-ELX02C- $\lambda=632,80\text{nm}$, ângulo de incidência= 70° – Laboratório Professora Denise F.S. Petri – IQ – USP).

6.7. Medidas de atividade enzimática

Em ambos os casos (na monocamada e no filme LB), a atividade catalítica da enzima em meio homogêneo era obtida simultaneamente com a atividade em meio heterogêneo.

6.7.1. Na monocamada

A atividade catalítica da fosfatase alcalina (forma FAT) em monocamadas mistas foi determinada injetando PNFF na subfase e seguindo sua hidrólise por absorbância

continua a 410nm. Para isso, usou-se uma fibra ótica tendo em sua extremidade uma ponta capaz de amostrar pequenas quantidades da solução (em torno de 2 μ l). Esse dispositivo é acoplado a um espectrofotômetro UV-visível (Spectropette –WPI). Diversas pressões de superfície foram ensaiadas, por compressão da monocamada mista. Esses experimentos foram realizados no Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba, na Argentina, através da colaboração com o Professor Bruno Maggio. A cuba usada foi a mesma utilizada para a microscopia no ângulo de Brewster.

Para averiguar se a atividade era devido à enzima presente na interface ou na subfase, um experimento controle foi realizado. A cuba tinha três compartimentos, que serão chamados aqui de central e laterais. Após o espalhamento do lipídio e da enzima, duas barreiras móveis comprimiam a monocamada mista de modo a confiná-la no compartimento central. A comunicação da interface entre os compartimentos era através de pequenas fendas localizadas acima da parede de separação dos compartimentos. Essas fendas eram rasas, de tal forma que a “comunicação” entre as subfases dos compartimentos podia ser considerada negligenciável. Assim, a absorbância em 410nm era medida em amostras dos três compartimentos. A absorbância nos compartimentos laterais foi atribuída à atividade da enzima dissolvida na subfase, e a absorbância no compartimento central, atribuída a absorbância da enzima adsorvida na monocamada lipídica.

6.7.2. Nos filmes LB

A atividade catalítica da fosfatase alcalina (formas FAT e FAC) em filmes LB mistos de fosfolipídio e proteína foi determinada inserindo a placa diagonalmente numa cubeta que continha o substrato PNFF, cuja hidrólise foi seguida por absorbância contínua a 410nm num espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu – modelo UV-2401PC). O valor total é obtido pela inclinação dos gráficos de absorbância em função do tempo.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

INCORPORAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA EM INTERFACES

AR/ÁGUA

7.1. Cinéticas de adsorção

Para investigar o efeito da difusão das formas FAT e FAC nos processos de adsorção, curvas de tensão superficial dinâmica de soluções de proteína (Figura 16 e 17) foram obtidas usando a técnica da gota pendente e análise de seu formato eixo-simétrico. Para investigar as curvas de cinética de adsorção em tempos curtos, a cinética é lançada em termos de $\log$ (tempo) no encarte da Figura 16. Para concentrações de FAC de $50\mu\text{g/l}$, a tensão superficial torna-se estável depois de aproximadamente 6 horas. A estabilização é mais rápida para soluções de enzima mais concentradas. O encarte mostrando tempos curtos revela um certo tempo de indução (tempo necessário para ter-se uma variação perceptível –em torno de 1mN/m - na tensão superficial). Por exemplo: para uma concentração de $250\mu\text{g/l}$ ($4,28 \times 10^{-7}\text{mol/l}$), esse tempo é de cerca de 8min. Esses tempos são comparáveis com aquele calculado ($\log t(\text{s})=3-3,5$) para uma solução de proteína modelo a 10^{-8}mol/l , usando um modelo teórico [Miller et al., 2001]. Nesse modelo, a cinética de adsorção de proteínas globulares em interfaces ar/água depende da capacidade dessas moléculas em ocupar uma camada interfacial em múltiplos estados, diferenciando um do outro em área molar parcial.

Figura 16: Cinética de adsorção para FAC na interface ar/água. Concentrações ($\mu\text{g/l}$): ■ 50, ● 100, ▲ 200, ▼ 250. O encarte mostra a adsorção do sistema com a mais alta (250 $\mu\text{g/l}$) □, e a mais baixa concentrações (50 $\mu\text{g/l}$) ○, colocadas em função de $\log(\text{tempo})$.

Figura 17: Cinética de adsorção da forma FAT na interface ar/água. (A) tempos longos. Concentrações no encarte são dadas em função de $C_{12}(EO)_9$. Concentrações em função da enzima são: ■ 5 μ g/l , ● 50 μ g/l , ▲ 125 μ g/l , ▼ 400 μ g/l , ◆ 3200 μ g/l. (B) Tempos curtos. Concentrações de enzima: □ 5 μ g/l, △ 3200 μ g/l.

Para a forma ancorada, FAT, o sistema é sempre misto devido à presença do tensoativo não-iônico, $C_{12}(EO)_9$. A relação enzima/tensoativo em solução é 0,04% (em mol). Na Figura 17A, pode-se observar que para concentrações de enzima de $5 \mu\text{g/l}$ ($C_{12}E_9$ $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l), o sistema leva mais que 15 minutos para se tornar estável. Acima da concentração de agregação crítica (CAC) do sistema ($3,6 \times 10^{-6}$ mol/l de $C_{12}E_9$ para $180 \mu\text{g/l}$ da enzima [Caseli et al., 2002], a tensão superficial constante de cerca de $52,5 \text{ mN/m}$ é alcançada em menos que 5 minutos.

A mais rápida adsorção de FAT comparada a FAC é devido às cadeias hidrofóbicas da âncora GFI, ausentes para a segunda forma enzimática e presentes para a primeira. A âncora proporciona à proteína um caráter anfifílico, que é responsável pela menor concentração necessária para diminuir a tensão superficial, e também pela sua habilidade em produzir monocamadas de Langmuir em interfaces ar/água para concentrações de $C_{12}(EO)_9$ abaixo da CAC. Para a forma FAC, em concentrações em torno de $5 \mu\text{g/l}$, após 12h, não se observou diminuição considerável da tensão superficial da água (em torno de 73 mN/m). Assim, devido à presença da âncora GFI, uma maior concentração de FAC é requerida para detectar variações de tensão superficial significativas. Uma vez que FAC é altamente hidrofílica, não é improvável que uma certa desnaturação devido à exposição dos grupos hidrofóbicos ocorra devido a sua adsorção na interface ar/líquido.

A Figura 17B mostra a cinética da forma FAT em tempos curtos (menores que 30s). Para concentrações mais altas de enzima ($3200 \mu\text{g/l}$), logo após a formação da gota, a tensão superficial cai rapidamente até cerca de 48 mN/m . Para a concentração de FAT mais baixa ($5 \mu\text{g/l}$), a tensão superficial inicialmente cai até 64 mN/m , aumenta em seguida mais suavemente até 72 mN/m , e, após isso, diminui lentamente até pressões superficiais

fora da escala do experimento (mais que 30s). Esse último comportamento é atribuído a um mecanismo de adsorção de três passos: (i) rápida difusão e adsorção induzida pela parte hidrofóbica das âncoras GFI, (ii) rearranjo das moléculas de proteína na interface ar/água posicionando a âncora GFI perpendicularmente em relação ao plano da interface e a cadeia polipeptídica voltada para o interior da solução, e (iii) difusão e adsorção das moléculas de proteína remanescentes no interior da solução. No entanto, como o sistema é misto (enzima + tensoativo), uma competição entre a adsorção do polidocanol e da proteína-GFI também pode ocorrer.

No intuito de se investigar a influência do tensoativo não-iônico no sistema misto FAT-tensoativo, as cinéticas de adsorção para o tensoativo puro foram obtidas e são mostradas na Figura 18A. Sendo um tensoativo solúvel, os tempos de estabilização são maiores do que aqueles obtidos para o sistema misto, no qual a enzima insolúvel em água está presente. A concentração micelar crítica (CMC) de $3,1 \times 10^{-5}$ mol/l a uma tensão superficial de 30mN/m foi obtida dados prévios [Caseli, 2001; Caseli et al., 2002], e está na mesma ordem de grandeza para a CMC obtida para polidocanol a 25°C em água [Ciancaglini, 1989].

Para concentrações de cerca de $1,0 \times 10^{-7}$ mol/l, o sistema leva mais que 2 horas para se tornar estável, enquanto para soluções mais concentradas, o tempo é diminuído para menos que 5 minutos. Esses dados são similares àqueles obtidos para $C_{10}(EO)_5$ [Ravera et al., 2000]. A Figura 18B mostra a cinética de adsorção em tempos curtos, e nenhum efeito similar ao que ocorreu para FAT é observado.

Para a concentração mais baixa de FAT (5µg/l), onde se observou o comportamento cinético peculiar (rápida queda da tensão superficial seguida pelo aumento

mais gradual da tensão), a concentração de polidocanol equivale a $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l, e a tensão caiu a 67mN/m em 30 segundos, mas nenhum mínimo é observado. Isso sugere que o efeito principal do comportamento observado na Figura 17B é devido à âncora GFI.

Figura 18: Cinética de adsorção de $C_{12}(EO)_9$ (polidocanol) na interface ar/água. (A) Tempos longos. Concentrações de tensoativo são dadas no encarte. (B) Tempos Curtos. Concentrações: $\square$ 1.10^{-7} mol/l, $\triangle$ 3.15×10^{-4} mol/l.

7.2. Medidas de viscoelasticidade (Reologia superficial)

A Figura 19 mostra um exemplo da variação da tensão superficial em resposta à deformação da área interfacial. Nesse exemplo, o ângulo de fase é praticamente zero, o que significa que a interface tem um comportamento perfeitamente elástico. Um desvio de zero corresponde a efeitos viscoelásticos [Ting et al., 1985], não observado de fato para todas as frequências analisadas. Portanto, a componente elástica foi dominante.

Figura 19: Dados brutos para oscilações senoidais para área e tensão superficial usados para determinar a elasticidade dilatacional de uma solução de FAT 50 μ g/l . A frequência aplicada para variação de área é 0.841Hz e amplitude 0,1mm. Observa-se que não há diferença de fase entre a variação de área e tensão superficial.

Como o módulo de elasticidade depende da frequência, este parâmetro foi variado de 0,01 a 1,0Hz. No limite superior, as condições ideais para determinar a elasticidade não foram encontradas, isto é, as curvas senoidais para a variação em tensão superficial não foram observadas (a não ser para o sistema misto tensoativo-enzima). Essa faixa de frequência estudada corresponde aos tempos de relaxação característicos para diferentes proteínas [Krause et al., 1998]. A frequência escolhida para comparação nesse estudo foi 0,841Hz, e amplitude de deformação foi de 0,1mm. Essa amplitude é pequena o suficiente para evitar o destacamento da gota da seringa e para não causar problemas de difusão no interior da gota.

O módulo de elasticidade para a forma FAT aumenta com a concentração (Figura 20) e alcança um máximo na concentração de agregação crítica do sistema. A elasticidade para o tensoativo é mostrada no mesmo gráfico para comparação. Enquanto a elasticidade do tensoativo diminui continuamente com a concentração, a elasticidade da forma FAT alcança um máximo na CAC. De acordo com alguns autores [Miller et al., 2000], misturas de proteínas com tensoativos não-iônicos comportam-se de uma maneira especial, na qual, há uma adsorção competitiva entre as espécies constituintes. No caso aqui apresentado, tem-se um sistema peculiar porque a proteína, devido à presença da âncora GFI, é solúvel em água somente com a inserção do tensoativo não iônico, e, portanto, a adsorção da proteína depende da quantidade de $C_{12}(EO)_9$ presente em solução. Como podemos ver na Figura 13 e 20, a CAC representa um limite na elasticidade, no qual, para compressões subsequentes, ela é reduzida. Tal fato significa que a solubilização da proteína ancorada por GFI torna a interface ar/água menos resistente ao gradiente de tensão superficial devido a efeitos difusivos na interface. A partir da CAC, tanto para o sistema misto, quanto para o

sistema com polidocanol sem a proteína, têm-se valores aproximadamente próximos (variando no máximo 15%, para uma concentração de polidocanol de $3,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$). Isso indica um maior efeito do polidocanol presente na interface e conseqüente solubilização da proteína.

Figura 20: Efeito da concentração sobre a elasticidade. O máximo da curva para FAT corresponde à CAC (concentração de agregação crítica para o sistema FAT- $C_{12}(EO)_9$).

No intuito de comparar a elasticidade dilatacional dinâmica da monocamada de FAT na superfície da gota com o módulo de compressibilidade na interface plana, isotermas de pressão de superfície-área foram obtidas (Figura 21). Em pressões selecionadas, os módulos de compressibilidade, tomados como $d\pi/d\ln A$, sendo π e A respectivamente a pressão de superfície e a área superficial da monocamada, são mostrados no gráfico. A Tabela 1 compara a elasticidade superficial da gota com o módulo de compressibilidade superficial planar. Nela, observa-se que os valores nas mesmas pressões não diferem mais que 10% um do outro. Em 19,9mN/m, pode-se observar a maior diferença entre os valores obtidos nas interfaces planar e curva. Em pressões superficiais acima de 20mN/m, os valores não podem ser comparados devido ao fato que os fenômenos que ocorrem nos dois sistemas são diferentes. Na superfície planar, a monocamada atingiu o “colapso”, e devido ao alto volume da subfase (cerca de 40ml), a concentração volumétrica do sistema misto enzima-tensoativo é ainda abaixo da CAC, e por isso, a enzima não pode ser solubilizada. No colapso, há o rearranjo na interface ar/água, no qual, mudanças conformacionais e formação de bi ou policamadas podem ocorrer. Por outro lado, na gota, a tensão superficial de 20mN/m é atingida devido às concentrações crescentes do sistema enzima-tensoativo e não devido à compressão como no caso da interface plana. Assim, na superfície da gota, a tensão superficial de 20mN/m ocorre quando a CAC é atingida, e assim, moléculas “adicionais” podem ser deslocadas da interface para o interior da solução (subfase), ou do interior da solução para a interface, durante a expansão e compressão da área da gota.

Figura 21: Isoterma de compressão-área para monocamadas de FAT na interface planar ar/água. A área é designada para superfície total da cuba. Velocidade de compressão: $6.73\text{mm}^2/\text{s}$

Tabela 1: Elasticidade superficial da gota (ϵ) e módulo de compressibilidade planar (C_s^{-1}) para monocamadas de FAT.

π (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)	ϵ (mN/m)
7.1	13.56	14.38
8.8	17.20	17.68
14.6	20.12	19.19
19.9	25.10	22.66

A elasticidade da forma FAC (Figura 22) foi também obtida, e na escala estudada, ela diminui continuamente mostrando um decaimento mais pronunciado a partir de 10^{-2} $\mu\text{g/l}$. Esses valores de elasticidade superficial (entre 10 e 14,5mN/m para a frequência estudada) são inferiores àqueles obtidos com outras proteínas globulares e hidrofílicas já reportadas na literatura. As curvas de tensão superficial dinâmica e a elasticidade interfacial para proteínas padrão com baixa massa molecular, tais como BSA, HSA, beta-caseína e beta-lactoglobulina foram medidas usando várias técnicas [Miller, 1991; González e MacRitchie, 1970]. Por exemplo, beta-lactoglobulina, uma proteína com peso molecular de 18400Da, mostra, a uma concentração de aproximadamente 1×10^{-7} mol/l, uma elasticidade de 26,04mN/m numa frequência de 0,0125Hz [Fainerman et al., 2001]. A compressibilidade para monocamadas de FAC em interfaces planares não foram obtidas devido à alta solubilidade da enzima e também devido ao volume da cuba empregada (cerca de 40ml). A difusão da enzima à interface através do tampão empregado é bastante lenta.

Além disso, a forma FAC exhibe valores baixos de elasticidade comparados com aqueles para FAT. Uma vez que a elasticidade dilatacional indica a habilidade da interface em restaurar a densidade original do tensoativo proporcionando um gradiente de concentração, a enzima ancorada via GFI é hábil para resistir a mudanças na área muito mais eficientemente que a forma enzimática cuja parte hidrofóbica da âncora GFI está ausente. Tal fato pode estar também associado a uma melhor capacidade em estabilizar filmes [Benjamins et al, 1996]. Além disso, a elasticidade para ambas proteínas deve estar associada ao movimento reversível de segmentos de proteína [Graham e Phillips, 1980], contudo, como a forma FAT contém uma âncora hidrofóbica, acredita-se que os efeitos da

elasticidade sobre ela correspondem à capacidade da âncora em ser adsorvida em interfaces ar/água de tal maneira que poucas moléculas de enzima estariam presentes no interior da solução – o que preveniria a adsorção a partir do interior da solução após o gradiente de área. A forma FAC, sendo altamente hidrofílica, tem sua atividade superficial, durante a oscilação da gota, controlada principalmente por processos de dessorção e difusão, como estabelecido por dados já relatados par outras enzimas hidrofílicas [Miller et al., 2000].

