

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSITITUTO FÍSICA

**PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE
DISPERSÕES LIPÍDICAS CARREGADAS
DE DIMIRISTOIL FOSFATIDILGLICEROL:
VARIAÇÕES COM A TEMPERATURA E FORÇA IÔNICA DO MEIO**

KARIN DO AMARAL RISKE

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Maria Teresa Lamy Freund

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física da Universidade
de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Física

São Paulo

1997

**PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE DISPERSÕES LIPÍDICAS
CARREGADAS DE DIMIRISTOIL FOSFATIDILGLICEROL:
VARIAÇÕES COM A TEMPERATURA E FORÇA IÔNICA DO MEIO**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Física

Área de concentração: Física do Estado Sólido (Biofísica)

Karin do Amaral Riske

Orientadora:

Maria Teresa Lamy Freund
Instituto de Física da USP-SP

Banca examinadora:

Vera Bohomoletz Henriques
Instituto de Física da USP-SP

Ana Maria Carmona Ribeiro
Instituto de Química da USP-SP

São Paulo
1997

À minha mãe,
a quem devo tudo

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.”

Livro dos Conselhos

AGRADECIMENTOS

À Teresa pela orientação amigável e pelo seu constante bom humor e empolgação, que tantas vezes foram fundamentais para mim durante o trabalho

À minha mãe, por ter sido meu apoio e referência na vida, e, especificamente, pelas importantes contribuições teóricas sobre espalhamento de luz

Ao Prof. Wayne F. Reed pela importante contribuição na análise dos Zimm plots e por introduzir novas idéias ao trabalho

Ao Prof. Mario Politi pela colaboração e permissão da utilização do aparelho de espalhamento de luz a vários ângulos e do condutivímetro

À Prof^a Shirley Schreier pela permissão de utilização do aparelho de RPE e pelas importantes discussões

Ao Fábio, aluno do Prof. M. Politi, pela paciência e ajuda na obtenção dos Zimm plots

A todos do Departamento de Bioquímica que contribuíram durante o trabalho

Às Prof^{as} Vera Henriques e Carla Goldmann pelas importantes contribuições teóricas de Mecânica Estatística

Aos Laboratórios de Física para Ciências Farmacêuticas e Biológicas, e de Estrutura da Matéria pelo empréstimo do refratômetro e da lâmpada de sódio

À Marcia, que sempre esteve disposta a ajudar nos meus problemas de relacionamento pessoal com o aparelho de RPE, e por me ensinar vários procedimentos experimentais

Ao Roberto, técnico do nosso laboratório, pela constante ajuda

Às companheiras de sala Marta e Rozane pelo apoio, compreensão e amizade

A todos do Grupo de Biofísica e Física Médica que estiveram presentes durante a realização deste trabalho

Aos Professores Henrique Fleming, Jorge Lyra e Ricardo Galvão pelo importante papel que desempenharam na minha formação acadêmica

Aos amigos Marcia, Marisa, Munir e Rafael, responsáveis por boa parte da minha diversão e alegria nesses anos

Às amigas e companheiras de tantos cursos, Helena, Nara e Neli

Ao CNPq pelo auxílio financeiro

RESUMO

A dependência com a temperatura da intensidade de luz espalhada por dispersões aquosas do lipídio aniônico DMPG (dimiristoil fosfatidilglicerol) foi estudada para diferentes forças iônicas. A transição principal, gel - líquido cristal, pode ser bem monitorada por um decréscimo abrupto na turbidez. Como esperado, a temperatura da transição de fase principal (T_m) aumenta com o aumento da força iônica. Para baixa força iônica, uma segunda transição com a temperatura para o DMPG, chamada de pós-transição, pode ser monitorada tanto por um aumento no espalhamento de luz quanto por um decréscimo na condutividade. Análises de “Zimm plot” indicam que abaixo de T_m os lipossomos tendem a se agregar, resultando em um segundo coeficiente de virial, A_2 , negativo, e em uma grande massa molecular da partícula. Na transição de fase, juntamente com uma diminuição na turbidez, ocorre um aumento na condutividade da amostra, A_2 torna-se positivo e a massa molecular da partícula diminui, indicando um estado não agregado. Além disso, na pós-transição (T_p) A_2 torna-se muito pequeno, e a massa molecular aumenta novamente. Ambas as transições são reversíveis. Opostamente à transição principal, a pós-transição não pôde ser detectada por marcadores de spin situados tanto na superfície da membrana quanto em seu interior. Considerando um aumento na área por cabeça polar do lipídio após a transição principal, e o modelo de Stern-Gouy-Chapman, foi possível mostrar que a transição causa um aumento no grau de dissociação da vesícula, aumentando portanto a concentração de íons em solução. Entretanto, dentro da estrutura desse modelo simples, foi necessário considerar diferentes constante de associação Na^+ -DMPG nas fases gel e líquido cristal, para explicar um aumento na repulsão entre as vesículas com a transição principal. Os mecanismos que governam a pós-transição são ainda menos claros.

ABSTRACT

The temperature dependence of the intensity of light scattered by aqueous dispersions of the anionic lipid DMPG (dimyristoyl phosphatidylglycerol) was studied at different ionic strengths. The lipid main transition, gel-liquid crystal, can be well monitored by a sharp decrease in turbidity. As expected, the temperature of the main transition (T_m) was found to increase with the increase of the ionic strength. For low ionic strength, a DMPG second temperature transition, named post-transition, can be monitored by both an increase in light scattering and a decrease in conductivity. Zimm plot analysis indicates that below T_m the liposomes tend to aggregate, yielding a negative second virial coefficient A_2 , and particles of large molecular weight. At the phase transition, parallel to the decrease in turbidity, there is an increase in the sample conductivity, A_2 becomes positive and the particle molecular weight decreases, indicating a non-aggregated state. Moreover, at the post-transition (T_p) A_2 becomes very small, and the molecular weight increases again. Both the main and post transitions were found to be reversible. Opposite to the main transition, the post-transition could not be detected by spin labels placed either at the membrane surface, or in the bilayer core. Considering an increase in area per lipid headgroup upon the main transition, and the Stern-Gouy-Chapman model, it was possible to show that the main transition increases the vesicle degree of dissociation, hence increasing the ion concentration in solution. However, within the framework of that simple model, it was necessary to consider different Na^+ -DMPG association constants, in the gel and liquid phases, to explain an increase in vesicles repulsion upon the main transition. The mechanisms governing the post-transition are even less clear.

Abreviações

12-PCSL	1-Palmitoil-2-(12-Doxilestearoil) fosfatidilcolina
5-PCSL	1-Palmitoil-2-(5-Doxilestearoil) fosfatidilcolina
A_2	segundo coeficiente de virial
A_{\max}	desdobramento hiperfino máximo
C_p	calor específico
CSL	3-doxil-5-colestano
DMPC	dimiristoil fosfatidilcolina
DMPG	dimiristoil fosfatidilglicerol
doxil	4,4-dimetiloxadolidina-N-oxil
DSC	calorimetria diferencial de varredura
hepes	ácido N- (2-Hidroxietil)-Piperazina-N'-2-etano sulfônico
h_0/h_{+1}	razão entre o pico central e o primeiro no espectro de RPE
KCl	cloreto de potássio
M_w	massa molecular
n	índice de refração
n-SASL	ácido n-doxil esteárico; $n = 5, 7, 9, 12$
Na_2SO_4	sulfato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
$NaClO_4$	perclorato de sódio
PG	fosfatidilglicerol
R_g	raio de giração
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
σ	distribuição superficial de carga
SSL	4-estereamina-1-oxil-2, 2, 6, 6-tetrametil piperidina
T_m	temperatura da transição de fase principal
T_p	temperatura da pós-transição
Ψ_0	potencial de superfície da membrana

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1		
TEORIA	6		
1. ESPALHAMENTO DE LUZ	6		
Espalhamento de Rayleigh	6		
Espalhamento de Debye	13		
Zimm Plots.....	15		
2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	18		
Condição de ressonância	18		
Desdobramento hiperfino	20		
Anisotropia	21		
Espectros de marcador de spin em membranas	24		
Equilíbrio térmico, relaxação e tempo de correlação	26		
3. TEORIA DE GOUY-CHAPMAN	29		
Pressão entre duas superfícies carregadas	32		
MATERIAIS	E	MÉTODOS	34
1. MATERIAIS			34
2. MÉTODOS			34
Dispersões lipídicas			34
Ajuste de pH			36
Dosagem de fosfato			38
Medidas de espalhamento a 90°			39
Medidas de RPE			39
Medidas de índice de refração			40
Medidas de espalhamento de luz a vários ângulos			40
Medidas de condutividade			41
RESULTADOS E DISCUSSÕES			42
1. ESPALHAMENTO A 90°			42
Variação da força iônica do meio			43
Variação da concentração lipídica			48
Variação da estrutura, tipo de sal e ajustes de pH			50

2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	55
Variação da força iônica do meio	57
Variação da concentração lipídica e estrutura da membrana	63
Partição do marcador em água	64
3. ÍNDICE DE REFRAÇÃO	66
4. ZIMM PLOTS	71
5. CONDUTIVIDADE	75
6. DISTRIBUIÇÃO DE CARGAS NA SUPERFÍCIE DE VESÍCULAS DE DMPG	77
(DISCUSSÕES E CÁLCULOS)	
Efeito de sal e pH em T_m (revisão bibliográfica)	77
Estimativa de área por cabeça polar do DMPG (revisão bibliográfica).....	79
Cálculo do grau de ionização α	80
DMPG em água pura	83
Cálculo de Ψ_o , $\Psi(x)$, $\rho(x)$ e $P(x)$	84
i) Variação com a força iônica.....	85
ii) Efeito da transição de fase.....	89
CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	97