Figura 22: Efeito da concentração na elasticidade de filmes de FAC.

Os efeitos dilatacionais para ambas formas de enzima estão associados com diferentes mudanças de orientação e conformação na interface ar/água. A fosfatase alcalina, por ter um formato elipsoidal cuja orientação em interfaces (eixo principal paralelo ou perpendicular à interface) é fortemente influenciada pela presença ou não da âncora hidrofóbica. Assim, a maior ou menor capacidade das moléculas de enzima em se empacotar em interfaces, assim como a solvatação da proteína [Benjamins et al., 1996, Murray et al. 1998, Cornec e Narsimhan, 1998], levam a diferentes velocidades de ajuste do estado estacionário. Nesse caso, para reconstruir a estrutura interfacial com alta estabilidade mecânica, as mudanças de conformação e orientação não devem ser altamente restritas, e interações hidrofóbicas de algumas partes da cadeia polipeptídica da fosfatase alcalina podem influenciar nesse processo. No caso presente, a presença de um fosfolipídio covalente ligado à proteína faz com que a fosfatase alcalina tenha propriedades extremamente peculiares, na qual a âncora GFI controla o processo de adsorção, orientação e empacotamento, e além disso, como já estabelecido no trabalho presente, a âncora também influencia nas propriedades de elasticidade superficial.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

MONOCAMADAS MISTAS DE FOSFATASE ALCALINA E FOSFOLIPÍDIO

8.1. Adsorção da fosfatase alcalina nas monocamadas fosfolipídicas a partir da subfase

8.1.1. Cinéticas de adsorção: pressão de superfície

A Figura 23 mostra a cinética de adsorção da forma FAT ($3,5\mu\text{g/l}$) na interface ar/água sem a presença da monocamada, de onde se observa que, em menos de 10 minutos, a pressão superficial de equilíbrio é praticamente atingida. Esse tempo difere um pouco daquele obtido para a gota a uma concentração similar ($5\mu\text{g/l}$), onde 15 minutos foram necessários para atingir o equilíbrio. Essa diferença deve-se ao método aplicado. Para a gota, uma solução da proteína é injetada através de uma seringa até se formar uma gota suspensa dessa solução. Uma vez criada a gota da solução protéica, cria-se uma nova superfície, e a tensão superficial passa a ser monitorada com o tempo. Por efeito difusivo, moléculas de água atingirão a nova superfície formada mais rapidamente que as moléculas de proteína, e, portanto, a tensão superficial no tempo zero será igual ao da água. A partir do momento que as moléculas de proteína atingem a superfície, a tensão superficial poderá começar progressivamente a diminuir. No caso de uma cuba de Langmuir, em vez de uma gota com formato quase esférico (com a interface ar/água preenchendo todos os lados,

exceto ao lado em contato com a agulha da seringa), tem-se um compartimento paralelepipedal preenchido com água, onde a interface ar/água estará presente somente na parte superior desse paralelepípedo. Uma solução da proteína é injetada logo abaixo da interface a poucos milímetros dela. A difusão em direção à interface provocará a queda na tensão (ou aumento na pressão de superfície). Portanto, nesse caso, haverá uma diluição da proteína na cuba para atingir-se a concentração desejada à medida que a interface envelhece. Para a gota, a solução, já com a concentração protéica desejada, será injetada na seringa para se formar a gota.

Figura 23: Curva de adsorção da forma FAT (3,5 µg/l) em interfaces ar/água.

Resumindo, para as cinéticas de adsorção na cuba, os efeitos de difusão no interior da solução não poderiam ser desprezados, enquanto que para a adsorção na gota, somente a difusão a partir de uma subcamada (Ward e Tordai, 1946) para a superfície é importante. Porém, existe uma particularidade com relação à adsorção de uma proteína GFI, solubilizada por tensoativo não-iônico. A diluição da enzima no volume líquido da cuba pode levar, e no caso de fato leva, a uma concentração abaixo da CAC. Isso implica na sua insolubilização.

A Figura 24 mostra a cinética de adsorção da forma FAT em monocamadas de DMPA mantidas em diferentes pressões de superfície. A partir de 20mN/m há uma alteração no padrão dos perfis das curvas, ou seja, há um aumento brusco da pressão, seguido por um decaimento lento da pressão de superfície até que se atinja uma pressão próxima do equilíbrio.

Figura 24: Efeito do DMPA nas cinéticas de adsorção de FAT (3,5µg/l). (■) 0mN/m, (●) 4,5mN/m, (▼) 10mN/m, (◆) 15mN/m, (+) 20mN/m, (X) 25mN/m, (▲) 30mN/m.

O aumento inicial observado pode ser atribuído à rápida adsorção da âncora GFI promovida pela alta densidade de DMPA na interface. O decaimento posterior ocorre provavelmente devido à acomodação da cadeia polipeptídica da forma FAT junto às cabeças hidrofílicas do DMPA. Esses dados sugerem que conforme a pressão de superfície inicial é gradualmente aumentada de 0 a 20mN/m, a adsorção da forma FAT é aparentemente facilitada pelo fato de que as cadeias de fosfolípídio estejam mais empacotadas e conseqüentemente mais orientadas. A pressão de 20mN/m, onde o perfil das curvas de cinética se altera, é chamada por alguns autores [Ronzon et al., 2002b] de pressão

superficial de exclusão, e ela é interpretada como uma consequência da condensação da monocamada, o que impede a penetração, ou então causa a expulsão da enzima da interface. Por outro lado, foi reportado [Ronzon et al., 2002b; Ronzon et al., 2002c; também nessa tese: item 8.2.5] que monocamadas mistas de fosfolipídios e fosfatase alcalina a uma pressão de superfície de 30mN/m exibem um sinal de amida no espectro na região de infravermelho mais intenso que o observado a pressões de superfície menores. Esse fato confirma a presença da proteína na interface ar/água mesmo a altas pressões de superfície, e também descarta a possibilidade de sua expulsão total da interface.

Assumindo então que a forma FAT não seja expulsa da interface, o rápido aumento da pressão seguido pela queda suave até se atingir a pressão de equilíbrio deve ser atribuído ao mecanismo de adsorção da enzima. Aparentemente esse mecanismo deve envolver a adsorção da fosfatase alcalina através da cadeia polipeptídica e/ou através da âncora hidrofóbica, dependendo do empacotamento do fosfolipídio. A penetração da enzima na monocamada de DMPA ocorre em todos os casos, mas a âncora hidrofóbica direciona a enzima na interface ar/água. Abaixo de 20mN/m, a orientação da cadeia polipeptídica ocorre aleatoriamente, e a enzima aparentemente expõe alguns resíduos na interface. Conforme a monocamada de DMPA torna-se mais empacotada, a adsorção através da cadeia polipeptídica é improvável, ocorrendo então via penetração da âncora hidrofóbica dentro da monocamada densa. Esse fato é consistente com o rápido aumento na pressão de superfície, uma vez que a âncora leva consigo a cadeia polipeptídica. Além disso, devido ao grande volume da enzima, a monocamada torna-se instantaneamente mais condensada.

Um outro fato que provavelmente explique a modificação dos perfis das curvas (Figura 24) seria a formação de domínios na interface logo depois que a proteína é injetada na subfase. Levando em conta o fato de que os experimentos foram feitos sob injeção da

proteína numa região aproximadamente dois milímetros abaixo da interface, é provável que a forma FAT alcance a superfície mais rapidamente que a sua capacidade em se difundir através do plano lateral da subfase. Devido à presença da âncora, a penetração da proteína na interface é favorável, e ela pode instantaneamente forçar a compressão da monocamada agindo, portanto, como um “pistão”. Tal fato deve proporcionar o aumento rápido da pressão de superfície nas curvas de cinética. Dessa forma, a subsequente diminuição da pressão pode ser atribuída ao efeito de relaxação, ao qual as moléculas de proteína se difundem e reorganizam-se na interface entre as moléculas de DMPA.

A Figura 25 relaciona a variação de pressão superficial ($\Delta\pi$) devido à adsorção da forma FAT a várias pressões superficiais iniciais. Segundo Maget-Dana [Maget-Dana, 1999], a alta compactação da monocamada desfavorece a extensão da adsorção, e, quanto maior a pressão de superfície inicial, menor a quantidade de proteína que será incorporada na monocamada. Assim, o gráfico $\Delta\pi$ *versus* pressão inicial será uma reta decrescente, e com a extrapolação dessa reta a uma pressão de superfície igual a zero, seria obtida a chamada “pressão superficial de exclusão”, na qual a proteína não penetraria efetivamente na monocamada. De fato, isso é válido para proteínas altamente solúveis em água, mas com alguma atividade superficial. Com efeito, para a forma FAT, observou-se uma descontinuidade a 20mN/m. Tomando em conta baixas pressões superficiais, a pressão superficial de exclusão seria igual a 20mN/m. No entanto, acima de 20mN/m, em vista da hidrofobicidade da forma enzimática devido à presença da âncora hidrofóbica, a adsorção ainda ocorre. No entanto, em razão da alta compactação que a monocamada se encontra, o mecanismo de adsorção ocorrerá de maneira diferente como se discutiu anteriormente. Assim, acima de 20mN/m, uma nova reta para se determinar a pressão superficial de

exclusão pode ser traçada, e uma pressão de “exclusão” de 30mN/m é encontrada. Isso não significa que a proteína não é mais hábil em penetrar no filme lipídico, mas, devido ao alto estado de compactação, as moléculas de proteína estarão mais ordenadas na interface, e uma pequena extensão da cadeia polipeptídica estará, de fato, penetrada entre as cadeias alquílicas do DMPA. Ao contrário, estará voltada para a subfase, e a âncora hidrofóbica estará enterrada entre as cadeias do fosfolípido.

Figura 25: Efeito da pressão superficial ($\Delta\pi$) na adsorção da forma FAT (3,5 μ g/l) a partir da subfase em monocamadas de DMPA a várias pressões de superfície iniciais.

A Figura 26 mostra que a adsorção da forma FAC é mais lenta devido à ausência da parte hidrofóbica da âncora GFI. Há um tempo de indução em torno de 10 horas, e são necessárias em torno de 13 horas para se atingir a pressão de equilíbrio. Por esse motivo, foi necessário trabalhar com uma concentração quase trinta vezes maior que a da forma FAT para se obter uma variação na pressão de superfície a um tempo menor que, ao menos, quinze horas.

Segundo modelos previamente estudados para sistemas semelhantes [Fainerman, 2001], a tensão superficial começa a variar após um certo grau de cobertura mínimo, e este tempo para alcançar tal cobertura foi chamado, como mencionado acima, de tempo de indução. A razão para sua existência é a pequena contribuição entrópica da camada superficial para a pressão de superfície [Fainerman, 2001]. Isso é o que essencialmente distingue o comportamento de adsorção de proteínas de alguns tensoativos (ou de proteínas-GFI) aos quais não existe praticamente nenhum tempo de indução.

O tempo para se atingir o equilíbrio (aproximadamente de 13 horas) é maior que foi determinado para a forma FAT nas mesmas condições. Isso pode ser novamente explicado pelo fato de que essa forma de enzima (FAC), não tendo a parte hidrofóbica da âncora de glicosilfosfatidilinositol, é obrigada a expor alguns resíduos hidrofóbicos da cadeia polipeptídica, e, portanto, desenovelar-se parcialmente durante sua adsorção.

Segundo Miller et al. [Miller et al., 2000], proteínas apresentam características bem diferentes dos tensoativos típicos. A tensão interfacial para proteínas consideradas padrões tais como albumina de soro bovino (BSA) e albumina de soro humano (HSA) foi medida na interface ar/água usando diversas técnicas, de onde foi encontrado diversos tempos de indução dependendo da concentração protéica.

Figura 26: Cinética de adsorção da forma FAC (100µg/l) em interfaces ar/água

Do ponto de vista experimental, estudos com soluções de proteínas podem apresentar alguns problemas. Em muitas técnicas experimentais, a adsorção à interface, e muitas vezes à superfície do recipiente onde está contida a solução da proteína, pode levar a uma depleção de proteína no interior da solução. Isso é constantemente visto como um problema na determinação do coeficiente de difusão, uma vez que, o tempo de indução não ocorre somente devido à difusão das moléculas de proteína do interior da solução em direção à superfície, mas também devido a uma falta de quantidade mínima de moléculas de proteínas em solução capaz de adsorver à interface e assim atingir o equilíbrio termodinâmico. Tal equilíbrio ocorre sempre que é atingida uma determinada relação entre

as moléculas de tensoativo que estão na superfície e aquelas que estão no interior da solução. Esse fato impede que haja um grau de cobertura mínimo, como já discutido acima, necessário para detectar alguma mudança na tensão superficial. A depleção de moléculas de proteínas no interior da solução pode, portanto, retardar o fim do período correspondente ao tempo de indução e afetar assim a fidedignidade da aplicação dos modelos de difusão existentes para tensoativos simples a macromoléculas, tais como proteínas.

Algumas tentativas para solucionar tais problemas foram feitas por Graham e Philips, 1979. Assim, é introduzido o grau de cobertura da superfície $(\Gamma_{\Sigma}\omega)_{\min}$, onde Γ_{Σ} é o excesso superficial máximo e ω é a área superficial molar parcial da proteína. Para desenvolver tais modelos, o coeficiente de difusão não é calculado por nenhuma equação, mas estimado com base em valores já conhecidos para outras substâncias. Dessa forma, para proteínas como HSA ou β -caseína, o coeficiente de difusão foi estabelecido em $1,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. A adsorção mínima ($\Gamma_{\min}$) foi estimada através do ponto onde a pressão superficial começa a aumentar. Dessa forma, o tempo de indução para HSA na concentração de $7,25 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^3$ foi estimada em 20s. Ou seja, o processo de adsorção é razoavelmente rápido, visto que o tempo de indução foi estimado em 500s para outra proteína de tamanho semelhante, β -caseína.

Para a forma FAC, $100 \mu\text{g/l}$ corresponde a uma concentração de $7,7 \cdot 10^{-13} \text{ mol/cm}^3$, baixa se compararmos com as concentrações de HSA e β -caseína usadas acima. O tempo de indução foi, portanto, elevado ($3,6 \cdot 10^{-4} \text{ s}$) para a forma FAC, devendo-se portanto, a baixa concentração e a sua alta massa molecular, em torno de 130 000 Da (para HSA e β -caseína as massas moleculares são em torno de 66 000 e 24 000 Da respectivamente).

Alguns modelos baseados no coeficiente de difusão efetivo (D_{ef}) têm sido aplicados para a interpretação de dados de π versus t , contudo, os dados mostram que D_{ef} está longe de valores fisicamente razoáveis. Particularmente, com a diminuição da concentração, os valores dos coeficientes de difusão são de várias ordens de magnitude maiores que o esperado devido ao tamanho e à forma das moléculas. A razão para essas discrepâncias deve-se provavelmente ao fato que esses modelos têm sido baseados na Isoterma de Langmuir. Modelos cinéticos mais elaborados consideram uma mudança na área molar parcial com o aumento da cobertura superficial, usando novos modelos termodinâmicos e cinéticos que incluem o dobramento e desdobramento da proteína nas camadas interfaciais. Uma tentativa de se construir um modelo baseado nesses aspectos foi feita recentemente segundo um artigo publicado por Miller et al., 2001.

Este modelo considera vários estados de adsorção com diferentes áreas molares interfaciais. Os cálculos do modelo consideram algumas características típicas para uma cinética de adsorção de proteína: período de indução para baixas concentrações, mudanças bruscas na tensão superficial e mudanças na cinética de adsorção durante o fenômeno. O modelo inclui valores uns tanto difíceis de serem determinados experimentalmente, tais como, concentração na “subsuperfície” (camada de proteína logo abaixo da primeira camada protéica na interface ar/água) e excesso superficial em cada estágio de adsorção.