INTRODUÇÃO

As membranas biológicas são compostas principalmente por lipídios e proteínas, no entanto são os lipídios que fornecem a estrutura na qual as proteínas estão inseridas. A membrana biológica fornece uma divisão entre o meio intra e o meio extracelular, além de definir vários compartimentos, como as organelas dentro das células (mitocondria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, etc...). Nas membranas biológicas é encontrada uma enorme variedade de composição, garantindo a elas uma alta especificidade e funcionalidade. Toda a comunicação da célula ou dos outros compartimentos com o exterior é feita através da membrana. O transporte de íons e moléculas através desta é, em geral, feito seletivamente por canais iônicos e proteínas receptoras, no entanto a fase lipídica pode ser importante nesses processos, induzindo uma determinada estrutura na proteína receptora. Os lipídios presentes nas membranas biológicas são moléculas anfifílicas que possuem, em geral, duas cadeias hidrocarbônicas (hidrofóbicas) e uma cabeça polar (hidrofílica) que pode ou não estar carregada. A maioria das membranas biológicas é negativamente carregada, contendo em média 30 % de cabeças polares negativas, e a densidade superficial de cargas muitas vezes é importante na interação de proteínas e hormônios positivamente carregados (Jost & Griffith, 1982), já que a concentração de moléculas positivas próxima à superfície da membrana é maior, como descrito pela distribuição de Boltzmann.

Na membrana natural existem vários tipos de lipídios, com cadeias hidrocarbônicas de diferentes tamanhos e com diferentes graus de insaturação (duplas ligações C=C) e com diferentes cabeças polares. Como os lipídios fornecem a estrutura básica da maioria das membranas, o estudo de sua estrutura é de fundamental importância biológica. Muitos desses estudos são feitos em membranas modelos, que são bicamadas preparadas artificialmente e geralmente com apenas um tipo de lipídio ou com uma mistura conhecida. As bicamadas preparadas artificialmente são também muito usadas como carregadoras de drogas no organismo, pois as membranas são capazes de absorver a vesícula através do processo de fusão e liberar a droga no interior da célula (Lasic, 1992).

Em presença de água os lipídios, por serem moléculas anfifílicas, tendem a uma estrutura na qual o contato das caudas hidrofóbicas com a água é mínimo. Isto ocorre devido a um fator entrópico das moléculas de água quando em contato com uma substância apolar. A estrutura da água é bastante complexa e formada por uma extensa rede de pontes de hidrogênio. Se temos uma cadeia hidrofóbica em uma solução aquosa as moléculas de água são obrigadas a se estruturarem em volta das cadeias hidrofóbicas

de forma a manter o maior número possível de pontes de hidrogênio entre si, aumentando a entropia do sistema. Como não existe interação eletrostática entre a água e uma substância apolar que possa contrabalancear o aumento da entropia, como no caso da solvatação de um íon na água, é termodinamicamente favorável a formação de estruturas entre as moléculas anfífilas que escondam as regiões hidrofóbicas do contato com a água (Gennis, 1989).

A forma das estruturas de moléculas anfífilas em meio aquoso depende principalmente da relação entre o comprimento da cadeia hidrofóbica, seu volume e a área ocupada pela cabeça polar (Kumar, 1991). Se a cabeça polar é muito grande em relação à cauda em geral ocorre a formação de estruturas com uma grande curvatura (como micelas - figura int-1a). Esse é o caso de detergentes, que possuem somente uma cadeia hidrocarbônica e uma cabeça polar, que pode estar carregada, como no SDS (dodecil sulfato de sódio) e portanto ocupar uma área grande. Por outro lado se as dimensões da cabeça polar são da ordem das dimensões das caudas, então a estrutura mais estável são as bicamadas (fig. int-1b e c). Esse é o caso da maioria dos fosfolípidios, que possuem duas cadeias apolares e uma cabeça polar. No entanto existem muitos lípidios que não formam bicamadas, como fosfatidil etanolamina insaturada, cardiolipina- Ca^{2+} , monogalactosildiglicéride e outros. As propriedades das dispersões lipídicas têm sido vastamente estudadas, tanto pelo interesse biológico quanto pelo fato de serem um sistema físico-químico muito interessante. As bicamadas lipídicas são caracterizadas por uma ordem bidimensional no alinhamento das moléculas.

Fig. int-1: Possíveis formas de agregados de lípidios: a) micela; b) bicamada unilamelar e c) multibicamada

Praticamente todas as dispersões lipídicas puras apresentam uma transição de fase principal a uma temperatura T_m (“melting”), na qual as cadeias hidrocarbônicas passam de uma configuração toda estendida (“all-trans”) para uma configuração mais desordenada, com o surgimento de dobras (ligações “gauche”) na cadeia (fig. int-2). Muitas vezes essa transição é interpretada como uma fusão das cadeias hidrocarbônicas. A temperatura onde ocorre essa transição depende de vários fatores, como tamanho da cadeia hidrofóbica, grau de insaturação e tamanho e grau de ionização da cabeça polar. Para uma membrana com diferentes constituintes, como é o caso de membranas biológicas, não existe transição de fase, pois o efeito cooperativo entre as cadeias hidrocarbônicas é reduzido devido às diferentes espécies presentes. No entanto o estudo das transições de fase também tem importância biológica, pois muitas vezes são encontrados domínios nas membranas biológicas que apresentam uma pureza maior, e que podem encontrar-se numa fase definida.

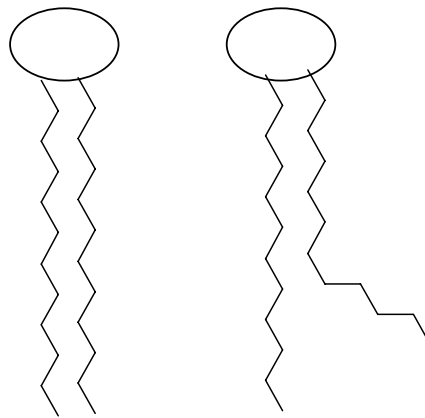


Fig. int-2: Representação esquemática a) da configuração de um lipídio na fase gel (cadeia toda estendida), e b) de uma ligação “gauche” que pode ocorrer na cadeia de um lipídio na fase líquido-cristalina.

Na fase abaixo de T_m , chamada de fase gel, as cadeias estão na configuração mais empacotada possível, já que as cadeias estão todas estendidas. Essa característica confere ao sistema uma maior ordem e uma maior interação entre as cadeias (forças de Van der Waals). Se a área da cabeça polar é maior que a área ocupada pelas cadeias, geralmente é vantajoso que estas estejam inclinadas em relação à superfície da bicamada, para que possam ficar mais próximas. Alguns lipídios, como o DMPC, e DMPG em algumas condições específicas, apresentam uma pré-transição que leva a uma fase ondulada, onde além da inclinação das cadeias ocorre uma ondulação na superfície da membrana. Na fase gel a penetração de água na região polar da membrana é praticamente desprezível.

Na transição de fase principal ocorre um efeito cooperativo no qual as conformações das cadeias mudam bastante. O principal acontecimento é o surgimento de várias ligações “gauche”, praticamente inexistentes na fase gel. Com isso o volume ocupado pelas cadeias aumenta bastante (fig. int-2), conseqüentemente aumentando a área por cabeça polar e diminuindo a interação entre as cadeias, a ordem do sistema e a espessura da membrana. O estado líquido-cristalino é então caracterizado por um movimento maior das cadeias dentro da membrana e por uma fluidez maior da mesma. A estrutura se torna menos empacotada, possibilitando uma maior penetração de moléculas de água na região polar. No entanto a ordem bidimensional da bicamada é mantida.

A influência de cargas na transição de fase de membranas tem sido bastante estudada (Träuble & Eibl, 1974; Träuble et al., 1976; Jähnig, 1976; Cevc et al., 1980, 1981; Eibl, 1983) e é de grande importância para sistemas biológicos, já que as membranas biológicas possuem uma densidade superficial de cargas negativa, como já mencionado. A presença de cargas na superfície diminui a temperatura de transição de fase, devido à repulsão entre as cabeças polares, favorecendo o estado menos empacotado. A presença de íons em solução é de extrema importância nesse estudo, já que pode ocorrer o fenômeno de blindagem eletrostática.

É de fundamental importância entender a interação de membranas lipídicas com proteínas e drogas, já que este é um processo biológico importantíssimo. O trabalho do grupo de Biofísica da USP tem sido focalizado no estudo da interação de peptídeos melanotrópicos e outras moléculas pequenas com membranas fosfolipídicas modelo neutras e negativamente carregadas. A caracterização termotrópica das dispersões lipídicas é portanto muito relevante.

O presente trabalho estuda o comportamento de dispersões lipídicas de um fosfolípido específico, o dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), cuja estrutura está mostrada de forma esquemática na figura mat-1. Esse fosfolípido é encontrado principalmente nas

membranas de bactérias e plantas (McFairland, 1964 e Rooney et al., 1974). O DMPG possui um grupo fosfato, que a pH neutro está praticamente todo ionizado. A cadeia hidrocarbônica do DMPG possui 14 carbonos, todos saturados (sem dupla ligação). A temperatura de transição de fase desse lipídio varia de 16°C a 42°C, dependendo da força iônica e pH da solução e da concentração lipídica (Watts et al., 1978; Cevc et al., 1980; Salonen et al., 1989; Heimbürg & Biltonen, 1994).

O estudo feito neste trabalho é baseado principalmente na técnica de espalhamento de luz, que se mostrou bastante sensível às variações ocorridas durante a transição principal. Na fase gel a amostra é turva e após T_m ocorre um grande decréscimo na intensidade de luz espalhada, quando a amostra fica transparente.

Além da transição principal, encontrou-se uma segunda transição, chamada aqui de pós-transição, para algumas faixas de força iônica do meio. Após essa transição a intensidade de luz espalhada aumenta novamente, atingindo valores comparáveis aos obtidos na fase gel. O intervalo de temperatura no qual a amostra permanece no estado de baixo espalhamento é extremamente dependente da força iônica do meio e da concentração lipídica. Encontramos poucas referências na literatura a essa segunda transição (Heimbürg & Biltonen, 1994; Salonen et al., 1989).

Durante o trabalho são discutidas possíveis mudanças ocorridas após as transições de fase, levando em consideração a teoria de Gouy-Chapman e possíveis mudanças estruturais. São comentadas também as relações destas mudanças com as variações de luz espalhada observadas experimentalmente, usando a equação de espalhamento de Debye-Rayleigh.

TEORIA

1. ESPALHAMENTO DE LUZ

A teoria de espalhamento de luz é bem complexa, e existem vários modelos, tanto clássicos como quânticos, para descrever esse fenômeno. Aqui será feito apenas uma discussão da sequência de passos e das hipóteses envolvidas, e não a completa dedução da teoria, para que seja possível o entendimento da equação do espalhamento de Debye-Rayleigh, usada no método de Zimm. As principais fontes bibliográficas foram Hiemenz (1984, 1986), Kerker (1969), Ware (1984) e Kratochvíl (1987).

A teoria de espalhamento de luz para partículas cujas dimensões são pequenas comparadas ao comprimento de onda da luz foi desenvolvida por Lord Rayleigh em 1871 como uma explicação da cor e polarização dos raios solares. Essa teoria fornece uma dependência da intensidade da luz espalhada com λ^{-4} . No entanto a teoria só é válida para objetos nos quais não ocorra interferência entre os raios espalhados pelas diferentes regiões do objeto.

A teoria de espalhamento de luz é válida para qualquer comprimento de onda. Para soluções poliméricas ou macromoléculas usualmente utiliza-se luz visível, cujos comprimentos de onda variam de 400 a 750 nm. No entanto muitas vezes temos centros espalhadores cujas dimensões são da mesma ordem de grandeza da luz incidente, causando efeitos de interferência, que tornam a teoria mais complicada. Uma saída seria usarmos comprimentos de onda maiores, no entanto muitas moléculas orgânicas apresentam absorvância na região do infra-vermelho, dificultando as medidas de espalhamento.

A teoria de Debye fornece uma correção à teoria de Rayleigh, sendo aplicável à moléculas maiores, onde os efeitos de interferência intraparticulares são importantes. Primeiramente vamos chegar à expressão obtida por Lord Rayleigh para o espalhamento de partículas pequenas.

Espalhamento de Rayleigh - Assumindo uma radiação eletromagnética propagando-se na direção x, os campos oscilantes elétrico e magnético estarão no plano yz. Para o espalhamento só terá importância a componente elétrica da radiação, que terá a forma:

$$\vec{E} = \vec{E}_o \cos \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt \right) \right] \quad (\text{esp-1})$$

onde E_o é a amplitude máxima do campo e v e λ são respectivamente a frequência e o comprimento da onda, relacionados por

$$c = v\lambda_o \quad \text{ou} \quad v = v\lambda \quad (\text{esp-2})$$

onde c e v são respectivamente as velocidades da luz no vácuo e em outro meio, e λ_o e λ são respectivamente os comprimentos de onda da luz no vácuo e no outro meio. A frequência da luz independe do meio no qual a onda se propaga. A intensidade da luz pode ser interpretada como uma medida do fluxo de energia que passa por uma área perpendicular à direção de propagação, sendo portanto proporcional ao quadrado do campo elétrico.

No modelo clássico a luz que incide sobre uma molécula induz uma oscilação das cargas desta, de forma que a molécula se comporta como uma antena, irradiando luz na mesma frequência da luz incidente (espalhamento elástico). Normalmente temos uma luz não-polarizada incidindo sobre a molécula, que pode ser decomposta em duas componentes, uma com polarização vertical (direção z) e outra com polarização horizontal (direção y). A molécula pode ser descrita como uma carga q situada no centro do sistema:

(Hiemenz, 1984)

O módulo do campo elétrico gerado pela molécula é dado (no sistema MKS) pela seguinte expressão:

$$|\vec{E}(\vec{r})| = \frac{q \sin \phi_z}{4\pi\epsilon_o c^2} \frac{|\vec{a}_p|}{|\vec{r}|} \quad (\text{esp-3})$$

onde a_p é o módulo da aceleração periódica sentida pela carga q . É preciso encontrar uma expressão para essa aceleração. Para tal fazemos uso do momento de dipolo periódico induzido na molécula pelo campo elétrico incidente

$$|\bar{\mu}_p| = \alpha |\bar{E}_o| \cos(2\pi vt) \quad (\text{esp-4})$$

pois o momento de dipolo é proporcional ao campo elétrico e α é a polarizabilidade da molécula. É possível identificar nessa relação αE_o à carga q e $\xi = \cos(2\pi vt)$ como a separação do dipolo. Dessa forma o módulo da aceleração periódica é dada por

$$a_p = \frac{d^2\xi}{dt^2} = -4\pi^2 v^2 \cos(2\pi vt) \quad (\text{esp-5})$$

Substituindo na eq. (esp-3) e tomando o quadrado da expressão obtida, teremos:

$$i_v \propto \frac{\pi^2 v^4 \alpha^2 E_o^2 \cos^2(2\pi vt) \text{sen}^2 \phi_z}{\epsilon_o^2 c^4 r^2} \quad (\text{esp-6})$$

onde o índice v na intensidade refere-se à polarização vertical ($\bar{E} = E\bar{z}$) assumida para a luz incidente. Queremos uma relação da intensidade de luz espalhada em relação à intensidade de luz incidente ($I_{o,v}$):

$$I_{o,v} \propto E_o^2 \cos^2(2\pi vt) \quad \Rightarrow \quad \frac{i_v}{I_{o,v}} = \frac{\pi^2 \alpha^2 \text{sen}^2 \phi_z}{\epsilon_o^2 \lambda_o^4 r^2} \quad (\text{esp-7})$$

A dependência com λ^{-4} vem da substituição de v/c de acordo com a eq. (esp-2).

Os mesmos argumentos servem para a luz polarizada horizontalmente ($\bar{E} = E\bar{y}$); teremos a mesma expressão mas com ϕ_y no lugar de ϕ_z . A luz não-polarizada será dada pela média das duas intensidades:

$$\frac{i_u}{I_{o,u}} = \frac{1/2(i_v + i_h)}{I_{o,u}} = \frac{1}{2} \frac{\pi^2 \alpha^2 (\text{sen}^2 \phi_z + \text{sen}^2 \phi_y)}{\epsilon_o^2 \lambda_o^4 r^2} \quad (\text{esp-8})$$

Pela geometria desses ângulos é possível verificar que $\cos^2 \phi_x + \cos^2 \phi_y + \cos^2 \phi_z = 1$. Fazendo a substituição $\cos^2 \phi = 1 - \sin^2 \phi$ para ϕ_y e ϕ_z prova-se que $\sin^2 \phi_z + \sin^2 \phi_y = 1 + \cos^2 \phi_x$. Dessa forma o espalhamento é dado em função de apenas um ângulo:

$$\frac{i_u}{I_{o,u}} = \frac{\pi^2 \alpha^2}{2\epsilon_o^2 \lambda_o^4} \frac{(1 + \cos^2 \phi_x)}{r^2} \quad (\text{esp-9})$$

No entanto essa expressão é para um centro espalhador. No caso de gases, onde as moléculas estão suficientemente afastadas e se comportam de forma independente, o espalhamento total é incoerente e obtido pela multiplicação do espalhamento de cada molécula pelo número de moléculas por unidade de volume, dado por $\rho N_a / M$, onde ρ e M são a densidade e a massa molecular da molécula respectivamente, e N_a é o número de Avogadro. Chamando ϕ_x de θ , o espalhamento por unidade de volume será dado por

$$\frac{i_s}{I_o} = \frac{\rho N_a}{M} \frac{\pi^2 \alpha^2}{2\epsilon_o^2 \lambda_o^4} \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{r^2} \quad (\text{esp-10})$$

onde os índices u (luz não-polarizada) estão implícitos. A primeira parte do lado direito é chamada de razão de Rayleigh:

$$R_\theta = \frac{\rho N_a}{M} \frac{\pi^2 \alpha^2}{2\epsilon_o^2 \lambda_o^4} \Rightarrow \frac{i_s}{I_o} = R_\theta \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{r^2} \quad (\text{esp-11})$$

A polarizabilidade da molécula pode ser relacionada à permissividade do meio pela relação de Clausius-Mosotti:

$$\frac{\rho N_a \alpha}{3M\epsilon_o} = \frac{\epsilon_r - 1}{\epsilon_r + 2} \quad (\text{esp-12})$$

onde ϵ_r , a permissividade do meio, pode ser aproximada pelo quadrado do índice de refração n do meio. Para gases pode-se assumir que $n \approx 1$, de forma que $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cong \frac{2}{3}(n - 1)$.