Nesse ponto, deve ser fortemente ressaltado que devido os modelos teóricos que descrevem a adsorção das várias espécies de proteínas a interfaces líquidas carecerem ainda de um refinamento teórico mais efetivo, ainda não podemos aplicar um desses modelos já existentes de forma totalmente confiável. Corroborando com tal afirmação, segundo publicação recente de Miller et al., 2001, a descrição teórica da cinética de adsorção de

proteínas em interfaces líquidas é um problema extremamente difícil, e por isso, há poucas publicações sobre o assunto. Uma delas, de Eijk et al., 1997, mostra que a idéia física geral de que a adsorção da proteína a uma interface seja controlada por um processo de três passos: depois do transporte da molécula de proteína por difusão, ela adsorve à interface e então se espalha no espaço disponível ocupando uma certa área. Uma boa revisão sobre os modelos teóricos para a dinâmica de adsorção foi publicada recentemente por Zhang et al., 1999. Entretanto, resultados experimentais obtidos por diversos autores [Wüstneck et al., 1996; Chen et al., 1998; Makievski et al., 1998] levantam questões que não podem ser respondidas com base nas teorias existentes até então, como por exemplo, a alteração de área da proteína na interface ar/água e de como a mudança de conformação da proteína afeta a tensão superficial. Um entendimento quantitativo requer, nesse caso, uma melhora das teorias existentes.

Com a presença da monocamada de DMPA (à pressão inicial de 6,4mN/m), a variação de pressão de superfície de apenas 1,5mN/m foi obtida no equilíbrio com a mesma concentração de FAC usada acima (200µg/l). Isso mostra a dificuldade da enzima clivada em penetrar na monocamada quando o empacotamento fosfolipídico é maior. A pressões superiores a essa, a enzima não consegue penetrar na monocamada, e nenhuma variação na pressão de superfície é observada (ao menos para as pressões de superfícies estudadas de 10, 15 e 20 mN/m).

Freqüentemente, o comportamento de proteínas em monocamadas insolúveis de fosfolipídios é complexo, pois depende fortemente das propriedades das proteínas em solução e da interação da cadeia polipeptídica com os grupos polar e apolar do fosfolipídio presentes na interface. Além disso, características da monocamada, tais como pressão de

superfície inicial e compressibilidade devem ser levadas em conta. Nesse trabalho, a pressão inicial (6,4mN/m) está no estado de transição de fases entre líquido-expandido e líquido-condensado (4,6-8,0mN/m para uma faixa de área por molécula fosfolipídica de 65-45Å²). Em tal estado, a compressibilidade é máxima uma vez que $(\partial\pi/\partial A)_T \sim 0$. Em pressões superficiais superiores a essa, a compressibilidade aumenta progressivamente, e isso provavelmente se torna uma dificuldade para a penetração da proteína.

Assim, pressão superficial inicial, elasticidade da monocamada, hidrofobicidade e hidrofiliidade do fosfolipídio formador da monocamada, tamanho e estrutura tridimensional da proteína, além de sua hidrofobicidade e hidrofobilidade influenciarão não somente na difusão da proteína do interior da solução para a interface, mas também na capacidade de penetração da proteína no filme monomolecular e, conseqüentemente, na cinética de adsorção.

Se verificarmos a literatura existente sobre o assunto, vemos uma larga gama de comportamentos dependendo da proteína estudada. Tomemos como exemplo um trabalho publicado recentemente por Fainerman et al., 1999, onde se estudou a penetração de β -lactoglobulina em monocamadas de DPPC. Para uma concentração protéica de $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l e área molecular lipídica de 120Å², a pressão de superfície em 200 minutos saltou de 0mN/m para 16mN/m. Embora a monocamada estivesse ainda no estado gasoso, alguns domínios de fase foram observados após a penetração, mostrando a tendência dessa proteína em provocar a agregação dos domínios fosfolipídios presentes. Noutro trabalho [Maget-Dana, 1999,] a autora descreve a dificuldade de penetração de defensina-A quando a monocamada está no estado líquido-cristalino. A pressão superficial de exclusão, segundo a autora, sugere que proteínas adsorvendo em interfaces fosfolipídicas sejam sensíveis ao

empacotamento molecular. Entretanto, verifica-se nesta tese que esses efeitos dependem consideravelmente também da estrutura da proteína.

Os fatores que influenciam a penetração de proteínas, não somente em monocamadas líquidas, mas também em sistemas similares como lipossomos, já são discutidos de longa data [Demel et al., 1973; Ahlers et al., 1991]. Tais fatores incluem, além dos já descritos acima, a força de interação entre a proteína e o lipídio, presença de íons na subfase, natureza e cargas da cabeça polar dos lipídios, tamanho e saturação das cadeias alquílicas e densidade de empacotamento lateral das cadeias hidrocarbônicas.

Devido ao grande número de fatores que influenciam a cinética e dinâmica de penetração de proteínas em monocamadas lipídicas, não há modelos satisfatórios capazes de descrever completamente o fenômeno. Isso é provavelmente o motivo pelo qual a maior parte da literatura sobre o assunto traz um tratamento apenas qualitativo.

Para forçar a adsorção da forma FAC, e investigar suas propriedades superficiais, uma alta força iônica, e uma maior concentração foi usada na subfase. A Figura 27 mostra sua cinética de adsorção numa interface livre de lipídios. Há um tempo de indução de 180min e depois disso, a pressão de superfície aumenta até que, em 360min, uma pressão de equilíbrio de 18mN/m seja atingida. Essa cinética de adsorção é analisada pela seguinte equação de primeira ordem, [Graham and Philips, 1979]:

$$\ln[(\pi_e - \pi_t)/(\pi_e - \pi_o)] = -Kt$$

no qual π_e , π_t and π_o são as pressões de superfície respectivamente no final da adsorção (platô), no tempo t, e no tempo inicial (zero), e K é a constante de adsorção. Observa-se que a forma FAC adsorve na interface ar/água através de um mecanismo de dois passos, com constantes iguais a 1.84×10^{-2} e $6.72 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, valores comparáveis com outras proteínas já

estudadas [Graham and Philips, 1979; Maget-Dana and Ptak, 1996; Suttiaprasit et al., 1992]. A adsorção em duas etapas provavelmente consiste da penetração na interface seguida por mudanças conformacionais e/ou orientacionais para que se permita que um maior número de moléculas sejam adsorvidas na interface.

A inserção da forma FAC em monocamadas de DMPA a partir das mesmas condições anteriores (alta força iônica e concentração protéica) é mostrada na Figura 28. Um tempo de indução de pelo menos 40min é observado até que um aumento na pressão de superfície seja observado. O tempo de indução é crescente com maiores pressões de superfície iniciais, como observado na Figura 28B, indicando novamente que quanto maior o empacotamento superficial, maior a dificuldade da forma FAC em penetrar dentro da monocamada lipídica. Além disso, o aumento na pressão de superfície ($\Delta\pi$) é menor para maiores pressões de superfície iniciais, como observado na Figura 28C. Com a extrapolação da curva $\Delta\pi$ versus π_i a pressão de superfície zero, obtém-se a pressão de exclusão, que é aproximadamente 16,4mN/m, mais baixa que aquela observada para a forma FAT, mas com concentrações protéicas mais baixas, e sem o uso de alta força iônica. Tal fato, torna claro o papel da âncora na adsorção protéica. A presença da âncora hidrofóbica conduz a adsorção, na qual as cadeias alquílicas penetram dentro da monocamada lipídica. Como a adsorção da forma FAC é somente através da cadeia polipeptídica, altamente hidrofílica, a adsorção à monocamada deve-se a exposição de alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na interface. Também, a proteína pode interagir principalmente com a cabeça hidrofílica do DMPA, e, em menor extensão ocorrerá a penetração da proteína entre as cadeias alquílicas do DMPA.

Figura 27: Adsorção da forma FAC (2,0mg/l) na interface ar/água. Além de tampão Tris-HCL, pH 7,5, foi usado na subfase KCl 0,4mol/l.

Figura 28: Adsorção da forma FAC (2,0mg/l) da subfase (tampão Tris-HCl, pH=7.5, 2mmol.l⁻¹ Mg²⁺ and 0.4mol.l⁻¹KCl) em monocamadas de DMPA em várias pressões de superfície iniciais. As Figuras 26B e 26C indicam, respectivamente, a dependência do tempo de indução e do aumento total da pressão $\Delta\pi$, da pressão de superfície inicial, π_i .

8.1.2. Cinéticas de adsorção: potencial de superfície

Concomitantemente com as medidas de pressão superficial, também se monitorou as variações no potencial superficial durante a adsorção da forma FAT à interface ar/água e em monocamadas de DMPA. Os dados são apresentados nas Figuras 29 e 30.

No equilíbrio, a adsorção da forma FAT à interface ar/água apresentou um potencial superficial de 40mV, indicando contribuição da proteína ao momento de dipolo na direção normal à superfície. Para a adsorção da forma FAT em monocamadas lipídicas, a curva inicia-se com o potencial correspondente às contribuições do momento de dipolo do fosfolipídio na pressão de superfície em questão. A adsorção da proteína provoca um aumento ou diminuição do potencial. O aumento se dá para pressões iniciais de 0 e 4,5mN/m. Para valores iguais ou maiores que 10mN/m, o potencial de superfície diminui com o tempo.

Considerando que a cauda hidrofóbica contribui positivamente para o potencial superficial, deve-se considerar que a diminuição do potencial a pressões mais elevadas deve-se a uma ruptura da ordenação das moléculas de DMPA na interface ar/água, o que provoca uma alteração da projeção do momento de dipolo do fosfolipídio à normal à superfície à medida que a adsorção da forma FAT se estende. Uma mudança na orientação do momento de dipolo das moléculas de água interagindo com a monocamada também não pode ser descartada.

Figura 29: Cinética de adsorção medida por potencial de superfície da forma FAT (3,5µg/l) (A) e da forma FAC (100µg/l) (B) adsorvidas na interface ar/água.

Figura 30: Cinética de adsorção por potencial superficial da forma FAT (A) (3,5µg/l) e FAC (B) (100µg/l) em monocamadas de DMPA em diversas pressões de superfície iniciais (indicadas, em mN/m, nos encartes das Figuras). Uso de tampão Tris-HCl, pH=7,5, MgCl $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

As cinéticas de adsorção da forma FAC (Figuras 29B e 30B) seguiram um comportamento, onde, para todas as pressões estudadas, houve um aumento de potencial superficial de 50-80mV, indicando a contribuição do dipolo da cadeia polipeptídica para o potencial. Para uma interface sem DMPA (Figura 29B), o tempo necessário para se perceber uma variação considerável do potencial foi cerca de 3h, abaixo do tempo de 10h para a pressão de superfície (Figura 24). De fato, o potencial de superfície é mais sensível que a pressão de superfície [Oliveira e Bonardi, 1999]. Isso indica, que mesmo em um tempo abaixo de 10 horas, alguma extensão da adsorção da forma FAC ocorre.

Acima de 15mN/m, embora não se observe mais variação na pressão de superfície, nota-se um aumento no potencial de 0-50mV, indicando possivelmente uma reorganização dos dipolos da forma FAC (e também de água em torno da molécula de proteína) que embora não tenha penetrado na monocamada lipídica, interage com as cabeças polares do DMPA. De fato, é reportado que polipeptídios interagindo somente com a cabeça polar lipídica, através de interações eletrostáticas sem penetração na monocamada, não afeta a pressão de superfície [Demel et al., 1973].

8.1.3. Microscopias de Fluorescência

A cinética de adsorção da forma FAT às monocamadas de DMPA também foi estudada por microscopia de fluorescência (Figura 31) . Antes da injeção da solução da proteína na subfase, apenas um campo escuro é observado.

Observa-se que, a uma pressão inicial de 4,5mN/m, em menos de 20s já se observa a aparição de fluorescência no campo visual observado para a monocamada. Em 1,5min, torna-se clara, a segregação de fases, indicando uma fase lipídica rica em proteína, e outra pobre. Embora já se tenha atingido uma pressão superficial praticamente constante (5,7-5,8mN/m), observa-se uma mudança morfológica da monocamada, indicando movimento lateral de proteínas e lipídios na interface formando vários tipos de domínios. A partir de 10min, três regiões, aparentemente segregadas, são observada. Uma região rica em proteína exibe alguns domínios escuros, indicando provavelmente domínios de fosfolipídio num estado mais condensado, onde a proteína se dissolve parcialmente. Uma outra região, menos clara, não apresenta domínios mais escuros mesclados. No entanto, a 60min, alguns desses domínios escuros também passam a se misturar a esse domínio com brilho intermediário. A terceira fase é escura, indicando agregação de lipídios que se encontram em um estado de maior condensação superficial.

As Figuras 32 e 33, mostram a mudança morfológica para uma monocamada de DMPA a pressões iniciais de 20 e 30mN/m, respectivamente. Elas têm comportamento semelhante. Em poucos segundos, observam-se domínios fluorescentes mais intensos, indicando a abrupta adsorção da forma FAT, como já discutido. Após isso, devido à reorganização e difusão lateral da proteína pela interface, nota-se que os domínios tornam-se mais homogeneamente distribuídos, e depois, uma segregação de duas fases, uma mais brilhante e outra mais escura, começa a se formar. No entanto, observa-se que, com o tempo, alguns domínios mais escuros (ricos em lipídios) começam a se misturar na fase mais clara (rica em proteína), indicando uma re-organização lateral dos componentes da monocamada.

Figura 31: Cinética de adsorção da forma FAT em monocamadas de DMPA (pressão inicial de 4,5 mN/m)

Figura 32: Cinética de adsorção da forma FAT em monocamadas de DMPA (pressão inicial de 20mN/m)

100 μ m

Figura 33: Cinética de adsorção da forma FAT em monocamadas de DMPA (pressão inicial de 20mN/m)

8.1.4. Efeito da concentração de proteína

A Figura 34 mostra a adsorção da forma FAT em interfaces sem (A) e com monocamada de DMPA pré-formada a 6,4mN/m (B). Para controle, também se obtiveram curvas de tensão superficial para o $C_{12}(EO)_9$ com concentração equivalente àquela existente na solução da enzima. A curva apresenta tensões superficiais maiores para as soluções de

proteína em relação àquelas de $C_{12}(EO)_9$ porque a âncora GFI interage com o tensoativo e promove um menor excesso superficial. Entretanto, quando uma monocamada é presente (B), o sistema com a proteína apresenta tensões superficiais menores que para o $C_{12}(EO)_9$ sem a enzima, devido à capacidade de penetração da âncora GFI na monocamada lipídica. A concentração de agregação crítica para o sistema FAT/ $C_{12}(EO)_9$ é sempre menor que a concentração micelar crítica do $C_{12}(EO)_9$ sozinho (com ou sem a monocamada), pois, a presença de proteína e $C_{12}(EO)_9$ juntos promove uma maior densidade de tensoativos na interface, considerando que a FAT também exiba atividade superficial.

Comparando as duas curvas da Figura 34, vê-se que a presença da monocamada é um empecilho para a adsorção do $C_{12}(EO)_9$, ao passo que ela não o é para a FAT; fato atribuído à presença da âncora hidrofóbica. No entanto, a presença da monocamada promove uma redução da concentração de agregação do sistema misto proteína/tensoativo de $3,6 \cdot 10^{-6}$ (Figura 14) para $3,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l de $C_{12}(EO)_9$.

A Figura 35 mostra novamente que a forma FAC também tem atividade superficial, provavelmente devido a alguns resíduos hidrofóbicos da cadeia polipeptídica. No entanto, ela tem sua adsorção à interface dificultada pela presença da monocamada lipídica atribuída à ausência da cadeia diacilglicerol. Apesar do pequeno efeito da forma FAC na tensão superficial comparado com a FAT, os perfis das curvas de ambas em presença de DMPA são característicos de saturação superficial associada com agregação no interior da solução.

Figura 34: Curvas de tensão superficial *versus* concentração para a forma FAT (quadrado) e polidocanol puro em monocamadas de DMPA (pressão inicial de 6,4mN/m).

Figura 35: Curvas de tensão superficial *versus* concentração para a forma FAC adsorvendo em interface ar/água sem (quadrados) e com (círculos) DMPA a uma pressão inicial de 6,4mN/m (círculos).

8.2. Compressão das monocamadas

8.2.1. Monocamadas de fosfatase alcalina sem lipídios

A Figura 36 mostra a curva de pressão e potencial de superfície para a forma FAT. É importante ressaltar que para a proteína pura na interface (isto é, sem fosfolipídio), elas foram espalhadas sobre a superfície, e não injetadas na subfase. Observa-se que ela possui atividade superficial, atingindo pressões de superfície até cerca de 20mN/m, mostrando um único estado fluido. O uso de força iônica elevada (0,4mol/l) garantiu a permanência da proteína na subfase durante a compressão, devido o uso de uma alta concentração protéica. Esse recurso foi necessário porque a concentração volumétrica estava acima da CAC, e, portanto, a enzima se solubilizava na subfase. Dessa forma, consegue-se obter uma isoterma completa da enzima com áreas por moléculas razoáveis para suas dimensões. Abaixo da CAC, também é possível obter isotermas pressão de superfície-área, mas a pressão superficial não excede de 12mN/m [Caseli et al., 2001]. A área mínima calculada (em torno de $4000\text{\AA}^2$) é compatível com as dimensões da proteína. O potencial de superfície máximo de 250mV revela certa orientação do momento de dipolo da proteína na interface. O efeito do polidocanol na adsorção à interfaces, quando em presença da forma FAT, acima da CAC, pode ser negligenciado, como discutido previamente [Caseli, 2001].

Figura 36: Curva de pressão e potencial de superfície para a forma FAT. Uso de KCl 0,4mol/l.

A medida da absorção UV-vis *in situ* da monocamada de FAT é mostrada na Figura 37. A absorbância em 202nm (transição π - π^*) aumenta com a pressão de superfície indicando a incorporação da proteína na interface ar/água. A incorporação à interface ocorre mesmo sem a presença de alta força iônica como podemos ver na Figura 37A.

A forma FAC, por sua vez, apresenta atividade superficial muito baixa, e sua compressão leva à elevação da pressão de superfície de apenas 2mN/m. A obtenção de sua

isoterma somente foi possível com uso de alta força iônica (Figura 38). A pressão de superfície elevou-se até 18mN/m e uma área mínima de 1500Å². Esse menor valor, deve-se a dois fatores: 1) algumas moléculas de FAC dissolveram-se na subfase aquosa, e o número de moléculas na interface é menor (o que proporcionaria uma área por molécula “real” maior), 2) devido à ausência da âncora hidrofóbica, a proteína pode adotar uma outra conformação na interface ar/água. Essa proteína tem um formato aproximadamente elipsoidal, com eixos medindo 100 (eixo principal) e 50 Å. Se o eixo principal estiver paralelo à interface, a proteína ocuparia uma área de 3925Å². Se o eixo estiver perpendicular à interface, esta área seria igual a 1962Å². Durante a compressão da monocamada de FAC, ambos efeitos podem ocorrer, ou seja, algumas moléculas podem ser continuamente expelidas para a subfase, e as moléculas de proteína se orientam de tal forma, que se ocupe um maior número possível de espécies na interface ar/água. Para a forma FAT, como a adsorção se dá via uma âncora hidrofóbica, tal rearranjo, torna-se improvável. No entanto, o potencial de superfície máximo de 250mV, muito próximo ao da forma FAC não nos dá informações adicionais a respeito, uma vez, que uma alta força iônica foi usada na subfase, e o potencial de Gouy-Chapman deve afetar fortemente a medida, além do momento de dipolo das moléculas de água circundantes da proteína.

Figura 37: Espectro de absorção de monocamadas de FAT sobre subfase Tris-HCl, pH=7,2, MgCl_2 $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l, sem (acima) e (abaixo) com KCl 0,4mol/l.

Figura 38: Curva de pressão e potencial de superfície para a forma FAC (com uso de KCl 0,4mol/l)

A Figura 39 mostra o espectro de absorbância UV-VIS para monocamadas de FAC. O aumento da absorbância em 202nm com pressões superficiais crescentes indica fortemente que a proteína adsorveu à interface ar/água.

Figura 39: Espectro de absorção de monocamadas de FAC sobre subfase Tris-HCl, pH=7,2, MgCl_2 $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l, KCl 0,4mol/l.

8.2.2. Métodos de espalhamento para as monocamadas mistas

Para a formação de monocamadas mistas fosfatase alcalina/DMPA, especialmente para a forma FAT, três formas de incorporação da enzima foram testadas, mas sem uso de alta força iônica, e com concentrações de proteína mais baixa (de forma que a concentração de polidocanol fique abaixo da CAC). Na primeira, chamada aqui de **co-espalhamento**, após o espalhamento do DMPA, a solução de proteína é espalhada sobre a monocamada lipídica a uma pressão de superfície igual a zero. Na segunda, chamada de **injeção**, a proteína é injetada na subfase das monocamadas de DMPA, também a pressão zero, a poucos milímetros da interface. Na terceira, chamada de **formação sobre solução**, uma solução da proteína é colocada como subfase e após estabilização da pressão superficial, o DMPA é espalhado.

Assim, a Figura 40 mostra as isotermas pressão-área para as metodologias utilizadas. O perfil geral das três curvas é semelhante, com uma diminuição da compressibilidade superficial a altas pressões (acima de 20mN/m), especialmente nas situações em que o método de “injeção” tenha sido empregado. No entanto, observa-se que para o método de injeção, a pressão superficial inicial teve valores menores que para as duas demais metodologias. Isso pode indicar que a incorporação da enzima a partir da subfase, proporciona um melhor ordenamento da posição da cadeia polipeptídica e da âncora GFI na interface ar/água em relação às cadeias de DMPA. Nos outros métodos, os valores mais altos de pressão inicial indicam que não somente a âncora GFI penetra na

interface, mas também alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos são expostos, proporcionando também uma maior área por molécula.

Figura 40: Curvas de pressão de superfície-área para monocamadas mistas de FAT (3,5µg/l)/DMPA com três diferentes meios de incorporação da proteína.

100 μ m

Co-espalhamento injeção solução

Figura 41: Micrografias de fluorescência obtidas para monocamadas de DMPA/FAT (pressão inicial zero) após aproximadamente 10 min, usando três diferentes metodologias.

A Figura 41 mostra a morfologia, por microscopia de fluorescência, obtidas no equilíbrio para as três formas de incorporação protéica, antes da compressão. Nota-se que tanto para o método do co-espalhamento, quanto para o da solução, duas fases são observadas. Uma escura, rica em fosfolipídios, e outra clara, onde os fosfolipídios se dissolveram numa fase rica em proteína. Esse comportamento se manteve até altas pressões. No entanto, para o método de injeção, observa-se uma melhor distribuição de domínios claros e escuros, indicando uma melhor mistura entre as fases. Esse último método de incorporação da proteína foi então escolhido para os experimentos subsequentes realizados na cuba de Langmuir. A forma FAC foi incorporada pela mesma metodologia.

8.2.3. *Isotermas de pressão e potencial de superfície-área*

A Figura 42 mostra as curvas de pressão e potencial de superfície para o DMPA durante uma compressão superficial e seu efeito na adsorção das formas FAT e FAC à interface. Observa-se que tanto nas curvas de pressão como nas de potencial, o efeito da forma FAT é mais pronunciado. Tal fato pode ser atribuído à sua atividade superficial devido à âncora GFI. Em 18mN/m, observa-se que na curva pressão-área para a monocamada mista DMPA/FAT, há um ponto de inflexão que pode ser atribuído a uma alteração da compressibilidade superficial devido à acomodação molecular da forma FAT na interface.

O deslocamento de área para a monocamada de DMPA na presença da forma FAC poderia ser atribuído à área superficial ocupada pela proteína. Porém, considerando o caso extremo onde todas as moléculas de proteína estejam na interface ar/água, esse aumento seria de $6600\text{\AA}^2$ por molécula de enzima. Levando em conta a alta solubilidade dessa enzima em água, a área disponível por proteína, aparentemente alta demais, pode ser explicada pela interação dos grupos polares do DMPA com a proteína.

O maior valor do potencial de compressão máxima atingido pela forma FAC (420mV) mostra a contribuição da cadeia polipeptídica para a resultante normal do momento dipolar na interface ar/água. Contrariamente, a forma FAT provoca uma redução do potencial de compressão máxima para 210mV (comparado com o mesmo valor obtido para o DMPA puro sobre o tampão: 330-350mV). Além disso, o perfil da curva de potencial é bastante alterado em relação à curva para o DMPA puro, mostrando novamente o efeito da âncora hidrofóbica na alteração das propriedades superficiais das monocamadas mistas.

Figura 42: Curvas de pressão (A) e potencial (B) de superfície para monocamadas de DMPA formadas sobre água pura (■) ou espalhadas na presença de 3,5 $\mu\text{g/l}$ de FAT (●) ou FAC (▲). Subfase: Tris-HCl, pH 7,5, MgCl_2 $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l

8.2.4. Caracterização da morfologia da monocamada: Microscopia de fluorescência e no ângulo de Brewster

A morfologia superficial foi examinada por microscopia no ângulo de Brewster (Figura 43). Para monocamadas mistas DMPA/FAC não houve alteração significativa na morfologia durante a compressão. Somente a intensidade da refletividade da interface foi observada, provavelmente devido ao aumento do empacotamento molecular. No entanto, a presença da forma FAT provoca uma modificação na refletividade superficial (Figura 43). As imagens mostram três tipos de domínios de acordo com a intensidade da refletividade, indicando uma partição heterogênea da proteína nos diferentes domínios do DMPA. Sabe-se que proteínas do tipo GFI tendem a se agregar em domínios condensados de lipídios denominados “jangadas” (*rafts*) [Medof et al., 1996]. Nossos experimentos permitem concluir que ou a proteína se condensa, ou ela induz à formação de domínios condensados de lipídios. No entanto, não se pode atribuir esses domínios observados nesses experimentos aos domínios jangada visto eles serem formados essencialmente por esfingolipídios e colesterol e terem um tamanho muito reduzido (até 700nm) [Jacobson e Dietrich, 1999]. É possível observar também que a intensidade luminosa dos domínios mais reflexivos torna-se mais ainda forte a partir de 20mN/m, indicando uma intensificação na formação dos domínios condensados. Também devido à alta proporção de lipídio em relação à proteína (3500:1 em mol), os domínios observados na Figura devem ser atribuídos à agregação de DMPA induzido pela presença da proteína.

FAC/DMPA

FAT/DMPA

Figura 43: Microscopia no ângulo de Brewster para monocamadas de DMPA/FAC e DMPA/FAT (3500:1, mol: mol) em diversas pressões de superfície (indicadas abaixo das micrografias)

A Figura 44 mostra as características das monocamadas DMPA/FAT quando a enzima é marcada. Em 0mN/m, observam-se alguns agregados que não se dissolvem nos domínios de proteína. Quando a pressão de superfície é elevada, alguns domínios lipídicos se auto-agregam, formando fractais (5mN/m), que não são observados nas imagens obtidas através de microscopia no ângulo de Brewster devido à diferença de resolução entre as duas técnicas. Além disso, em maiores pressões de superfície, há áreas com três diferentes padrões de intensidade de luz. Os domínios mais intensos provavelmente correspondem às regiões mais ricas em fosfatase alcalina, os com reflexão intermediária correspondem às regiões menos ricas em proteína mesclada com lipídios, e as regiões mais escuras consistem a fase mais pobre em proteína.

Além disso, as regiões mais ricas em proteína tornam-se menores conforme o empacotamento superficial é aumentado. Isso provavelmente ocorre devido ao fato da interface estar coberta pelas cadeias alquílicas ou do DMPA ou da proteína (âncora GFI), de modo que a cadeia polipeptídica, à qual a sonda está ligada, fique totalmente voltada para a subfase, e, portanto, sua visualização torna-se limitada.

A Figura 45 mostra as micrografias obtidas para monocamadas de DMPA/enzima quando o lipídio é marcado. Observa-se novamente segregação de fases e formação de domínios para monocamadas mistas de DMPA/FAT, enquanto que para DMPA/FAC, vêem-se domínios mesmo a baixas pressões (0mN/m). Porém, não é possível observar agregação dos domínios líquido-condensados de DMPA, como ocorrera para o sistema DMPA/FAT. Esse comportamento ocorreu em todas as pressões estudadas, sendo que apenas os domínios tiveram seu tamanho aumentado.

Figura 44: Microscopia de fluorescência para monocamadas de DMPA/FAT (3500: 1, mol: mol) em diversas pressões de superfície (indicadas abaixo das micrografias). FAT marcada com fluoresceína.

Figura 45: Microscopia de fluorescência para monocamadas de DMPA/(FAT ou FAC) (3500:1, mol:mol) em diversas pressões de superfície (indicadas abaixo das micrografias). Lipídio marcado. A compressão se deu após 2min de espera para evaporação do solvente.

8.2.5. Espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 46 mostra o efeito da pressão de superfície sobre o espectros de IRRAS para a fosfatase alcalina. As bandas são atribuídas principalmente às ligações amida [Miyazawa and Blout, 1961]. O modo de estiramento da carbonila (amida I) aparece na região entre 1600 e 1675cm^{-1} com duas bandas (1620 e 1653cm^{-1}), atribuídas

respectivamente às estruturas beta-folha e alfa-hélice. A banda mais intensa está localizada em 1539cm^{-1} e corresponde aos modos de deformação angular N-H e C-N (bandas amida II), entre duas bandas de menor intensidade em 1559 e 1520cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, às estruturas alfa-hélice e beta-folha. Em 1701 cm^{-1} uma banda beta-folha antiparalela aparece ao lado de outra em 1685 cm^{-1} que pode corresponder também a beta-“turn” [Byler e Susi, 1986]. As bandas em 1473 , 1458 , 1419 e 1394 cm^{-1} são relacionados à deformação angular C-O-H no plano devido às cadeias oligossacarídicas [Ter-Minassian-Saraga, 1998] da âncora GFI. As bandas em 1473 , 1458 e 1419 cm^{-1} podem ser também atribuídas ao estiramento em CH_2 e CH_3 [Mendelsonh e Mantsch, 1986] presentes na parte hidrofóbica da âncora GFI, ao passo que a banda em 1394cm^{-1} pode ser atribuída à deformação tipo oscilação da ligação C-H presente em CH_3 . A intensidade das bandas é aumentada conforme maiores pressões de superfície são alcançadas, indicando um aumento da densidade superficial da enzima na interface. As principais bandas mostradas na região do espectro não mudam de posição com pressões de superfície crescentes, indicando nenhuma (ou pequena) mudança conformacional durante a compressão, o que torna improvável a desnaturação da enzima.

Figura 46: Espectro de absorção-reflexão na região do infravermelho monocamadas de FAT na região entre 1375 e 1725cm^{-1} . As pressões superficiais são mostradas no lado direito do espectro.

As intensidades relativas calculadas para alfa-hélice (1653 cm^{-1}) e beta-folha (1620 cm^{-1}) permanecem aproximadamente as mesmas para diferentes pressões de superfície (a relação alfa-hélice/beta-folha é igual a $1,38 \pm 0,11$ – essas razões foram calculadas a partir das alturas máximas e confirmadas para cálculos a partir das áreas das bandas), mostrando poucas mudanças na orientação da estrutura secundária e/ou dos domínios moleculares da enzima. A razão de intensidades máximas da banda amida I (1653 cm^{-1}) e amida II (1539 cm^{-1}) é $0,7 \pm 0,1$, ou seja, praticamente não muda com a compressão da interface.

É importante ressaltar novamente que é improvável, analisando os resultados, que a enzima seja desnaturada com a compressão. Além do fato que os números de onda correspondentes às estruturas alfa-hélice e beta-folha permanecerem imutáveis, a banda amida II não se desloca de 1539 para 1532cm^{-1} , como reportado para proteínas desnaturadas [Lee e Chapman, 1986]. Essas são umas fortes evidências que as moléculas de proteína permanecem ativas na interface mesmo sob compressão. Além disso, a observação de que a razão das intensidades das bandas relativas às estruturas alfa-hélice e beta-folha indicarem uma maior proporção da primeira estrutura em relação à segunda está de acordo com relato para a estrutura nativa da fosfatase alcalina [Le Du et al. 2001]. Desnaturações levariam a uma alteração na estrutura beta-folha [De la Fournière et al., 1995] e, portanto, levaria a mudanças nas bandas correspondentes, o que não foi observado. As bandas amida I são altamente anisotrópicas, isto é, são altamente sensíveis a modificações de orientação dos grupos carbonila, e apesar disso, poucas modificações são observadas nas bandas registradas nesse trabalho.