Substituindo α na eq. (esp-10) temos:

$$\alpha^2 = \frac{4(n-1)^2 \varepsilon_0 M}{\rho N_a} \Rightarrow \frac{i_s}{I_o} = \frac{2\pi^2 M (n-1)^2}{\lambda_o^4 \rho N_a} \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{r^2} \quad (\text{esp-13})$$

Esta é a expressão para o espalhamento de Rayleigh para gases obtida em 1871.

Como dito anteriormente, o espalhamento por gases é incoerente, de forma que a intensidade de luz espalhada total é a soma das intensidades de luz espalhadas por cada molécula. Para líquidos isso não é verdade, pois as moléculas estão mais próximas e com posições correlacionadas. Para se obter a luz espalhada por um líquido seria necessário conhecer a posição de todas as moléculas para que as interferências construtivas e destrutivas pudessem ser calculadas. Entretanto, sabemos que um líquido não é uniforme, pois constantes flutuações ocorrem em todo o seu volume. Portanto, um modelo realístico, é imaginar o líquido como um meio homogêneo com flutuações em sua densidade. O espalhamento só seria devido a essas flutuações de densidade, que criariam centros espalhadores momentâneos. O meio homogêneo não apresentaria espalhamento de luz, já que para o comprimento de onda da luz visível ele não apresentaria diferenças de densidade capazes de espalhar a luz. O espalhamento em líquidos, então, só é devido às flutuações na densidade, que geram mudanças na polarizabilidade e índice de refração do meio.

Assume-se que existam N^* centros em cada momento com uma polarizabilidade diferente à da média do líquido como um todo. O que entra na expressão do espalhamento é, portanto, a variação na polarizabilidade do meio, e não sua polarizabilidade, pois como já dito serão as flutuações do líquido as responsáveis pelo espalhamento da luz visível. A expressão para o espalhamento de líquidos, obtida da eq. (esp-10) será:

$$\frac{i_s}{I_o} = \frac{N^* \pi^2 \langle \delta \alpha^2 \rangle}{2 \varepsilon_o^2 \lambda^4} \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{r^2} \quad (\text{esp-14})$$

onde λ_o foi substituído por λ , já que o espalhamento ocorre em um meio que não o vácuo, como no caso dos gases. Sabemos que $\varepsilon_r = \varepsilon / \varepsilon_o$, onde ε é a permissividade relativa da substância (adimensional):

$$\alpha = \frac{3\varepsilon_o \varepsilon_r - 1}{N^* \varepsilon_r + 2} \quad \text{e} \quad \frac{\varepsilon_r - 1}{\varepsilon_r + 2} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_o}{\varepsilon + 2\varepsilon_o} \quad (\text{esp-15})$$

Para o caso de gases a aproximação $n \approx 1$ é razoável, o que para líquidos pode não ser verdade. É preciso analisar a situação onde ocorram flutuações na permissividade da

substância, ou seja, substituímos na segunda expressão acima ϵ por $\epsilon + \delta\epsilon$ e ϵ_0 por ϵ , já que o meio homogêneo no qual os centros espalhadores estão inseridos não é mais o vácuo. Desprezando $\delta\epsilon$ perto de 3ϵ chegamos a

$$\delta\alpha = \frac{\epsilon_0}{N^*} \frac{\delta\epsilon}{\epsilon} \quad (\text{esp-16})$$

É possível relacionar a variação em ϵ a uma variação na concentração c do líquido:

$$\delta\epsilon = \frac{d\epsilon}{dc} \delta c \quad (\text{esp-17})$$

mas $\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$ e $\epsilon_r \approx n^2$, como já visto, e portanto $\delta\epsilon = \epsilon_0 2n \frac{dn}{dc} \delta c$. Fazendo essas substituições na eq. (esp-16) obtém-se uma expressão para a flutuação do quadrado da polarizabilidade do líquido

$$\langle \delta\alpha^2 \rangle = \frac{\epsilon_0^2}{(N^*)^2} \left(\frac{\epsilon_0 2n \frac{dn}{dc}}{\epsilon} \right)^2 \langle \delta c^2 \rangle \quad (\text{esp-18})$$

Substituindo essa expressão na eq. (esp-14) e usando que $\lambda^{-4} (\epsilon_0/\epsilon)^2 = \lambda^{-4} n^{-4} = \lambda_0^{-4}$ chega-se à seguinte expressão:

$$\frac{i_s}{I_o} = \frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 \langle \delta c^2 \rangle}{N^* \lambda_0^4} \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{r^2} \quad (\text{esp-19})$$

É preciso ainda encontrar uma expressão para $\langle \delta c^2 \rangle$. De acordo com Hiemenz (1984, 1986), Kratochvíl (1987), Kerker (1969) e Tanford (1961) é possível expandir a energia livre de Gibbs em uma série de Taylor em torno de $\delta c=0$. Obtém-se com isso uma relação entre δG e δc^2 . O valor médio de δc^2 é, então, calculado em função da variação ocorrida na energia livre de Gibbs induzida pelas flutuações do líquido. Utilizando algumas propriedades termodinâmicas, pode-se relacionar a energia livre de Gibbs à pressão osmótica do sistema, chegando-se à seguinte equação de espalhamento:

$$\frac{i_s}{I_o} = \frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 kTc}{\lambda_0^4 (\partial\Pi/\partial c)_o} \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{r^2} \quad (\text{esp-20})$$

A pressão osmótica pode ser escrita em função da concentração utilizando a expansão de virial

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{c}{M} + A_2 c^2 \quad \rightarrow \quad \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)_o = RT \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c \right) \quad (\text{esp-21})$$

O espalhamento fica

$$\boxed{\frac{i_s}{I_o} = \frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 c (1 + \cos^2 \theta)}{N_a \lambda_o^4 (1/M + 2A_2 c)} \frac{1}{r^2}} \quad (\text{esp-22})$$

onde a razão Rayleigh é dada por

$$R_\theta = \frac{i_s}{I_o} \frac{r^2}{1 + \cos^2 \theta} \quad \Rightarrow \quad R_\theta = \frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 c}{N_a \lambda_o^4 (1/M + 2A_2 c)} \quad (\text{esp-23})$$

Todas as constantes óticas podem ser agrupadas numa mesma constante K, dada por

$$K = \frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2}{\lambda_o^4 N_a} \quad (\text{esp-24})$$

Com isso a equação de espalhamento fica mais clara

$$\boxed{\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2 c} \quad (\text{esp-25})$$

Dessa maneira Kc/R_θ em função de c tem a forma de uma reta de intercepto $1/M$ e coeficiente angular $2A_2$.

O espalhamento de moléculas em um meio aquoso também é dado pelas flutuações de concentração dessa molécula. O segundo coeficiente de virial, A_2 , está relacionado às interações soluto-solvente e solvente-solvente. Se $A_2 > 0$ o espalhamento diminui, indicando que a não-idealidade da solução diminui as flutuações de concentração do soluto, pois a interação soluto-solvente é preferível à interação solvente-solvente. Se $A_2 < 0$ o espalhamento aumenta pois a tendência do solvente interagir entre si aumenta a flutuação do sistema (Ware, 1984).

Espalhamento de Debye - A teoria de espalhamento de Debye trata do espalhamento para partículas cujas dimensões não são mais pequenas comparadas ao comprimento de onda da luz incidente. Nesta situação ocorre interferência entre os feixes espalhados pelas diferentes regiões do objeto, que será construtiva ou destrutiva dependendo do ângulo de observação θ . Para $\theta = 0^\circ$ não ocorrerá o fenômeno de interferência. Queremos então um fator de correção que tenha dependência angular e que para ângulo nulo deixe a expressão do espalhamento da equação inalterada. Esse fator, chamado de função espalhadora da partícula, fator de interferência intramolecular, ou fator de forma, $P(\theta)$, é definido como

$$P(\theta) = \frac{R_\theta}{R_{\theta, \text{Rayleigh}}} \quad (\text{esp-26})$$

Multiplicando a eq. (esp-25) por $1/P(\theta)$ dos dois lados temos:

$$\frac{Kc}{R_{\theta, \text{Rayleigh}} P(\theta)} = \frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{P(\theta)} \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c \right) \quad (\text{esp-27})$$

A interferência ocorrerá devido às diferentes fases dos feixes provenientes das diferentes regiões do objeto. É possível separar o objeto em n sítios espalhadores que obedecem ao espalhamento de Rayleigh. Cada sítio j emitirá uma radiação

$$E_j = E_o \cos(2\pi vt + \delta_j) \quad (\text{esp-28})$$

E o campo total será dado por
$$E = \sum_{j=1}^n E_o \cos(2\pi vt + \delta_j)$$

Usando exponenciais complexas é possível avaliar E^*E , e portanto obter a intensidade:

$$i_s \propto \frac{E_o^2}{2} \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n \cos(\delta_j - \delta_k) \quad (\text{esp-29})$$

No espalhamento de Rayleigh a diferença de fases é nula, ou seja, $\delta_j - \delta_k = 0$:

$$i_{s, \text{Rayleigh}} \propto \frac{E_o^2}{2} \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n 1 = \frac{E_o^2 n^2}{2} \quad (\text{esp-30})$$

A razão dos dois espalhamentos fica

$$\frac{i_s}{i_{s, \text{Rayleigh}}} = P(\theta) = \frac{1}{n^2} \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n \cos(\delta_j - \delta_k) \quad (\text{esp-31})$$

Conseguimos então uma expressão para $P(\theta)$ em função da diferença de fase dos feixes. No entanto seria necessária uma expressão dependente de θ . Para tal usa-se o módulo do vetor de espalhamento s , que está definido abaixo. O desenvolvimento, para o caso de sítios isotrópicos discretos uniformemente distribuídos, foi feito por Debye (Debye, 1915):

$$P(\theta) = \frac{1}{n^2} \sum_j \sum_k \frac{\text{sen}(sr_{jk})}{sr_{jk}} \quad \text{onde} \quad s = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{esp-32})$$

O fator de forma $P(\theta)$ pode ser calculado para moléculas de diferentes geometrias. Na literatura são encontrados cálculos para esferas rígidas, cascas esféricas, multibicamadas, e também cálculos levando em conta uma possível anisotropia do centro espalhador (Warner, 1983; Chong & Colbow, 1976; Pecora & Aragón, 1974 e Aragón & Pecora, 1977). O fator de forma pode ser relacionado com o raio de giração do objeto espalhador, desde que seja tomado o limite de sr_{jk} pequeno:

$$P(\theta) \cong \frac{1}{n^2} \sum_j \sum_k \frac{sr_{jk} - (sr_{jk})^3/3! + \dots}{sr_{jk}} = \frac{1}{n^2} \sum_j \sum_k \left(1 - \frac{(sr_{jk})^2}{6}\right) = 1 - \frac{s^2}{6n^2} \sum_j \sum_k r_{jk}^2 \quad (\text{esp-33})$$

Na eq. (esp-27) o fator de correção entra como $1/P(\theta)$. Ainda usando o fato do produto sr_{jk} ser pequeno e que $1/(1-y) \cong 1+y$ para y pequeno, podemos escrever

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{s^2}{6n^2} \sum_j \sum_k r_{jk}^2 \quad (\text{esp-34})$$

o termo $\sum_j \sum_k r_{jk}^2$ pode ser relacionado ao raio de giração do objeto, dado por

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{2n^2} \sum_j \sum_k r_{jk}^2 \quad (\text{esp-35})$$

usando essa identidade o fator de espalhamento fica

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{\langle R_g^2 \rangle s^2}{3} = 1 + \frac{16\pi^2 \langle R_g^2 \rangle}{3\lambda^2} \text{sen}^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{esp-36})$$

O raio de giração contém informação do tamanho da partícula (van Zanten & Monbouquette, 1991 e 1994 e van Zanten, 1995). Abaixo são dados dois exemplos de como pode-se relacioná-lo à geometria do objeto espalhador, no caso uma esfera rígida de raio R e uma casca esférica de raio externo R e interno r:

$$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2$$

$$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2 \frac{1 - (r/R)^5}{1 - (r/R)^3} \quad (\text{esp-37})$$

Substituindo a eq. (esp-36) na expressão para o espalhamento de Debye-Rayleigh (esp-27) temos a importante equação

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2c \right) \left[1 + \frac{16\pi^2 \langle R_g^2 \rangle}{3\lambda^2} \text{sen}^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right] \quad (\text{esp-38})$$

Zimm (1948) utilizou essa equação para desenvolver um método gráfico simples capaz de fornecer M, $\langle R_g^2 \rangle$ e A_2 , como veremos a seguir.

“Zimm plots” - Antes de apresentar o método gráfico desenvolvido por Zimm em 1948, é importante considerar os seguintes limites da equação de espalhamento:

$$\text{i) } \left(\frac{Kc}{R_\theta} \right)_{\theta=c=0} = \frac{1}{M}$$

$$\text{ii) } \left(\frac{Kc}{R_\theta} \right)_{\theta=0} = \frac{1}{M} + 2A_2c$$

$$\text{iii) } \left(\frac{Kc}{R_\theta} \right)_{c=0} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2 \langle R_g^2 \rangle}{3M\lambda^2} \text{sen}^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Através desses limites é possível obter os parâmetros desejados: M, R_g , e A_2 , desde que os dois limites de ângulo e concentração nula sejam tomados. É necessário portanto que o gráfico seja de Kc/R_θ em função tanto do ângulo de observação, quanto da concentração. O método de Zimm pode ser sumarizado da seguinte forma:

- i) Deve ser feito um gráfico cuja ordenada seja Kc/R_θ e a abcissa seja $\text{sen}^2(\theta/2) + kc$, onde k é um número escolhido de forma a fornecer uma boa distribuição dos dados.
- ii) Tanto os pontos de mesma concentração, quanto os de mesmo ângulo são conectados entre si, de forma que o gráfico forme uma grade (não necessariamente as curvas formadas serão uma reta).
- iii) Em cada curva obtida é feita uma marca em um dos casos limites de concentração e ângulos nulos, ou seja, na curva em que $c = c^*$ a marca é feita onde a abcissa é kc^* , correspondendo à $\theta = 0^\circ$, e na linha em que $\theta = \theta^*$ a marca é feita quando a abcissa é $\text{sen}^2(\theta^*/2)$, que corresponde ao caso em que $c=0$.
- iv) Os pontos marcados são conectados, gerando duas linhas, uma para a qual temos $(Kc/R_\theta)_{c=0}$ em função de θ e outra onde obtemos $(Kc/R_\theta)_{\theta=0}$ em função de c . As duas linhas se encontram no mesmo intercepto, correspondendo ao inverso do peso molecular (M^{-1}). As inclinações das duas retas estão relacionadas uma ao raio de giração (R_g) e outra ao segundo coeficiente de virial (A_2), como visto nos limites acima.

A figura abaixo ilustra o procedimento gráfico:

(Hiemenz, 1984)

O método de Zimm permite, portanto, a obtenção da massa molecular, do raio de giração e do segundo coeficiente de virial através de medidas de espalhamento a vários ângulos de amostras com diferentes concentrações.

Na maioria dos casos temos uma solução polidispersa, e tanto o raio de giração, quanto a massa molecular fornecida pelo método de Zimm, serão valores médios da distribuição da amostra:

$$\langle M_w \rangle = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} \quad \text{e} \quad \langle R_g^2 \rangle_z = \frac{1}{\langle M_w \rangle} \sum_i w_i M_i \langle R_g^2 \rangle_i \quad (\text{esp-39})$$

onde c_i é a concentração (massa por unidade de volume) da espécie i , M_i é a massa da espécie i e w_i é fração de espécies com massa i , ou seja $w_i = c_i/c$, onde c é a soma das concentrações de todas as espécies. $\langle R_g \rangle_z$ é mais sensível à polidispersidade da amostra, por conter na sua expressão além de $\langle R_g \rangle_i$, M_i .

Para partículas pequenas o espalhamento é pouco dependente do ângulo de observação. Para partículas da ordem de λ , Kc/R_θ varia linearmente com θ . No entanto para uma solução com centros espalhadores muito grandes, ou com algumas partículas grandes, o espalhamento passa a ser muito dependente de θ , principalmente para valores pequenos de θ , causando uma distorção das retas obtidas.

No caso do segundo coeficiente de virial a situação é mais complicada. Em uma solução monodispersa observa-se que A_2 é inversamente proporcional ao peso molecular, e na maioria dos casos é possível uma descrição numa forma de potência: $A_2 \propto M^{-\gamma}$, com γ variando de 0.15 a 0.35, indicando que A_2 não varia fortemente com o peso molecular. No entanto para soluções muito polidispersas, as interações entre as diferentes macromoléculas são muito diferentes, e não existe um tratamento teórico para este caso, dificultando o tratamento quantitativo dos dados.

2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

O desenvolvimento teórico da técnica de ressonância magnética foi principalmente obtido das seguintes fontes: Marsh (1981); Knowles et al. (1976) Atherton (1993) e Swartz et al. (1972). Será feita uma revisão simplificada dos principais aspectos da teoria de ressonância paramagnética de spin que foram utilizados no presente trabalho.

Algumas substâncias na natureza, como alguns metais e radicais livres, possuem elétrons desemparelhados, resultando em um momento de dipolo magnético total não nulo. Em presença de um campo magnético externo ocorre a quantização dos níveis de energia correspondentes às diferentes projeções do momento angular dos elétrons (spin). O eixo de quantização será dado pela direção do campo externo aplicado, e o orbital do elétron desemparelhado poderá estar alinhado paralelo ao campo externo ou antiparalelo a ele. Incidindo uma radiação eletromagnética é possível induzir transições entre esses dois níveis de energia. A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é baseada nas transições do elétron desemparelhado em presença de um campo magnético externo, e de uma radiação incidente.