Também, é possível obter a posição do eixo da alfa-hélice em relação ao plano da interface. O efeito da estrutura helicoidal sobre a posição da banda amida I é reportada na literatura [Cornut et al., 1996], na qual se observa que o número de onda varia com a inclinação do eixo em relação à interface (Figura 47A). De acordo com esses dados, a banda localizada em 1653cm^{-1} (Figura 46) corresponde a um ângulo de inclinação entre o eixo helicoidal e a normal à interface de aproximadamente 45° . Além disso, os eixos principais das várias alfa-hélices são praticamente paralelos uns aos outros [Cornut et al., 1996]. Uma vez que o eixo da alfa-hélice também forma um ângulo de 45° em relação ao eixo maior do elipsóide que forma a cadeia polipeptídica [Le Du et al., 2001], esses dados sugerem que a fosfatase alcalina apresente uma orientação na interface ar/água de tal

Figura 47: Dependência do número de onda de absorção-reflexão para a banda amida I em relação ao posicionamento do eixo alfa-hélice de uma proteína em relação à interface de reflexão [retirado de Cornut et al., 1996]. O esquema inferior (B) mostra o posicionamento da alfa-hélice em relação ao plano da interface.

maneira que o eixo principal do elipsóide tenha uma orientação preferencialmente paralela à interface, e a âncora GPI fique perpendicular em relação ao plano da interface, (Figura 47B) como já demonstrado para fosfatases alcalinas de intestino [Ronzon et al., 2002a].

A Figura 48 mostra o espectro para a forma FAC sobre altas concentrações iônicas. As bandas relativas à ligação amida, conforme observadas para FAT, foram também observadas para a forma FAC, mas com variações no número de onda conforme se atinge pressões de superfície mais elevadas. De zero a 15mN/m, alguns deslocamentos podem indicar alguma mudança conformacional e/ou orientacional durante a compressão. As bandas relativas à amida I (1651 e 1639cm^{-1}) são claramente nítidas somente em 15mN/m, e além disso, a 0 e 7mN/m, essas bandas estão deslocadas para maiores números de onda. As intensidades relativas calculadas para alfa-hélice (1651cm^{-1}) e beta-folha (1620cm^{-1}) em 15mN/m é 1.42. A relação entre as intensidades das bandas de amida I (1651cm^{-1}) e amida II (1539cm^{-1}) é $0,42 \pm 0,1$. Essa relação difere daquela observada para a forma FAT ($0,70 \pm 0,1$). Também, ocorrem alguns deslocamentos nos números de ondas correspondentes às estruturas alfa-hélices e beta-folhas em alto estado de compressão. A banda em 1651cm^{-1} , relativa à alfa-hélice aparece somente em 15mN/m. Isso evidencia o modelo inicial, no qual, sobre compressão, a forma FAC pode mudar sua orientação em relação ao plano da interface. Como a intensidade das bandas aumentou com a compressão, a possibilidade de expulsão da enzima para a subfase pode ser descartada. Portanto, a baixos estados de compressão (pressões superficiais mais baixas), as moléculas de enzima adquirem uma conformação aleatória. A compressão impõe uma certa orientação da enzima na interface ar/água. Tal orientação é percebida pela banda em 1651cm^{-1} , que aparece num maior estágio de compressão (15mN/m).

Figura 48: Espectro de absorção-reflexão na região do infravermelho monocamadas de FAT na região entre 1475 e 1725cm^{-1} . As pressões superficiais são mostradas no lado direito do espectro.

Como um experimento controle, espectros de monocamadas de DMPA puro foram obtidos para diferentes pressões superficiais, e algumas de suas principais bandas são mostradas na Figura 49. As bandas em 2851 e 2917cm^{-1} (bandas 2 e 1 respectivamente) correspondem aos modos de estiramento simétrico e antissimétrico C-H do CH_2 , e suas intensidades aumentam com pressões superficiais crescentes, indicando maior quantidade de moléculas de lipídio sob o feixe de infravermelho. Este fato é justificado pelo maior empacotamento superficial proporcionado pela compressão.

Figura 49: Espectro para monocamadas de DMPA na região entre 2800 e 2960cm^{-1} .

As pressões de superfície são mostradas à direita do espectro. As bandas 1 e 2 são explicadas no texto.

A Figura 50 mostra o efeito da presença da proteína na monocamada mista com DMPA. As bandas típicas para ligação amida aparecem novamente no espectro, e, como se pode ver, há poucas mudanças no posicionamento dos números de onda, o que indica que há uma variação insignificante no arranjo da proteína na interface com a presença do fosfolipídio. As bandas amida II permanecem em 1539 e 1520 cm^{-1} (como visto na Figura). As bandas em 1620 cm^{-1} (estruturas folha-beta), 1458 e 1701 cm^{-1} (atribuídas às cadeias alquílicas ou da âncora GPI ou da cadeia oligossacarídica) não mudaram. A pequena mudança de 1653 para 1651 cm^{-1} para a banda referente à alfa-hélice pode indicar alguma mudança na orientação do eixo da alfa-hélice em relação à interface. Estes resultados mostram um efeito insignificante da presença do fosfolipídio na orientação tanto da âncora GFI quanto da cadeia polipeptídica. A relação das intensidades em 1651 e 1620 cm^{-1} é $1,40 \pm 0,15$, muito similar à razão calculada para a enzima pura na interface, revelando novamente que a estrutura secundária da fosfatase alcalina não tem mudanças relevantes, nem com pressões superficiais crescentes, tampouco introduzindo DMPA na interface (este valor é comparável com o valor da relação alfa-hélice/folha beta de 1.38 para a enzima pura na interface). A relação amida I/amida II é $0,75 \pm 0,09$, e pelo desvio médio, nota-se que tal razão não muda significativamente durante a compressão. A similaridade dos espectros das monocamadas para a enzima pura e mista com DMPA reforça o fato que a fosfatase alcalina não altera significativamente sua conformação com a presença de lipídios. Apenas o comportamento cinético de adsorção na interface (relatórios 1-3) é diferente, mas não as propriedades de equilíbrio. De fato, a enzima tem, em presença de DMPA, orientação e estrutura secundária similar àquela no caso das monocamadas de proteína pura. Tal similaridade é deduzida a partir das observações feitas sobre a relação das intensidades (ou áreas integradas) entre as bandas amida I e II, e idem entre as bandas alfa-hélice e beta

folha. O pequeno deslocamento nos números de onda na região correspondente às estruturas alfa-hélice revela que a orientação do eixo alfa-hélice é provavelmente pouco mudada. A compressão da monocamada proporciona um aumento de intensidade das bandas, mas o perfil geral delas não muda. Isso indica uma maior concentração superficial de proteína na interface, indicando que a compressão não leva necessariamente a mudanças significativas na conformação protéica na interface e nem à expulsão da enzima da interface em pressões acima de 20 mN/m em contraposição ao que foi proposto por Ronzon et al. [2002a]. A não alteração na conformação de outras enzimas ancoradas por GFI na interface líquido-ar e a independência com o lipídio usado como matriz já foi reportada [Ronzon et al. 2002b, Ronzon et al 2002c].

Além disso, como será visto no item seguinte (8.3), a enzima ainda exibe atividade catalítica sob compressão mesmo a altas pressões superficiais (30mN/m - considerada próxima àquela encontrada em biomembranas naturais [Blume et al., 1979, Marsh et al. 1996, Seelig et al., 1987]). Possível fenômeno de agregação pode ocorrer, já que é comum para proteínas ancoradas via GFI, mas isso não poderia levar a mudanças consideráveis na estrutura secundária da proteína, como pode ser visto nos dados aqui relatados. De fato, *in vivo*, proteínas ancoradas via GFI são encontradas em microdomínios naturais denominados “jangadas” (*rafts*) [Simons e Ikonen, 1997], e a agregação pode ser um fator importante que regule a ação da enzima.

Figure 50: Espectro de IRRAS monocamadas de FAT/DMPA na região entre 1375 e 1725 cm^{-1} . As pressões de superfície são mostradas à direita do espectro.

A Figura 51 mostra as mudanças nos números de onda das bandas correspondentes à ligação C-H (relativa, ou à âncora GFI, ou à cadeia hidrofóbica do DMPA). De 7 a 14 mN/m , a banda em 2862 cm^{-1} é deslocada para 2850 cm^{-1} . Esse deslocamento não ocorre para a fosfatase alcalina ou para o DMPA quando puros na interface. Tal fenômeno pode ser atribuído a mudanças na orientação do momento de dipolo de transição das ligações C-H no DMPA ou na âncora GFI na interface conforme a compressão é prosseguida (pressões superficiais crescentes). Efetivamente, tal fato é a única mudança significativa no espectro referente à monocamada mista comparando-se as várias pressões de superfície. As isotermas de pressão e potencial de superfície (relatórios anteriores) mostra, na realidade,

que a presença da enzima proporciona mudanças na compressibilidade (curvas de pressão de superfície) e no momento de dipolo (curvas de potencial de superfície) devido à interação da enzima com os lipídios. No entanto, nenhuma mudança significativa é observada nas curvas de pressão ou potencial de superfície entre as pressões de 7 e 14mN/m. Essa interação pode ser originada de diversas naturezas, incluindo forças de van der Waals (entre grupos alquílicos da âncora GPI e DMPA), interações de dipolo (entre o grupo cabeça do DMPA e a cadeia polipeptídica da fosfatase alcalina) e ligações de hidrogênio (mudanças na esfera de hidratação da proteína e do grupo cabeça do DMPA). A mudança no número de onda observada durante a compressão pode indicar que a modificação da orientação da âncora GPI e/ou das cadeias de DMPA seja mais intensa quanto mais comprimida estiver a monocamada.

Figure 51: Espectro de IRRAS para monocamadas mistas de FAT/DMPA na região entre 2800 e 2980 cm^{-1} . As pressões de superfície são mostradas à direita do espectro.

A Figura 52 mostra o espectro de infravermelho para monocamadas mistas de DMPA/FAC. Interessantemente, as bandas amida permanecem praticamente nas mesmas posições, quando comparadas às aquelas encontradas para FAC pura em 15mN/m. Somente pequenos deslocamentos são observados, tal como em 1520cm^{-1} deslocado para 1522cm^{-1} , representando a banda amida I para estruturas beta-folha, e em 1639cm^{-1} deslocada para 1635cm^{-1} , atribuída à banda amida II, o que pode significar algum desdobramento. Também, a relação entre a banda atribuída a alfa-hélice (1651cm^{-1}) e beta-folha (1620cm^{-1}), e amida I (1651cm^{-1}) e amida II (1539cm^{-1}) permanecem praticamente a mesma quando comparada com FAC pura na interface. Isso significa que as interações lipídio-proteína não alteram significativamente a estrutura secundária da proteína.

Além disso, a compressão da monocamada mista não mudou a posição das bandas, e, com a compressão, os sinais das bandas amidas são aumentados, indicando que a forma FAC não é totalmente expulsa da interface.

Figura 52: Espectro de absorção-reflexão na região do infravermelho monocamadas de FAC/DMPA na região entre 1475 e 1725cm^{-1} . As pressões superficiais são mostradas no lado direito do espectro.

8.3. Medidas de atividade catalítica

A Figura 53 apresenta dados da atividade enzimática medidas *in situ* na cuba de Langmuir em diversas condições de empacotamento. Em todas as pressões de superfície estudadas, há perda de atividade enzimática (comparada com o meio homogêneo) devido à adsorção da proteína nas monocamadas de fosfolipídio. Essa perda também ocorre em filmes LB de fosfolipídio [Petrigliano et al., 1997, Caseli et al., 2002, capítulo 9 desta tese], e é atribuída a uma possível restrição de orientação proporcionada pela menor mobilidade

da enzima imobilizada. Entretanto, pode-se observar que ela atinge até 92% da atividade medida para meio homogêneo, o que pode ser considerado um valor elevado comparado com 17% (Petrigliano et al., 1986), obtido para uma fosfatase alcalina absorvida diretamente sobre vidro, ou então comparados com os valores abaixo de 20% obtidos para a enzima absorvida sobre filmes LB lipídicos (capítulo 9 desta tese).

Figura 53: Atividade enzimática da fosfatase alcalina presente em monocamadas de DMPA/FAT (3500:1, mol:mol).

Experimentos controle foram feitos confinando-se a monocamada mista de compartimentos laterais para um compartimento central, através de um canal raso que os ligava (Figura 54). Os compartimentos laterais, dessa forma, passa a conter apenas a subfase suporte, enquanto que o compartimento central contém a monocamada mista DMPA/FAT. Os resultados mostraram que não há nenhuma atividade catalítica sobre a hidrólise do PNFF nos compartimentos laterais, evidenciando que, nas condições utilizadas, a enzima não é solubilizada na subfase, e, portanto, ela é totalmente transferida para o compartimento central. Um trabalho prévio [Caseli et al., 2001, Caseli et al., 2002] mostrou que abaixo da concentração de agregação crítica do sistema $C_{12}(EO)_9$ / fosfatase alcalina, as moléculas de proteína permanecem na interface ar/água, devido não somente à pequena quantidade de tensoativo empregado em relação às dimensões do recipiente (no caso, a cuba), mas também ao alto caráter hidrofóbico da âncora GFI. Considerando o volume da cuba empregada, a fosfatase alcalina estaria a uma concentração de $9,8\mu\text{g/L}$ ($0,20\mu\text{mol/L}$ de tensoativo), abaixo da concentração micelar crítica do sistema misto, o que não permitiria a solubilização da enzima. A diluição do tensoativo para que se promova a adsorção de proteínas ancoradas por GFI é um método empregado com sucesso pelo nosso grupo [Caseli et al., 2002] e também por outros grupos [Dietrich et al., 2001]. Além disso, as moléculas do fosfolípídio, agora presentes na interface ar/água, favorecem as interações hidrofóbicas entre as cadeias alquílicas do DMPA e a âncora GFI, favorecendo assim, a adsorção da proteína. Nesse sentido, pode-se afirmar que a hidrólise do PNFF presente na subfase é devido à enzima presente na monocamada mista e não na subfase.

Na Figura 55, observa-se que a atividade enzimática é dependente do empacotamento lateral. Ela aumenta constantemente até pressões de superfície próximas a

20mN/m, atingindo um máximo. Em pressões de superfície iguais a ou acima de 20mN/m, a atividade enzimática decai consideravelmente e permanece em cerca de 48%, independente da pressão de superfície. Na Figura 55A, é possível observar um aumento mais abrupto na pressão de superfície em 20mN/m. Observa-se também (Figura 55B), que o módulo de compressibilidade $[-A(\partial\pi/\partial A)]$ exibe um aumento intenso entre 20 e 30mN/m. O conjunto desses dados permite presumir que a atividade enzimática da fosfatase alcalina depende não somente da densidade superficial de DMPA, mas também da capacidade de empacotamento e do estado físico da monocamada mista.

Além disso, mostra-se que a atividade enzimática é função linear da densidade superficial enzimática até pressões de superfície próximas a 20mN/m (Figura 55C). Essa relação não é válida para pressões de superfície acima de 20mN/m, devido provavelmente à intensificação da formação dos domínios condensados que são observados em microscopia no ângulo de Brewster e em microscopia de fluorescência.

A atividade não pôde ser medida para a forma FAC adsorvida, uma vez que, sendo solúvel, sua atividade catalítica na hidrólise do PNFF na subfase corresponderia à ação das moléculas de enzima não só adsorvidas na monocamada mista, mas principalmente daquelas que ainda estariam no interior da solução da subfase aquosa. Isso praticamente corresponderia a determinar a atividade catalítica da forma FAC em meio homogêneo. O uso de força iônica para forçar sua adsorção à interface, como feito anteriormente, deveria afetar a atividade enzimática da proteína, por ela ser uma metaloenzima [Ciancaglini et al., 1989; Leone et al.; 1992, Leone et al., 1995; Ciancaglini et al., 1995].

Figura 54: Esquema mostrando a cuba utilizada para medidas de atividade catalítica. Os compartimentos laterais e central tinham profundidade de 1-2cm, e os canais rasos, profundidade de poucos milímetros. A monocamada mista FAT/DMPA foi preparada nos três compartimentos e depois confinada, via barreiras laterais, ao compartimento central. PNFF foi injetado na subfase dos três compartimentos e atividade catalítica monitorada.

Figura 55: Propriedades de monocamadas de DMPA/FAT (3500:1, mol: mol). (A) Atividade enzimática da fosfatase alcalina comparada com as isothermas pressão-área. (B) Fator de compressibilidade superficial. (C) Atividade enzimática em função da densidade superficial de FAT na interface ar/água

8.4. Modelo proposto para o empacotamento superficial da fosfatase alcalina na interface ar/água.

Baseado nos dados até então apresentados, propõe-se um modelo considerando a orientação, conformação e empacotamento da cadeia polipeptídica da proteína na monocamada (Figura 56). A fosfatase alcalina tem um sítio catalítico provavelmente localizado no lado oposto ao da âncora GFI [Nosjean et al. 1997, Fergusson 1999]. Dessa maneira, como se acredita que a âncora, devido à sua hidrofobicidade, esteja localizada na interface ar/água interagindo com os grupos alquílicos do DMPA, o sítio catalítico, então, deve estar voltado para a subfase aquosa onde se encontra o substrato (PNFF).

Nesse modelo, em pressões de superfície menores, as moléculas de fosfolipídio não estão ainda suficientemente empacotadas para proporcionar algum alinhamento da âncora GFI, e conseqüentemente, para orientar a cadeia polipeptídica numa forma que facilite o acesso do substrato ao sítio catalítico. Conforme a pressão de superfície é elevada, intensifica-se a interação entre as cadeias do DMPA e a âncora GFI, e por isso, o posicionamento do sítio catalítico frente à subfase facilita o acesso do substrato ao sítio, aumentando assim a capacidade da enzima em catalisar a hidrólise do PNFF.

Outro fato que pode ser observado, é que com o aumento da densidade superficial da enzima devido à compressão, a atividade enzimática se intensifica. Isso ocorre porque aumenta-se o número de moléculas de enzima por área. Entretanto, em pressões de superfície igual a ou acima de 20mN/m, a atividade catalítica para a fosfatase alcalina é diminuída para valores em torno de 48%. Também, há uma considerável redução da

compressibilidade, o que força a interação entre as cadeias polipeptídicas e entre os grupos polares e a cadeia polipeptídica. Além disso, como foi visto pelas micrografias de fluorescência e no ângulo de Brewster, domínios condensados do lipídio e proteína são intensificados em pressões de superfície acima de 20mN/m, devido provavelmente à agregação da proteína. A intensificação das interações entre as moléculas de fosfatase alcalina e a sua conseqüente agregação poderiam proporcionar mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica. No entanto, como observado nos dados de infravermelho *in situ*, a proteína não altera significativamente sua estrutura secundária, e, portanto, a redução da atividade catalítica da enzima devido a mudanças conformacionais deve ser descartada. Porém, a mudança na elasticidade no plano da monocamada, associada com a intensificação da agregação de domínios de fosfolipídio/proteína, indica que certas restrições ao movimento da enzima devem ocorrer. A altas pressões superficiais, o empacotamento lateral dá à proteína uma menor flexibilidade em termos de movimento, além do que pode levar a um alto estado de agregação de enzima, fazendo com que uma molécula oculte o sítio catalítico da outra. Esses dois fatores, conseqüentemente, vão causar uma restrição do acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima e, portanto, vai reduzir a atividade hidrolítica no PNFF.

O modelo da Figura 55 tenta expor as idéias a respeito do estado de conformação, orientação e empacotamento superficial da fosfatase alcalina em monocamadas de DMPA. A adsorção da proteína na monocamada ocorre via âncora GFI, com as cadeias alquílicas se posicionando entre as cadeias alquílicas do DMPA. Assim, a cadeia polipeptídica da enzima estará voltada para o interior aquoso (subfase), que, numa biomembrana, corresponderia ao meio extracelular. A cadeia polipeptídica ficaria, então, interagindo com a superfície “inferior” da monocamada, ou seja, com os grupos polares do DMPA. O eixo

maior do elipsóide da cadeia polipeptídica estaria paralelo ao plano da monocamada. Com o aumento do empacotamento superficial, haveria uma intensificação das interações proteína/lipídio, e esse estado de orientação protéico seria mantido. A atividade enzimática então aumentaria com o aumento da densidade superficial protéico até pressões em torno de 18-20mN/m. A essa pressão, um aumento elevado da elasticidade superficial (ou do fator de compressibilidade) ocorre, e está associado com a formação de agregados proteína/lipídio. A atividade então cai ligada ao alto estado de empacotamento superficial proteína/lipídio. No entanto, nenhuma mudança relevante da orientação e conformação da proteína ocorre, mesmo a altas pressões.

Numa biomembrana, que apresenta pressões de superfície típicas de 30mN/m, a relação enzima/lipídio e a composição lipídica devem regular o empacotamento superficial e o estado de agregação da enzima, o que, no sistema modelo apresentado nesta tese, é obtido por um método artificial de compressão lateral mecânica.

Figura 56: Modelo para a orientação, distribuição e conformação da forma FAT em monocamadas de DMPA.

CAPÍTULO 9

FILMES LB MISTOS DE FOSFATASE ALCALINA E FOSFOLIPÍDIOS

9.1. Microgravimetria e atividade catalítica

9.1.1. Adsorção da forma FAT e atividade catalítica

Para se depositar uma monocamada mista de DMPA/FAT, antes, um filme LB com 3 camadas de DMPA foi montado, através da sequência de emersão-imersão-emersão pela monocamada de DMPA, a uma pressão constante de 30mN/m, e com subfase de íons Zn^{2+} . As curvas de pressão de superfície –área para DMPA- Zn^{2+} mostram uma maior compactação da monocamada (Figura 57), o que facilitou a adesão entre as camadas durante a deposição. A deposição de DMPA sem íons Zn^{2+} resulta num filme com apenas uma camada. A tentativa de deposição da segunda camada a partir da imersão, ao invés de proporcionar a transferência do filme de Langmuir para o suporte sólido, resulta na dessorção da primeira camada, já depositada. Segundo Outka et. al [Outka et al., 1987], as dificuldades que o ocorrem devido à transferência da segunda camada deve-se principalmente à fraca interação entre as camadas sucessivas. A linearidade da massa depositada em função do número de camadas do filme LB de fosfolipídio é um diagnóstico de uma estrutura de camadas bem formada (Figura 58). A razão de transferência de $0.9 \pm 0,3$ também indicou uma boa transferência da monocamada de DMPA para o suporte sólido. Além disso, através da inclinação calculada pela Figura 58, obtém-se a massa por camada

de 168ng, próxima à aquela estimada usando-se a área por molécula de $40\text{\AA}^2$, ocupada na interface líquido/ar, e área total do cristal de $0,662\text{cm}^2$. Essa estimativa seria de 171ng, considerando a massa molar de DMPA- $\text{Zn}_{1/2}$ de 623,5g/mol).

Figura 57: curvas de pressão de superfície-área para monocamadas de DMPA sobre água pura (quadrados) e solução de Zn^{2+} $1,0 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ (cruzes).

As monocamadas mistas de DMPA/FAT foram transferidas à matriz de DMPA (pré-preparadas) através da injeção de FAT à subfase de monocamadas de DMPA no estado gasoso, a poucos milímetros da interface. A transferência foi feita a 30mN/m, e foi bem sucedida depois de um ciclo de compressão e expansão. Isso ocorreu devido à menor compressibilidade observada para a monocamada mista na segunda compressão, o que deve facilitar a deposição.

Figura 58: Linearidade da massa transferida em forma de filmes LB de monocamadas de DMPA formadas sobre solução de Zn^{2+} $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Os dados da Tabela 2 mostram que quantidades similares de FAT foram depositadas no filme, independente da quantidade de enzima presente na interface. Nessa faixa, cerca de 350ng de enzima foi depositada, rendendo um filme com densidade superficial em torno de 530ng/cm². Esse valor corresponde a formação de uma monocamada de enzima, e à densidade superficial máxima obtida quando FAT é depositada a partir da solução em filmes LB de DMPA, como previamente reportado [Caseli et al., 2001, Caseli et al., 2002]. Além disso, a relação de DMPA/FAT no filme LB foi estimado em 111:1. Com uma área média por molécula de FAT de cerca de 4400 Å². Esse valor parece ser razoável para uma

enzima com uma massa molecular de 130kDa, conforme comparada com fosfatase alcalina de intestino de bezerro, para a qual uma área de empacotamento de $5500\text{\AA}^2$ por molécula foi reportada [Petligliano et al., 1996]. Além disso, para fosfatase alcalina de placenta humana, que tem uma massa molecular similar, foi reportado que a cadeia polipeptídica tem um formato de elipsóide, com eixos de cerca de 50 e $100\text{\AA}^2$ [Rieu et al., 2002].

Tabela 2: Massa depositada de DMPA/FAT transferida a partir da monocamada mista para filmes LB de DMPA a uma pressão de superfície de 30mN/m

Enzima total na cuba (ng)	Massa de FAT/DMPA mass (ng)	Massa de FAT (ng)	Densidade superficial de FAT (ng/cm ²)
650	532±10	348±10	527±15
1625	536±6	352±6	533± 9
2275	543±8	359±8	544±12

Tabela 3: Efeito da densidade superficial sobre a atividade enzimática da forma FAT, presente numa monocamada mista de DMPA/enzima e transferida para um filme LB com três camadas de DMPA pré-preparadas.

Enzima total na cuba (ng)	Densidade superficial de FAT (ng/cm ²)	Atividade enzimática em relação ao meio homogêneo (%)
650	179	43
1625	446	21
2275	530	10

O efeito da densidade superficial da proteína sobre sua atividade enzimática foi estudado usando suportes sólidos maiores que aqueles usados para a determinação por microgravimetria (MCQ). Os dados para atividade catalítica de enzima imobilizada são mostrados na Tabela 3. O filme LB DMPA/enzima foi colocado numa cubeta com a solução de PNFF, e a formação de produto de hidrólise do PNFF foi monitorado através da medida da absorbância a 410nm da solução contida dentro dessa cubeta em contato com o filme da enzima imobilizada. Aumentando as quantidades de FAT resultou num aumento das densidades superficiais de enzima de 179 para 530ng/cm². Considerando a área total da placa (3,64cm²), a densidade superficial máxima de cerca de 530n/cm² foi alcançada somente a uma massa total de 2275ng de FAT. Quantidades de 650 e 1625ng de FAT não foram o suficiente para a formação de uma monocamada completa de enzima sobre o suporte sólido. A Tabela 3 também mostra o efeito das diferentes densidades superficiais de enzima sobre a atividade catalítica. Conforme a densidade superficial de enzima aumenta, uma diminuição significativa (de 1542 para 355nmolPH min⁻¹mg⁻¹ de enzima) na atividade enzimática (expressa na Tabela em relação ao meio homogêneo, que foi de cerca de 3564nmolPNF min⁻¹mg⁻¹ de enzima). A menor atividade enzimática em relação ao meio homogêneo está de acordo com diversos relatos mostrando que a atividade em meio heterogêneo pode, em muitos casos, ser menor que em meio homogêneo [Perez-Matteos et al., 1991; Petrigliano et al., 1996; Onda et al., 1996]. Isso não é surpreendente uma vez que enzimas imobilizadas devem sofrer desnaturação para poder alcançar uma menor energia superficial, podendo não expor adequadamente seus sítios catalíticos [Noinville et al., 2002], ou terem menor flexibilidade que enzimas em meio homogêneo [Noinville et al., 2002; Zoungrana et al., 1997; Girard-Egrot, 1997]. A ocorrência desses efeitos no sistema usado nesse trabalho não pode ser completamente descartada. Contudo, interações laterais

entre as cadeias polipeptídicas e/ou mudanças conformacionais devem ser favorecidas em densidades superficiais mais elevadas, o que diminui a acessibilidade dos sítios catalíticos da enzima ao substrato PNFF.

A transferência de FAT como uma monocamada mista resultou em uma densidade superficial de enzima de cerca de 179 ng/cm^2 , e apresentou uma atividade específica de $1542 \text{ nmol PNFF}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de enzima, o que corresponde a 43,3% daquela observada em meio homogêneo (Tabela 3). Apesar dessa atividade ser significativamente maior que aquela obtida para quando a forma FAT foi adsorvida diretamente a partir de sua solução em filmes LB de DMPA pré-formados (cerca de 12% daquela observada em meio homogêneo), a densidade superficial de enzima resultante é cerca da metade daquela adsorvida diretamente da solução, de cerca de 361 ng/cm^2 [Caseli et al., 2002]. Em ambos os casos, os dados correspondem a uma densidade superficial de enzima que sugerem uma cobertura de “submonocamada” (empacotamento total não completo). Efeitos de desnaturação ocorrendo durante a imobilização da enzima aparentemente tem o mesmo efeito em ambas as situações, uma vez que a mesma forma de enzima (FAT), que possui uma âncora hidrofóbica, foi imobilizada no mesmo substrato usando procedimentos diferentes. Efeitos difusivos do PNFF, ao penetrar no filme, podem ser descartados, uma vez que o filme preparado é composto de uma única camada de enzima depositada na camada mais externa da matriz fosfolipídica [Onda et al., 1996; Benítez et al., 2002]. Portanto, os resultados reportados aqui devem refletir as distintas orientações espaciais de certas partes da proteína proporcionadas pela ligação à âncora, o que afeta a acessibilidade do sítio catalítico ao substrato. Quando FAT é adsorvida como uma monocamada mista, a âncora GFI deve ser inserida dentro das cadeias do fosfolipídio numa direção mais perpendicular à interface sólido/líquido (ou sólido/ar), do que quando a adsorção ocorre

diretamente da solução. Isso parece provável devido à inserção da âncora GFI em filmes LB de fosfolipídios altamente condensados, o que seria mais difícil e resultaria na adoção de uma orientação mais paralela para evitar contato com a solução aquosa. Conseqüentemente, a redução da atividade enzimática seria independente da densidade superficial de enzima. Essa interpretação está de acordo com os dados reportados para a fosfatase alcalina de placenta humana, nos quais a menor distância de aproximação entre a cadeia polipeptídica e bicamada lipídica foi 10-14Å [Lehto e Sharom, 2002].

9.1.2. Adsorção da forma FAC e atividade catalítica

A forma FAC não foi adsorvida em filmes LB de DMPA usando o mesmo procedimento usado para imobilizar FAT. Devido à ausência das cadeias de diacilglicerol, FAC é uma forma altamente solúvel e é fracamente adsorvida em interfaces líquido/ar. Além disso, as interações da forma FAC com os grupos cabeças do fosfolipídio não foram fortes o suficiente para imobilizar a enzima. Uma vez que a clivagem enzimática da âncora GFI resultou em um final com o grupo fosfato na cadeia glicana sem a cadeia de diacilglicerol [Curti et al., 1986], a imobilização da forma FAC em filmes de DMPA/Co²⁺ somente foram bem sucedidas com o uso de FAC em soluções contendo Co²⁺. Aparentemente, esses íons atuam como uma “ponte” entre os grupos fosfato do DMPA e a enzima. O sucesso da deposição de camadas sucessivas de substâncias contendo grupos terminais fosfato usando metais de transição foram anteriormente reportados [Silva et al., 1998; Medeiros et al., 1994; Benítez et al., 2002]. Íons cobalto não alteraram a atividade da

enzima, devido ao fato que a concentração usada ($0,1\text{mmol.l}^{-1}$) ter sido 20 vezes menor que de Mg^{2+} , um conhecido estimulador para a atividade enzimática de FAC [Curti et al, 1986]. Íons zinco foram também usados, mas eles não foram efetivos para a preparação de filmes DMPA/FAC. A estrutura bem formada de camadas de DMPA/ Co^{2+} foi confirmada pela linearidade da massa depositada em função do número de camadas, e o coeficiente angular ter sido somente 3,8% mais alto que o valor esperado (179 ng por camada).