Como já foi dito as substâncias com um elétron desemparelhado (paramagnéticas) são muito raras na natureza. Em sistemas biológicos encontramos moléculas paramagnéticas somente em metaloproteínas e radicais livres. É comum, entretanto, inserir moléculas paramagnéticas (chamadas de marcadores de spin) no sistema a ser estudado. Os marcadores de spin mais utilizados são moléculas que contêm um grupo nitróxido, com o elétron desemparelhado principalmente localizado no orbital π do nitrogênio. Esses marcadores podem, por exemplo, ser ligados a uma proteína ou a uma cadeia hidrocarbônica de uma molécula anfifílica, neste último caso podendo ficar inserido na membrana.

Condição de ressonância - O momento angular de spin do elétron é $\frac{1}{2}$. Se ele está em presença de um campo magnético a quantização do momento angular faz com que sejam possíveis somente duas projeções do spin no eixo de quantização, que tem a direção do campo magnético externo. Assumindo o campo na direção z ($\vec{H} = H\vec{z}$) temos:

$$S_z = m_s \hbar \quad m_s = \pm \frac{1}{2} \quad (\text{epr-1})$$

onde S_z é a componente na direção z do vetor de momento angular de spin do elétron. A energia de cada estado é dada por:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \qquad \vec{\mu} = -g \frac{e}{2m} \vec{S} \qquad (\text{epr-2})$$

onde $\vec{\mu}$ é o momento magnético, \vec{H} o campo aplicado, g é um fator de correção quântico, que para o elétron livre é $g_e=2.0023$ e \vec{S} é o momento angular de spin do elétron.

A energia do sistema pode ser escrita em função dos auto-valores da energia, assumindo, como acima, que o campo externo tem a direção do eixo z

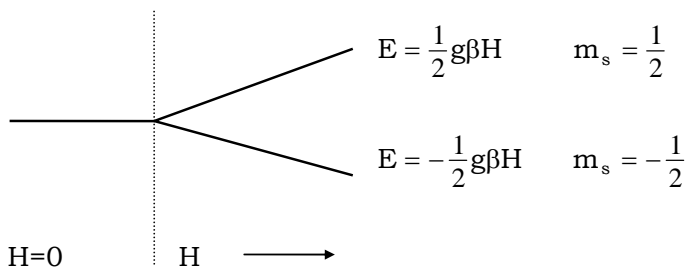
$$E = g \frac{e}{2m} \vec{H} \cdot \vec{S} = g \frac{e}{2m} H S_z = \pm \frac{1}{2} g \beta H \qquad (\text{epr-3})$$

onde β é o magneton de Bohr $\beta = \frac{e\hbar}{2m}$. O estado de menor energia é obtido quando o momento angular de spin está anti-paralelo ao campo, ou seja, $m_s = -1/2$, no entanto, incidindo radiação eletromagnética sobre o sistema podemos induzir uma transição para o nível correspondente à $m_s = +1/2$. A energia necessária para a transição será dada pela diferença entre os níveis:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \qquad (\text{epr-4})$$

portanto a transição ocorrerá para uma frequência $\nu = \frac{g\beta H}{h}$. Além da energia fornecida pela microonda é possível induzir transições com a energia térmica do sistema, que à temperatura ambiente é bem maior que a diferença entre os níveis, portanto, de acordo com a distribuição de Boltzmann, que será discutida adiante, as duas populações são muito parecidas.

A diferença entre os níveis de energia é tanto maior quanto maior for o campo externo, como vemos na figura abaixo.



Para obter-se a condição de ressonância é possível variar tanto H quanto ν . Por motivos técnicos opta-se por variar o campo externo. Para a técnica de RPE de marcadores de spin, $g \approx g_e$, ν é da ordem de GHz (microonda) e $H \approx 3400$ G.

Na maioria das técnicas espectroscópicas as transições se dão através da interação dos campos elétricos da molécula e da luz incidente. Nas técnicas de ressonância magnética (RPE e RMN) a interação se dá entre o momento magnético do elétron e a componente magnética da radiação incidente. Com isso as regras de seleção na transição são diferentes, já que estamos trabalhando com dipolos magnéticos e não elétricos. As regras são

$$\Delta S = 0 \quad \text{e} \quad \Delta m_s = \pm 1 \quad (\text{epr-5})$$

Desdobramento hiperfino - Se o elétron emparelhado estiver próximo, ou pertencer a um núcleo com spin total I não nulo, ocorrerá uma interação entre os dois momentos magnéticos gerando um desdobramento nos níveis eletrônicos, tal que serão obtidos $2I+1$ níveis.

Esse efeito causado pelo núcleo é chamado de desdobramento hiperfino, e é caracterizado por uma constante A, que relaciona a energia do desdobramento hiperfino e o spin do núcleo:

$$E_{\text{dh}} = A I_z S_z = \pm \frac{1}{2} \hbar^2 A m_I \quad \text{onde } m_I = -I, \dots, I \quad (\text{epr-6})$$

a energia total fica então

$$E = \pm \frac{1}{2} g \beta H \pm \frac{1}{2} \hbar^2 A m_I \quad (\text{epr-7})$$

Na figura abaixo vemos o caso em que $I = 1$ ($m_I = -1, 0, 1$), que é o caso do nitróxido, e $s = 1/2$, dando origem a três transições possíveis, que ocorrerão como mostrado abaixo dos níveis

(Knowles et al., 1976)

Nesse caso as intensidades das linhas serão iguais nas três transições. Outro tipo de desdobramento possível é o devido à interação de um elétron com n núcleos equivalentes, resultando em $n+1$ linhas, cujas intensidades relativas obedecem o triângulo de Pascal.

Anisotropia - Até aqui foi assumida que a molécula paramagnética tinha liberdade de se orientar de acordo com o campo externo. No entanto se a molécula estiver em um cristal ou em um meio anisotrópico, a direção do orbital no qual está localizado o elétron desemparelhado (assumindo que não seja o orbital isotrópico s) pode não ser necessariamente a mesma do campo externo aplicado, e o espectro será diferente dependendo da orientação de \vec{H} em relação aos eixos internos da molécula. Se esta tiver liberdade de movimento, de forma que assuma várias orientações durante um tempo menor que o tempo envolvido nas transições (da ordem de 10^{-11} s), teremos uma média das anisotropias resultando em um espectro isotrópico. Se o movimento for moderado ocorrerá uma média parcial da anisotropia.

Analisando os espectros de um cristal de nitróxido, onde todas as moléculas estão alinhadas na mesma direção, são obtidos valores diferentes para o fator-g e para a constante de desdobramento hiperfino para cada direção do campo externo em relação aos eixos da molécula.

O elétron desemparelhado do grupo nitróxido está localizado principalmente no orbital π do nitrogênio, onde define-se o eixo z da molécula. As direções x e y são praticamente iguais. Na figura abaixo vemos espectros tirados em diferentes orientações da molécula.

(Marsh, 1981)

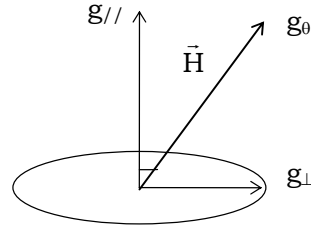
Para os casos em que \vec{H} é paralelo a x ou y os espectros são semelhantes entre si, mas muito diferentes do espectro tirado com o campo paralelo à z. Nesse caso de simetria axial é possível definir a direção z como paralela ao orbital π do nitróxido (região onde está principalmente localizado o elétron desemparelhado) e as direções x e y como perpendiculares a ele. Observa-se na figura acima que o desdobramento hiperfino é maior quando $\vec{H} // \vec{z}$ (direção paralela), já que as interações hiperfinas com o núcleo ficam mais evidentes, pois a interação do campo externo com o momento magnético do elétron é maior. Os valores obtidos dos espectros para A e g são:

$$\begin{array}{ll}
A_{zz} = A_{//} = 32\text{G} & g_{zz} = g_{//} = 2.0027 \\
A_{xx} = A_{\perp} = 6\text{G} & g_{xx} = g_{\perp} = 2.0089 \\
A_{yy} - A_{\perp} = 6\text{G} & g_{yy} = g_{\perp} = 2.0061
\end{array}$$

O espectro do cristal, obtido em uma direção qualquer formando um ângulo θ com o eixo z da molécula (direção paralela), no caso da simetria axial, fornece valores para g e A dados por:

$$g_{\theta}^2 = g_{//}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta$$

$$A_{\theta}^2 = A_{//}^2 \cos^2 \theta + A_{\perp}^2 \sin^2 \theta$$



com a seguinte condição de ressonância

$$h\nu = g_{\theta}\beta H \pm \frac{1}{2}\hbar^2 A_{\theta} m_I \quad (\text{epr-7})$$

Se os cristais não estão todos na mesma direção é obtido um espectro que será o resultado da soma de todas as orientações θ presentes, chamado de espectro de pó. Nessa situação não será possível determinar valores para $A_{//}$, A_{\perp} , $g_{//}$ e g_{\perp} , pois as linhas se tornam extremamente largas e distorcidas, e os desdobramentos hiperfinos menores não são resolvidos. É importante salientar que o caso do espectro de pó é distinto ao do espectro onde temos a molécula tombando rapidamente em solução. Neste segundo caso é possível obter uma média da constante de desdobramento hiperfino e fator- g , dadas pelas médias dos valores no cristal

$$a_o = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad g_o = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (\text{epr-8})$$

Na figura anterior estão mostrados o espectro de um marcador com alto movimento (e) e um espectro de pó (d).