A Figura 59 mostra que a saturação da adsorção ocorre a uma concentração de $0,3\text{ }\mu\text{g/ml}$ de FAC. Apesar da curva de adsorção seguir o modelo de uma isoterma de Langmuir, a possibilidade de formação de agregados não pode ser descartada [Ruckenstein et al., 1994]. A adsorção da enzima ao filme LB aparentemente envolve um mecanismo de três etapas: 1) difusão da macromolécula à interface, 2) adsorção, e 3) reorientação na interface. Os dados sugerem que em concentrações abaixo de $0,3\text{ }\mu\text{g/ml}$, o processo é limitado por difusão, resultando numa taxa de adsorção dependente da concentração (Tabela 4). Acima de $0,3\text{ }\mu\text{g/ml}$, a concentração próxima à interface torna-se alta o suficiente para formar uma camada completa na interface. Depois de 60min, o patamar não se altera, e a cobertura foi calculada como 1541ng/cm^2 , correspondendo a uma ocupância média de $1401\text{Å}^2/\text{molécula}$.

Figura 59: Isotermas de adsorção da forma FAC a partir de solução sobre quatro camadas de DMPA (final hidrofílico). Tempo de adsorção (■) 5min (●) 20min (▲) 40min (▼) 60min.

Tabela 4: Taxa de adsorção da forma FAC a partir de soluções aquosas com Co^{2+} $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l em filmes LB de DMPA

Initial PLSAP concentration (µg/ml)	Adsorption rate (ng/cm ² /min)
0.05	3.2
0.10	7.9
0.15	16.5
0.20	20.9
0.30	30.5
0.50	30.5
0.80	30.5

Tabela 5: Atividade enzimática da forma FAC, adsorvida a partir de solução para um filme LB com quatro camadas de DMPA pré-preparadas, com a densidade superficial.

Concentração inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Densidade superficial de FAC (ng/cm^2)	Atividade enzimática em relação ao meio homogêneo (%)
0.15	967	2,7
0.20	1223	2,4
0.50	1541	1,7

A Tabela 5 mostra a atividade enzimática estimada para diferentes concentrações de FAC em solução. Depois de 90min, a atividade enzimática máxima não excedeu $158,4\text{nmolPNF}^{-1}\text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de enzima e correspondeu a somente 2,7% daquela observada em meio homogêneo ($5879\text{nmolPNF}^{-1}\text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de enzima – ver Tabela 3 e referência [Caseli et al., 2002]), sugerindo que um maior empacotamento e/ou orientação específica da forma FAC pode prejudicar o acesso do substrato ao sítio catalítico. Deve ser ressaltado que em densidades superficiais mais baixas (375, 540 e 750 ng/cm^2), não se detectou atividade enzimática para a forma FAC.

9.2. Espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 60 mostra os espectro na região do infravermelho para a forma FAC adsorvida sobre filmes LB de DMPA. Há bandas que aparecem nos três espectros e que são, portanto, típicas para o fosfolipídio. As bandas em 1020 e 1215 cm^{-1} correspondem ao

estiramento das ligações éter de fósforo (P-O-C), e as em 1271 e 1302 cm^{-1} correspondem ao estiramento da carbonila C=O.

São observadas também bandas típicas para a proteína, associadas às ligações peptídicas (bandas relativas ao grupo amida). Em 1303 cm^{-1} , há uma banda devido ao estiramento da ligação C-N. A absorção em 1540 cm^{-1} (banda amida II). As bandas em 1635 e 1654 cm^{-1} são atribuídas ao grupo de bandas amida I.

Os espectros para a forma FAT adsorvida (Figura 61), seja a partir da monocamada mista, seja a partir de solução, apresentaram bandas em números de onda próximos aos da forma FAC. O objetivo desses experimentos foi confirmar a adsorção da proteína aos filmes LB, e mostrar que nem para a forma FAT, tampouco para a forma FAC, houve alteração significativa nas estruturas secundárias das duas formas enzimáticas imobilizadas. As bandas encontradas têm atribuição análoga às aquelas apresentadas e discutidas para as formas FAT e FAC adsorvidas na interface ar/água. A localização da banda amida I, tanto da forma FAT, quanto da forma FAC, em 1554 cm^{-1} indica que o eixo da alfa-hélice está a 45° em relação ao plano do filme LB [Cornut et al., 1996]. No entanto, não há como saber se o elipsóide formador da cadeia polipeptídica está orientado com o eixo maior paralelo ou perpendicular ao plano do filme, uma vez que em ambos os casos, o mesmo valor de ângulo (45°) seria obtido.

Figura 60: Espectros de infravermelho por ATR para: quatro camadas de DMPA (1), quatro camadas de DMPA + 1 camada de FAC a densidade de 714ng/cm^2 (2) e de 1541ng/cm^2 (3).

Figura 61: Espectros de infravermelho por ATR para: três camadas de DMPA + uma camada de FAT adsorvida a partir da solução – densidade enzimática de 530ng/cm² (1), três camadas DMPA + 1 camada mista de DMPA/FAT a densidade de 446ng/cm² (2) e de 530ng/cm² (3).

9.3. Microscopia de força atômica e elipsometria.

A Figura 62A mostra a distribuição das moléculas de FAT adsorvidas em camadas de filmes LB a partir de uma solução $0,35\mu\text{g/ml}$ (o que proporciona uma densidade de 375ng/cm^2). A escala do eixo z, perpendicular ao plano da figura, é mostrada ao lado e distingüida pela escala de cores. Dessa forma, as regiões escuras correspondem a depressões que atribuímos a áreas não recobertas pela enzima. A adsorção da forma FAT a partir de uma solução $0,55\mu\text{g/ml}$ resultou em uma cobertura correspondente à formação de uma monocamada da enzima (540ng/cm^2), de acordo com a isoterma de adsorção apresentada na Figura 14. Na imagem B(I), observam-se domínios com maior altura que o padrão geral da camada de proteína que praticamente cobre toda a matriz fosfolipídica. Esses domínios correspondem ou à formação de uma bicamada de FAT, ou à alteração da orientação da cadeia polipeptídica. Além disso, a atividade enzimática correspondente a 8,4% em relação ao meio homogêneo (veja Tabela 6) é baixa, como já discutido, devido ao maior empacotamento superficial enzimática no filme, o que proporciona uma menor mobilidade da cadeia polipeptídica e/ou restrições de acesso ao sítio catalítico pelo substrato.

A adsorção de uma monocamada mista de DMPA/FAT resulta em uma monocamada com uma densidade superficial máxima sempre que a quantidade de proteína na cuba for suficiente para cobrir a matriz fosfolipídica (imagens C da Figura 62), resultando em uma atividade enzimática de 10% em relação ao meio homogêneo. Esse resultado pode ser atribuído à agregação da proteína na interface ar/água. As micrografias desses filmes mostram que, apesar da densidade superficial máxima de 540ng/cm^2 ter sido

atingida, há uma distribuição menos homogênea que aquela observada nas imagens para a proteína adsorvida a partir de solução (sistema de recobrimento por imersão). A inserção da âncora hidrofóbica, portanto, dirige a adsorção e promove a orientação da forma FAT. Entretanto, deve ser ressaltado que a orientação perpendicular (em relação a plano da matriz lipídica) do eixo maior do elipsóide da forma FAT é pouco provável devido à ação de uma (ou duas) âncora(s) por molécula de proteína na adsorção. Os valores de rugosidade obtidos confirmam esse resultado, uma vez uma rugosidade máxima de 59Å é obtida, e a orientação perpendicular resultaria em uma rugosidade ao menos duas vezes maior (o eixo maior do elipsóide mede em torno de 100Å)

A Figura 63 mostra a morfologia de filmes DMPA/FAC com a enzima adsorvida de sua solução, o que proporciona uma densidade superficial enzimática de 967ng/cm² e uma atividade catalítica de somente 2,7% em relação ao meio homogêneo. Filmes LB de DMPA/FAC a partir da monocamada mista não puderam ser preparados devido à alta solubilidade da enzima e ao alto volume da cuba empregada (aproximadamente 650ml). A caracterização por microscopia de força atômica mostra claramente dois diferentes padrões de morfologia, o que indica dois possíveis arranjos para a FAC: com o eixo principal do elipsóide (cadeia polipeptídica) paralelo ou perpendicular à matriz fosfolipídica. Essa interpretação pode ser corroborada pelo fato que, a partir da Figura 63, na imagem que foi obtida por contraste de fase, alguns agregados apresentam fase interna e externa semelhantes (indicado pelas setas na Figura). A densidade máxima atingida para a forma FAC é 1541ng/cm² com atividade enzimática de 1,7% em relação ao homogêneo. Pelas micrografias, pode-se concluir que a monocamada de FAC adsorvida sobre o filme LB de DMPA tem uma espessura que é aproximadamente o dobro daquela obtida para a adsorção da forma FAT (ver Tabela 6). Tomemos como base a densidade máxima para cada forma

de proteína, que corresponde à formação de uma monocamada protéica completa sobre a matriz lipídica. Para FAT, a rugosidade média é de 42 ou 38Å (dependendo do método de imobilização), enquanto para FAC esse valor é 78Å. A rugosidade máxima para forma FAT é de 59 ou 51Å², enquanto para a forma FAC, esse valor é de 109Å. Esses valores são compatíveis com as dimensões da proteína: um elipsóide com eixo maior de 100Å e menor de 50Å.

Medidas de elipsometria também mostraram que os filmes de FAC imobilizados sobre a matriz de DMPA têm espessura aproximadamente duas vezes maior que filmes de FAT (Tabela 6)

Portanto, a densidade máxima atingida para a FAC, sua baixa atividade enzimática, a comparação da rugosidade dos filmes das duas formas de enzima, e o fato que a espessura da forma FAC ser o dobro da espessura da forma FAT demanda um modelo que diferencie a orientação das duas formas de enzima quando imobilizadas aos filmes lipídicos suportados em substratos sólidos.

Figura 62: Micrografias para filmes mistos FAT/DMPA, (I) modo altura, (II) modo fase.

- (A) FAT imobilizada a partir de solução num filme LB de pré-formado com 3 camadas de DMPA, densidade protéica final $375\text{ng}/\text{cm}^2$**
- (B) FAT imobilizada a partir de solução num filme LB de pré-formado com 3 camadas de DMPA, densidade protéica final: $540\text{ng}/\text{cm}^2$**
- (C) FAT imobilizada pelo método LB a partir de uma monocamada mista de DMPA/FAT ($3,5 \mu\text{g}/\text{L}$) sobre um filme LB pré-formado com três camadas de DMPA, densidade protéica final: $540\text{ng}/\text{cm}^2$.**

Figura 63: Micrografias de força atômica de filmes LB mistos de FAC ($975\text{ng}/\text{cm}^2$)/DMPA. A enzima foi depositada a partir de uma solução ($0,15\mu\text{g}/\text{l}$) em um filme LB pré-formado com 4 camadas de DMPA. Direita: modo altura, esquerda: modo fase.

Tabela 6: Propriedades das formas FAT e FAC imobilizadas em filmes LB de DMPA . A densidade superficial foi determinada por microbalança a cristal de quartzo (MCQ). As rugosidades, por microscopia de força atômica (MFA) – modo contato intermitente. E, a espessura média (obtida em triplicata), por elipsometria, a um ângulo de incidência de 70° e considerando um índice de refração igual a 1,50.

Forma da enzima	Método de imobilização	Densidade superficial (ng/cm^2)	Rugosidade média ($\text{\AA}$)	Rugosidade máxima ($\text{\AA}$)	Espessura média	Atividade enzimática (%)*
FAT	Recobrimento por imersão	375	25	33	-	12.0
		540	42	59	36 ± 3	8.4
	Monocamada mista	540	38	51	-	10.0
FAC	Recobrimento por imersão	975	73	95	-	2.7
		1540	78	109	75 ± 5	1.7

* (comparada ao meio homogêneo)

9.4. Modelo proposto para o empacotamento superficial da fosfatase alcalina na interface sólido/ar.

Os resultados até então apresentados sugerem uma diferente orientação espacial para FAT e FAC relativa à interface, que é uma consequência da presença da parte hidrofóbica da âncora GFI. Um modelo com base na interação da monocamada mista DMPA/FAT com a superfície hidrofóbica da matriz de DMPA é mostrado na Figura 64. A adsorção da enzima ocorre através das interações hidrofóbicas da âncora GFI com as cadeias hidrocarbônicas do DMPA. Consequentemente, a densidade superficial máxima para FAT será alcançada sempre que o filme fosfolipídico for totalmente coberto por uma camada de proteína. Com efeito, a área da cadeia polipeptídica projetada na interface limita a adsorção máxima. Dados recentemente reportados para fosfatase alcalina também mostram que a adsorção da enzima ocorre através da âncora GFI e por isso, o eixo principal da cadeia polipeptídica é paralelo à superfície de adsorção. [Ronzon et al., 2002c, Rieu et al., 2002]. Ainda, de acordo com diversos autores, a âncora estaria localizada em oposição ao sítio catalítico, ou seja, na face oposta em relação ao eixo principal da enzima [Rieu et al., 2002, Le Du et al, 2001]. Por conseguinte, como a forma FAT é orientada com seu eixo maior praticamente paralelo à interface, a densidade superficial máxima resulta da área projetada da cadeia polipeptídica.

Para a forma FAC, a interpretação é mais complexa, e ao menos duas possibilidades são levantadas. A adsorção da proteína a partir da solução poderia ocorrer através de uma ponte iônica de Co^{2+} e cadeia glicana contendo o fosfato. A outra possibilidade é que alguns grupos polares da cadeia polipeptídica da forma FAC interajam com os íons cobalto.

Relatos da formação de um complexo de coordenação entre íons cobalto com fosfato e grupos amino [Smith e Martell, 1999] dão suporte à possibilidade da interação entre os grupos fosfatos da proteína e do DMPA.

Levando em conta os dados reportados para as dimensões da fosfatase alcalina de placenta humana [Rieu et al., 2002], o valor ocupado calculado de $1401 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ sugere que a forma FAT esteja orientada com eixo maior perpendicular à interface. O fato de que os dados de elipsometria e microscopia de força atômica indicarem que os filmes DMPA/FAT são aproximadamente duas vezes mais espessos e mais rugosos que os filmes DMPA/FAT são suportes adicionais que corroboram o modelo proposto para as duas formas da enzima nos filmes LB de fosfolipídio. Também levando em conta que o sítio catalítico esteja localizado na face oposta da âncora, a adsorção do elipsóide, com eixo maior perpendicular à matriz lipídica, impediria a exposição desses sítios ao meio aquoso externo, o que explicaria a menor atividade catalítica obtida para a forma FAC.

Figura 64: Modelo esquemático para deposição da forma FAT (esquerda) e FAC (direita) depositadas em filmes LB de DMPA. A adsorção ocorre pela âncora GFI com o eixo principal do elipsóide paralelo (FAT) ou perpendicular (FAC). ○ etanolamina; ◻ inositol; ○ ions cobalto; ● glicana; ● fosfato.