Se os marcadores de spin estiverem em um meio não isotrópico, como por exemplo em uma membrana, ocorrerá um alargamento nas linhas e uma diferença nas intensidades relativas dos picos, pois o movimento do marcador não é o mesmo em todas as direções.

Espectros de marcadores de spin em membranas - Marcadores de spin em membranas possuem um cancelamento parcial da anisotropia, já que o movimento é restringido pela membrana. Abaixo vemos um esquema de um grupo nitróxido inserido em uma bicamada. É possível notar que, neste caso, o eixo z do nitróxido é paralelo à direção normal da bicamada, que será chamada de orientação paralela.

(Knowles et al., 1976)

Os eixos x e y são paralelos à superfície da membrana (orientação perpendicular) e são iguais entre si. O movimento do marcador dentro da bicamada pode ser visualizado como formando um cone de ângulo θ . Esse movimento cancela parte da anisotropia, e é possível observar que $A_{//} < A_{zz}$ e $A_{\perp} > A_{xx}$, onde A_{zz} e A_{xx} seriam os valores caso θ fosse zero, ou seja, o marcador teria apenas movimento em torno de seu eixo. Esse efeito ocorre pois, para $\theta \neq 0$, $A_{//}$ contém também contribuições de A_{xx} e A_{yy} , e A_{\perp} contém contribuições de A_{zz} , e como já visto $A_{zz} > A_{xx}$, A_{yy} .

Para uma amostra cristalina com direções definidas é possível obter os valores de A para cada direção e que, para uma molécula em movimento rápido, o desdobramento é a média desses valores para cada direção. Portanto $A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2$ nos fornece uma

medida da anisotropia máxima do sistema e $A_{//} - A_{\perp}$ pode ser interpretado como o que restou da anisotropia, que não foi cancelada pela amplitude de movimento da cadeia dentro da membrana.

Uma medida da ordem do sistema pode ser obtida através da razão dessas duas anisotropias, resultando em um parâmetro de ordem S

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \quad 0 < S < 1 \quad (\text{epr-9})$$

O parâmetro de ordem será máximo quando os valores de A do numerador se igualarem aos do denominador, que são os valores obtidos quando os marcadores estão todos orientados. O limite em que S se anula é o de movimento amplo, quando $A_{//} = A_{\perp}$.

No entanto, simulações mostram que os parâmetros tirados dos espectros, desdobramentos hiperfinos máximo e mínimo, como vemos na figura abaixo, não são exatamente $A_{//}$ e A_{\perp} . O desdobramento hiperfino máximo será muito parecido com o desdobramento hiperfino paralelo ($A_{\max} \approx A_{//}$), no entanto A_{\perp} será dado a partir de uma correção empírica elaborada por Griffith & Jost (1976) e Gaffney (1976):

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 \left(1 - \frac{A_{\max} - A_{\min}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \right) \quad (\text{epr-10})$$

Outra correção importante a ser feita é a da polaridade do meio, que é diferente nos casos do marcador cristalino e do marcador na membrana, e que afeta os parâmetros de desdobramento hiperfino. Através da medida do desdobramento hiperfino isotrópico temos uma medida da polaridade do meio. Temos então um parâmetro de ordem efetivo dado por

$$S_{\text{ef}} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a_o(\text{cristal})}{a_o(\text{membrana})} \quad (\text{epr-11})$$

onde A_{\perp} é dado pela expressão anterior e

$$a_o(\text{cristal}) = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad \text{e} \quad a_o(\text{membrana}) = \frac{1}{3}(A_{//} + 2A_{\perp}) \quad (\text{epr-12})$$

Equilíbrio térmico, relaxação e tempo de correlação- A população de spins nos dois estados quantizados de energia, em equilíbrio térmico, é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$N_{\uparrow} = N_{\downarrow} e^{-\hbar\nu/kT} \quad (T = 300 \text{ K} \Rightarrow \frac{N_{\uparrow}}{N_{\downarrow}} = 0.9984) \quad (\text{epr-13})$$

À temperatura ambiente, a diferença de população é muito pequena, ou seja, somente uma pequena quantidade de spins contribui para o processo de absorção. Na presença de uma radiação eletromagnética, o sistema não estará em equilíbrio, já que as interações entre os elétrons e a radiação eletromagnética fazem com que a distribuição de populações entre os dois níveis seja diferente à do estado de equilíbrio. Quando um spin é excitado, através da absorção de um fóton, o sistema tenderá a decair, ou através da interação eletromagnética com outro fóton ou por outros processos espontâneos. Para a microonda, usada na ressonância eletrônica, o decaimento induzido pela radiação eletromagnética é praticamente desprezível. Se essa relaxação for muito pequena em comparação à potência da microonda, ocorrerá uma saturação do sinal, pois as populações nos dois níveis serão igualadas. Ocorre portanto uma competição entre dois efeitos: por um lado a radiação tende a igualar as duas populações, e por outro lado a relaxação térmica tende a levar o sistema ao seu estado de equilíbrio, dado pela distribuição de Boltzmann.

Analisando o problema em termos das probabilidades de transição e diferença de populações entre os dois níveis, não é difícil verificar que, após um pulso de radiação, a diferença de populações se aproxima de seu equilíbrio térmico de forma exponencial, com um tempo de relaxação característico, T_1 (Atherton, 1993).

Portanto quanto menor T_1 , mais rápido se dará a relaxação para o equilíbrio térmico. No entanto, para T_1 muito pequeno a transição se torna extremamente alargada devido ao princípio de incerteza. Geralmente T_1 é menor para sólidos, onde a interação

spin-rede é mais presente. No caso de líquidos T_1 é maior (da ordem de 10^{-6} s), praticamente não causando alargamento da linha. É importante, entretanto, não usar potências de microonda muito altas, de modo que a saturação do sinal seja evitada.

Para marcadores de spin em líquidos a principal causa do alargamento da linha de absorção provém de um mecanismo muito diferente do que o discutido até aqui. Os vários spins presentes sentirão, a cada instante, um campo local diferente, gerado pelos outros spins, portanto haverá pequenas variações nas diferenças de níveis dos vários spins, resultando em um alargamento da linha. Esse alargamento é caracterizado pelo tempo de relaxação spin-spin (T_2). Para uma solução fluída, onde o movimento térmico é rápido, e não haja saturação do sinal, a forma da linha de absorção é dada por uma Lorentziana de largura $1/T_2$:

$$f(\omega) = \frac{1}{\pi} \frac{1/T_2}{(1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \quad (\text{epr-14})$$

onde ω é a frequência da microonda.

A forma Lorentziana da curva só é obtida para movimento rápido do spin, de forma que ele possa sentir todos os campos locais em um tempo pequeno comparado com o recíproco da frequência de Larmor.

Na largura de linha também são encontrados alargamentos de forma Gaussiana, relacionados à desdobramentos hiperfinos não resolvidos.

É possível distinguir três regiões de movimento para um marcador de spin em relação à escala de tempo da técnica de RPE. Se o movimento do marcador é muito rápido, ou seja, seu tempo de correlação $\tau < 10^{-11}$, então o espectro do marcador é insensível à velocidade de movimento molecular. Para $10^{-11} < \tau < 3 \times 10^{-9}$ o espectro é sensível, através do alargamento das linhas, às variações na velocidade e na amplitude do movimento molecular. O tempo de relaxação T_2 pode ser tratado, nessa região de movimento, por teoria de perturbação dependente do tempo. Chega-se a uma dependência de T_2 com os número quânticos nucleares dada por:

$$1/T_2(m) = a + bm + cm^2 \quad (\text{epr-15})$$

Portanto o alargamento da linha se dá tanto homoganeamente em relação aos três picos (a) quanto de forma diferente para cada pico (b) ou simetricamente em relação ao pico central (c).

Para um marcador em um meio isotrópico o tempo de correlação, pode influenciar tanto as larguras das linhas quanto o valor de A_{\max} . Na figura abaixo estão mostrados espectros de um marcador em um meio isotrópico com diferentes viscosidades.

(Knowles et al., 1976)

Portanto vemos que A_{\max} contém contribuições tanto da ordem (como visto anteriormente) quanto da mobilidade do marcador no meio. Para tempos de correlação muito pequenos A_{\max} terá informações somente sobre a ordem do sistema.

As contribuições dominantes ao alargamento dos picos vêm das anisotropias do desdobramento hiperfino e do fator g, e por essa razão as larguras de linha dependem tanto da amplitude quanto da velocidade de movimento.

Em geral o movimento de marcadores de spin em membranas é anisotrópico, e portanto são necessários dois tempos de correlação para a descrição do movimento: $\tau_{//}$ para rotação em torno do eixo de simetria e τ_{\perp} para rotações perpendiculares a esse eixo. Esses tempos de correlação podem ser expressos em termos dos parâmetros b e c da eq. (epr-15).

Para movimentos muito lentos, quando $\tau > 3 \times 10^{-9}$, tanto as posições quanto as larguras e forma de linha dependem da velocidade de movimento, mesmo em um ambiente isotrópico, até que um espectro de pó totalmente imobilizado é obtido. Para esse caso a teoria de perturbação usada no regime anterior não é válida, e torna-se necessária a simulação de espectros.

Os espectros tirados durante o trabalho encontram-se na região de movimento intermediário para as temperaturas mais altas, enquanto que alguns espectros com muito pouco movimento são obtidos para as temperaturas baixas ($T < 20^{\circ}\text{C}$).