REFERÊNCIAS

- [1] Agrand M, Briolay A, Ronzon F, Roux B, **Eur. J. Bioch.**, 250 (1997) 168
- [2] Ahlers M, Blankenburg R, Haas H, Möbius D, Möhwald, Müller W, Ringsdorf H, Siegmund HU, **Adv. Mater.**, 3 (1991) 39
- [3] Benjamins J, de Feijter JA, Evans MTA, Graham DE, Phillips MC, **Faraday Discus.** 59 (1975) 218
- [4] Benjamins J, Cagna A, Lucassen-Reynders EH, **Colloids Surfaces A**, 114 (1996) 245
- [5] Benítez IO, Bujoli B, Camus LJ, Lee CM, Odobel F, Talham DR, **J. Am. Chem. Soc.**, 124 (2002) 4363.
- [6] Berzina TS., Troitsky VI, Petrigliano A, Alliata D, Tronin AY, Nicolini C **Thin Solid Films**, 285 (1986) 757
- [7] Bohn PW, Walls DJ, **Mikrochimica Acta**, 1 (1991) 3
- [8] Brezesinski G, Mohwald H, **Adv. Colloid Interface Sci**, 100 (2003) 563
- [9] Brockman H, **Current Opinion in Structural Biol.**, 9 (1999) 438
- [10] Blodgett KB, **J. Am. Chem. Soc.**, 56 (1934) 495
- [11] Blodgett KB, **J. Am. Chem. Soc.**, 57 (1935) 1007
- [12] Blodgett KB, Langmuir I, **Phys. Rev.**, 51 (1937a) 964
- [13] Blodgett KB, **J. Phys. Chem.**, 41 (1937b) 975
- [14] Blume A, **Biochim. Biophys. Acta**, 557 (1979) 32
- [15] Buffeteau T, Desbat B, Turlet JM., **Appl. Spectrosc.**, 45 (1991) 380
- [16] Bull HB, **J. Phys. Chem.**, 41 (1937) 984
- [17] Bull HB, **J. Am. Chem. Soc.**, 67 (1945a) 4
- [18] Bull HB, **J. Am. Chem. Soc.**, 67 (1945b) 8
- [19] Bull HB, **J. Am. Chem. Soc.**, 67 (1945c) 10
- [20] Byler DM, Susi H, **Biopolymers**, 25 (1986) 469
- [21] Camolezi FL, Pizauro JM, Leone FA, Ciancaglini PJ, **Biochem. Educ.**, 27 (1999) 37
- [22] Camolezi FL, Daghestanli KRP, Magalhães PP, Pizauro JM, Ciancaglini P (2002) **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, (34) 1091
- [23] Caseli L, “Adsorção e atividade enzimática da fosfatase alcalina de placa óssea de ratos em monocamadas líquidas e filmes Langmuir-Blodgett de fosfolipídios” – Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2001.
- [24] Caseli L, Zaniquelli MED, Furriel RPM, Leone FA, **Colloids Surfaces B**, 25 (2002) 119
- [25] Caseli L, Zaniquelli MED, Furriel RPM, Leone FA, **Colloids Surfaces B**, 30 (2003a) 273
- [26] Caseli L, Massui DC, Furriel RPM, Leone FA, Oliveira RG, Maggio B, Zaniquelli MED, “Correlation between the enzymatic activity and the surface packing of alkaline phosphatase in

phospholipid Langmuir monolayers” – Trabalho apresentado no “V Congresso Ibero-Americano de Biofísica” – Rio de Janeiro, 2003b –Livro de Resumos- trabalho 142.

[27] Chamberlain JR, Pemberton JE, **Langmuir**, 13 (1997) 3074

[28] Chapman D, **Phil. Mag.**, 25 (1913) 475

[29] Chen P, Prokop RM, Susnar SS, Neumann AW, em: Möbius D, Miller R (Eds), “Protein at Liquid Interfaces, Studies of Interface Science, vol.2, Elsevier, 1998, p.303, Amsterdã (Países Baixos)

[30] Ciancaglini P, Pizauro JM, Grecchi MJ, Curti C, Leone FA, **Cell. Mol. Biol.**, 25 (1989) 503

[31] Cheng P, Li D, Boruvka L, Rotenberg Y, Neumann AW, **Colloids Surfaces**, 43 (1990) 151

[32] Ciancaglini P, “Fosfatase alcalina induzida por matriz óssea: solubilização com polioxietileno 9-lauril éter e modulação da atividade de fosfomono-hidrolase por íons metálicos divalentes”
Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1989.

[33] Ciancaglini P, Pizauro JM, Leone FA, **J. Inorg. Biochem.**, 60 (1995) 155

[34] Ciancaglini JM, Pizauro AA, Rezende AA, Rezende LA, Leone FA, **Int. J. Biochem.**, 22 (1990) 385

[35] Cornec M, Narsimhan G, **J. Agricultural Food Chem.**, 46 (1998) 2490

[36] Cornut I, Desbat B, Turlet JM, Dufourcq J, **Biophys. J.**, 70 (1996) 305

[37] Curti C, Pizauro JM, Rossinholi G, Vugman I, Mello de Oliveira JA, Leone FA, **Cell. Mol. Biol.**, 32 (1986) 55

[38] Damos FS, Mendes RK, Kubota LT, **Quimica Nova**, 27 (2004) 970

[39] Davies JT. Rideal EK, **Interfacial Phenomena, Academic Press**, Nova Iorque, 1963

[40] De la Fournière L, Nosjean O, Buchet R, Roux B., **Biochim. Biophys. Acta**, 1068 (1995) 186

[41] Decher G, Klinhammer F, **Mackromolekulare Chemie-Macromolecular Symposya**, 46 (1991) 19

[42] Demel RA, London Y, Geurts van Kessel WSM, Vossenberg FGA, van Deenen LLM, **Biochem. Biophys. Acta**, 311 (1973) 507

[43] Dietrich C, Volovyk ZN, Levi M, Thompson NL, Jacobson K, **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 98 (19) (2001) 10642

[44] Doty P, Schulman JH, **Disc. Faraday Soc.**, 6 (1949) 21

[45] Dziri L, Puppala K, Leblanc RM, **J. Colloid Interface Sci.**, 194 (1997) 37

[46] Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, Gratton E, **Biophys. J.**, 80 (2001) 1417

[47] Fainerman VB, Miller R, Em “Studies of Interface Science”, Möbius D, Miller R, eds., vol. 7, Elsevier: Amsterdam, Países Baixos, 1998

[48] Fainerman VB, Zhao J, Vollhardt D, Makievski AV, Li JB, **J. Phys. Chem. B**, 103 (1999) 8998

[49] Fendler JH, Meldrum FC, **Adv. Mater.**, 7 (1995) 607

- [50] Feng S, **Langmuir**, 15 (1999) 998
- [51] Ferguson MA, **J.Cell.Sci.**, 112 (1999) 2799
- [52] Gavrilyuk IV, Kazantseva ZI, Lavrik NV, Nabok AV, Nesterenko BA, Shirshov YM, Styopkin VI, **Biologicheskie Membrany**, 7 (1990) 1193
- [53] Girard-Egrot AP, Morélis RM, Coulet PR, **Thin Solid Films**, 292 (1997) 282
- [54] González G, MacRitchie F, **J. Colloid Interface Sci.**, 32 (1970) 55
- [55] Gouy G, **J. Physique**, 9 (1910) 457
- [56] Graham DE, Philips MC, **J. Colloid Interface. Sci.** 70 (1979) 403
- [57] Hansma HG, Gould SAC, Hansma PK, Gould SAC, Hansma PK, Gaub HE, Longo ML, Zasadzinski JAN, **Langmuir**, 7 (1991) 1051
- [58] Höning D, Möbius D, **J. Chem. Phys.**, 101 (1994) 10045
- [59] Hoylaerts MF, Manes T, Millan JL, **J. Biol. Chem.**, 272 (1997) 22781
- [60] Jacobson K, Dietrich C, **Trends in Cell Biol.**, 9 (1999) 87
- [61] Kern W, **J. Electrochem. Soc.**, 137 (1990) 1887
- [62] Kjaer K, Alsnielsen J, Helm CA, Laxhuber LA, Möhwald H, **Phys. Rev. Letters**, 58 (1987) 2224
- [63] Krause, J.P.; Wüstneck, R.; Seifert, A.; Schwenke, K.D.; **Colloid Surfaces B**, 10 (1998) 119
- [64] Langmuir I, **J. Am. Chem. Soc.**, 56 (1917) 1848
- [65] Le Du MH, Millán JL, **J. Biol. Chem.**, 52 (2002) 49808
- [66] Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, Menez A, Stura EA, **J. Biol. Chem.**, 276 (2001) 9158
- [67] Lee DC, Chapman D, **Biosci. Rep.**, 6(3) (1986) 235
- [68] Leone FA, Pizauro JM, Ciancaglini P, **Int. J. Biochem.**, 24 (1992)
- [69] Leone FA, Ciancaglini P, Pizauro JM, Rezende AA, **Biometals**, 8 (1995) 86
- [70] Leone FA, Pizauro JM, Ciancaglini P, **Trends Comp. Biochem. Physiol.**, 3 (1997) 57
- [71] Lehto MT, Sharom F, **Biochemistry**, 41 (2002) 8368
- [72] Löschhe M, Sackmann E, Möhwald H, Ber Bunsenges, **Phys. Chem.**, 87 (1983) 848
- [73] Low MG, Zilversmit DB, **Biochemistry**, 19 (1980) 3913
- [74] Lucassen J, van den Tempel M, **Chem.Eng.Sci.**, 27 (1972) 1283
- [75] Lunkenheimer K, Kretzschmar G, **J. Phys. Chem.**, 256 (1975) 593
- [76] Maget-Dana R, Ptak M, **Colloids Surfaces B**, 7 (1996) 135
- [77] Maget-Dana R, **Biochim. Biophys. Acta**, 1462 (1999) 109
- [78] Makievski AV, Wüstneck R, Grigoriev DO, Krägel J, Trukhin DV, **Colloids Surfaces A**, 143 (1998) 461
- [79] Marsh D, **Biochim. Biophys. Acta**, 1286 (1996) 183
- [80] Medeiros CL, Serra OA, Zaniquelli MED, **Thin Solid Films**, 248 (1994) 115
- [81] Medof ME, Shanmugam N, Tykocinski ML, **FASEB J.**, 10 (1996) 574
- [82] Mendelsohn R, Mantsch HH, Em Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction. Progress in protein-lipid interactions. Watts A, de Pont JJHM, Eds. Elsevier: Amsterdam, 1986; Vol. 2, pp 103-146

- [83] Meunier J, **Colloids Surfaces A**, 171 (2000) 33
- [84] Meyer E, Howald L, Overney RM, Heinzelmann, Frommer J, Güntherfodt HJ, Wagner T, Schier H, Roth, **Nature**, 349 (1991) 398
- [85] Micol V, Sánchez-Piñera P, Villalain J, de Godos A, Gómez-Fernández JC, **Biophys. J.**, 76 (1999) 151
- [86] Milhiet PE, Giocondi MC, Baghdadi O, Ronzon F, Roux B, Le Grimellec C, **EMBO**, 3(5) (2002) 485
- [87] Miller R, **Colloid Polymer Sci.**, 259, (1981), 375
- [88] Miller R, Fainerman VB, Makievski AV, Krägel J, Grigoriev DO, Kazakov VN, Sinyachenko OV, **Adv. Coll. Interf. Sci.**, 86 (2000) 39
- [89] Miller R, Akseneko EV, Fainerman VB, Pison U, **Colloids Surfaces B**, 183-185 (2001) 381
- [90] Mitchell ML, Dluhy RA, **J. Am. Chem. Soc.**, 110 (1988) 712
- [91] Morgan H, Taylor DM, Oliveira ON, **Thin Solid Films**, 178 (1989) 73
- [92] Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Menez A, Le Du MH, **J. Biol. Chem.**, 276 (2001) 31171
- [93] Murray BS, Ventura A, Lallemant C, **Colloids Surfaces A**, 143 (1998) 211
- [94] Miyazawa T, Blout ER, **J. Am. Chem. Soc.**, 83 (1961) 712
- [95] Noinville S, Revault M, Baron MH, **Biopolymers**, 67 (2002) 323.
- [96] Nosjean O, **Nature Biotechnol.**, 16 (1998) 799
- [97] Nosjean O, Briolay A, Roux B, **Biochim. Biophys. Acta**, 1331 (1997) 153
- [98] Nosjean O, Roux B, **Eur. J. Biochem.**, 263 (1999) 865
- [99] Ohmori S, Ito S, Yamamoto M, **Macromolecules**, 24 (1991) 2377
- [100] Okahata Y, Ariga J, **J.Chem. Soc. Chem. Commun.**, (1987) 1535
- [101] Okahata Y, Ariga K, **Thin Solid Films**, 465 (1989) 178
- [102] Okahata Y, Tsuruta T, Ijio K, Ariga K, **Thin Solid Films**, 180 (1989) 65
- [103] Oliveira ON, Bonardi C, **Langmuir**, 13 (1997) 5920
- [104] Onda M, Lvov Y, Ariga K, Kunitake T, **Biotechnol. Bioeng.**, 51 (1996) 163.
- [105] Outka DA, Stöhr J, Rabe JP, Swalen JD, Rotermund HH, **Phys. Rev. Lett.** 59 (1987) 1321
- [106] Perez-Matteos M, Busto MD, Rad JC, **J. Sci. Food Agric.**, 55 (1991) 229
- [107] Petrigliano A, Tronin A, Nicolini C, **Thin Solid Films**, 285 (1996) 752
- [108] Paddeu S, Erokhin V, Nicolini C, **Thin Solid Films**, 284-285 (1996) 854
- [109] Pastorino L, Berzina TS, Troitsky VI, Fontana MP, Bernasconi E, Nicolini C, **Colloids Surfaces B**, 23 (2002) 357
- [110] Pizauro JM, Ciancaglini P, Leone FA, **Brazilian J. Medical Biol. Res.**, 27 (1994) 453
- [111] Pizauro JM, Ciancaglini P, Leone FA, **Mol. Cell. Biochem.**, 152 (1995) 121
- [112] Ravera F, Liggieri L, Miller R, **Colloids Surfaces A**, 175 (2000) 51
- [113] Rieu JP, Ronzon F, Roux B, **Thin Solid Films**, 406 (2002) 241

- [114] Rieu JP, Ronzon F, Place C, Dekkiche F, Cross B, Roux B, **Acta Biochim. Polonica**, 51 (2004) 189
- [115] Ronzon F, Desbat B, Buffeteau T, Mingotaud C, Chauvet JP, Roux B, **J. Phys. Chem. B**, 106 (2002a) 3307
- [116] Ronzon F, Desbat B, Chauvet JP, Roux B, **Colloid Surfaces B**, 23 (2002b) 365
- [117] Ronzon F, Desbat B, Chauvet JP, Roux B, **Biochim. Biophys Acta**, 1560 (2002c) 1
- [118] Ronzon F, Morandat S, Roux B, Bortoloto M, **J. Membrane Biol.**, 197 (2004) 169
- [119] Rotenberg Y, Boruvka L, Neumann AW, **J. Colloid Interface Sci.**, 83 (1983) 169
- [120] Rothen A, **Revi. Scientific Instruments**, 16 (1945) 26
- [121] Ruckenstein E, Bhakta A, **Langmuir**, 10 (1994) 2674.
- [122] Saslowsky DE, Lawrence J, Ren X, Brown DA, Henderson RM, Edwardson JM, **J. Biol. Chem.**, 26 (2002) 26966
- [123] Seelig A, **Biochim. Biophys. Acta**, 889 (1987) 196
- [124] Sharom F, Lehto MT, **Biochem. Cell. Biol.**, 80 (2002) 535
- [125] Silva RF, Zaniquelli MED, Serra OA, Torriani IL, de Castro SGC, **Thin Solid Films**, (1998) 245.
- [126] Simons K, Ikonen E, **Nature**, 387 (1997) 569
- [127] Singer SJ, Nicolson GL, **Science**, 175 (1972) 720
- [128] Sinyachenko OV, **Adv. Coll. Interf. Sci.**, 86 (2000) 39
- [129] Smaby JM, Kulkarni VS, Momsen M, Brown RE, **Biophys. J.**, 70 (1997) 868
- [130] Smith RM, Martell AE, em "Critical Stability Constants"; Plenum Press, Nova Iorque Estados Unidos, 1989, vol. 6.
- [131] Suttiprasit P, Krisdhasima V, McGuire J, **Colloid Interface Sci**, 154 (1992) 316
- [132] Ter-Ninassian-Saraga L, Okamura E, Umemura J, Takenaka T, **Biochim. Biophys. Acta**, 1068 (1988) 417
- [133] Ting, L., Wasan, D.T. and Miyano, K., **J. Colloid Interface Sci.**, 107 (1985) 345
- [134] Ting L, Wasan DT, Miyano K, **J. Colloid Interface Sci.** 107 (1985) 345
- [135] Tian Y, Holt RG, Apfel RE, **J. Colloid Interface Sci.** 187 (1977) 1
- [136] Van Eijk MCP, Cohen Stuart MA, **Langmuir**, 13 (1997) 5447
- [137] Ward AFH, Tordai, **J. Chem. Phys.**, 14 (1946) 453
- [138] Warszynski P, Wantke KD, Fruhner H, **Colloids Surfaces A**, 189 (2001) 29
- [139] Wüstneck R, Krägel J, Miller R, Fainermann VB, Wilde PJ, Sarker DK, **Food Hydrocolloids**, 10 (1996) 395.
- [140] Zhang J, Pelton R, **Langmuir**, 15 (1999) 5662
- [141] Zholkovskij EK, Kovalchuk VI, Fainerman VB, Loglio G, Kragel J, Miller R, Zholob SA, Dukhin SS, **J. Colloid Interface Sci.** 224 (2000) 47
- [142] Zougrana T, Findenegg GH, Norde W, **J. Colloid Interface Sci.**, 190 (1997) 437

massa de proteína ads