3. TEORIA DE GOUY-CHAPMAN

(McLaughlin, 1977; Träuble et al., 1976)

A teoria de Gouy-Chapman, elaborada em 1910, trata do problema de uma superfície plana carregada e o potencial criado por ela. A concentração de íons de sinal oposto deve ser maior próximo à superfície carregada do que longe dela. Essa atração é de origem eletrostática, e se ela fosse a única força presente todos os contra-íons estariam junto à superfície. Isso não ocorre já que existe uma difusão térmica dos íons. O balanço das duas forças faz com que os contra-íons fiquem distribuídos na solução, mas com uma concentração maior próxima à superfície carregada. Essa distribuição de íons é chamada de camada difusa.

Como o fosfolípido estudado possui um grupo fosfato ionizável, a bicamada formada por ele apresentará uma densidade superficial de cargas, e podemos estudar algumas de suas propriedades através de cálculos utilizando a teoria de Gouy-Chapman, que no entanto é baseada em várias simplificações, sendo por isso muitas vezes criticada.

A teoria parte da equação de Poisson:

$$\nabla^2 \Psi(\vec{r}) = -\frac{4\pi}{\epsilon} \rho(\vec{r}) \quad (\text{gouy-1})$$

onde $\rho(\vec{r})$ é a distribuição de cargas, ϵ é a constante dielétrica do meio e $\Psi(\vec{r})$ o potencial elétrico, que nessa literatura não é escrito como ϕ , como na nomenclatura física usual. O tratamento da teoria será feito no sistema CGS de medidas.

A teoria de Gouy-Chapman trata de uma superfície plana carregada, o que deixa o problema unidimensional, já que a única variável importante é a distância x , perpendicular ao plano da membrana. A equação de Poisson fica:

$$\frac{\partial^2 \Psi(x)}{\partial x^2} = -\frac{4\pi}{\epsilon} \rho(x) \quad (\text{gouy-2})$$

Assumindo que fora do plano temos um eletrólito simétrico e que os íons são cargas pontuais, a distribuição de cargas é dada pela diferença de densidade de cargas positivas e negativas:

$$\rho(x) = e [n^+(x) - n^-(x)] \quad (\text{gouy-3})$$

onde $n^\pm(\mathbf{x})$ é o número de íons por unidade de volume, que é dado pela distribuição de Boltzmann obtida da igualdade do potencial químico no equilíbrio. Para tal é assumido que a carga da superfície da placa é homogeneamente distribuída por toda a superfície, e que $\Psi(\mathbf{x} \rightarrow \infty) = 0$:

$$n^\pm(\mathbf{x}) = n^\pm(\infty) e^{-\pm \frac{ze\Psi(\mathbf{x})}{kT}} \quad (\text{gouy-4})$$

$n^\pm(\infty)$ é a concentração de eletrólitos no infinito e z é a valência das cargas. Como a aproximação é para eletrólitos simétricos então $n^+(\infty) = n^-(\infty) = n(\infty)$.

Substituindo $n^\pm(\infty)$ na eq. (gouy-3) obtemos:

$$\rho(\mathbf{x}) = -2en(\infty) \sinh\left(\frac{e\Psi(\mathbf{x})}{kT}\right) \quad (\text{gouy-5})$$

substituindo essa expressão na equação de Poisson (eq. (gouy-2)) obtemos a equação de Poisson-Boltzmann

$$\frac{\partial^2 \Psi(\mathbf{x})}{\partial \mathbf{x}^2} = \frac{8\pi}{\epsilon} en(\infty) \sinh\left(\frac{e\Psi(\mathbf{x})}{kT}\right) \quad (\text{gouy-6})$$

com as condições de contorno $\Psi(0) = \psi_0$ e $\Psi(\mathbf{x} \rightarrow \infty) = d\Psi/d\mathbf{x} (\mathbf{x} \rightarrow \infty) = 0$. Assumindo que a constante dielétrica do meio é constante até a superfície carregada, a solução da equação é dada por

$$\Psi(\mathbf{x}) = \frac{2kT}{e} \ln\left(\frac{1 + \alpha e^{-\kappa \mathbf{x}}}{1 - \alpha e^{-\kappa \mathbf{x}}}\right) \quad (\text{gouy-7})$$

$$\kappa = \left(\frac{8\pi e^2 n(\infty)}{\epsilon kT}\right)^{1/2} \quad \alpha = \frac{e^{\frac{ze\Psi_0}{2kT}} - 1}{e^{\frac{ze\Psi_0}{2kT}} + 1} \quad (\text{gouy-8})$$

onde κ é o inverso do comprimento de Debye (λ_D), chamado de comprimento de blindagem ou espessura da camada difusa de íons. É interessante analisar os casos de potencial de superfície alto e baixo:

$$\frac{e\Psi_0}{kT} \ll 1 \quad \Psi(x) = \Psi_0 e^{-\kappa x} \quad (\text{gouy-9})$$

$$\frac{e\Psi_0}{kT} \gg 1 \quad \Psi(x) = \frac{2kT}{ze} \ln\left(\frac{1 + e^{-\kappa x}}{1 - e^{-\kappa x}}\right)$$

No caso de potencial baixo obtém-se um decaimento exponencial simples, que deixa claro o significado de κ como sendo a distância para a qual o potencial cai para 1/e do valor de Ψ_0 .

No regime de alto potencial de superfície $\Psi(x)$ independe do valor de Ψ_0 , tendo apenas κ como parâmetro.

A carga na superfície da placa (densidade superficial de carga), deve ser igual e oposta à soma de todas as cargas no espaço (condição de eletroneutralidade):

$$\sigma = -\int_0^{\infty} \rho(x) dx \quad (\text{gouy-10})$$

Na integral de $\rho(x)$ as cargas do eletrólito simétrico se anulam, sobrando apenas os contra-íons, que são em mesmo número que as cargas superficiais.

Inserindo a equação de Poisson-Boltzmann (eq. (gouy-6)) na condição de neutralidade obtemos uma expressão que relaciona a densidade superficial de cargas σ com o potencial de superfície Ψ_0 , que é a equação de Gouy

$$\sigma = \frac{\varepsilon kT}{2\pi e} \kappa \sinh\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) \quad (\text{gouy-11})$$

No entanto normalmente queremos obter Ψ_0 em função de σ , o que só é conseguido numericamente, já que invertida, essa equação torna-se transcendental. Podemos novamente calcular os dois limites do potencial de superfície

$$\frac{e\Psi_0}{kT} \ll 1 \quad \Psi_0 = \frac{4\pi}{\varepsilon\kappa} \sigma \quad (\text{gouy-12})$$

$$\frac{e\Psi_0}{kT} \gg 1 \quad \Psi_0 = \frac{2kT}{e} \ln\left(\frac{4\pi e \sigma}{\varepsilon kT \kappa}\right)$$

Tomando um dos limites é possível obtermos Ψ_0 em função de σ . O caso de Ψ_0 pequeno corresponde ao do capacitor de placas paralelas e nele temos um comportamento linear de Ψ_0 com σ . Para uma membrana com a maioria das cabeças polares carregadas é razoável utilizar a aproximação de potencial alto, já que $e/kT \approx 25$ mV e $\Psi_0 \approx 100$ mV.

Conhecendo os parâmetros σ e $n(\infty)$ (relacionada à força iônica do meio) a teoria de Gouy-Chapman nos fornece valores para Ψ_0 e κ e expressões para $\Psi(x)$ e $\rho(x)$. É importante, entretanto, ter sempre em mente as aproximações contidas no modelo:

- i) os íons são cargas pontuais (efeitos específicos são desprezados)
- ii) ϵ é constante para $x > 0$ (sabemos que o valor de ϵ em meio aquoso é 80 e vai diminuindo à medida que se aproxima da membrana, chegando à 2 no interior da bicamada)
- iii) as cargas superficiais estão continuamente espalhadas (efeitos de carga imagem são desprezados)
- iv) o eletrólito é simétrico (essas expressões não são válidas para eletrólitos formados, por exemplo, de um cátion divalente e dois ânions monovalentes. A equação de Grahame é o análogo à equação de Gouy, para eletrólitos não simétricos. No entanto a equação de Poisson-Boltzmann, nesse caso, só tem solução numérica)
- v) as expressões são desenvolvidas para superfícies planas infinitas carregadas, o que sabemos não ser verdade para o caso de dispersões lipídicas, que normalmente formam estruturas esféricas

Pressão entre duas superfícies carregadas - Israelachvili (1992) discute que quando duas superfícies carregadas se aproximam em uma solução contendo apenas contra-íons ou eletrólitos simétricos a tendência é haver uma repulsão entre as duas superfícies. A origem dessa repulsão é entrópica e não eletrostática, pois é a entropia de mistura que não deixa que as duas superfícies se aproximem muito. Eletrostaticamente seria conveniente a diminuição dessa separação, já que teria como consequência uma aproximação dos contra-íons da superfície carregada. Para obter uma expressão da pressão (ou força por área) entre duas superfícies carregadas em função da distância D de separação entre elas Israelachvili (1992) parte de uma relação termodinâmica entre a pressão e o potencial químico, e utilizando algumas expressões da teoria de Gouy-Chapman e algumas aproximações, mostra que a pressão entre as duas superfícies está ligada à pressão osmótica no ponto médio entre elas:

$$P(D) = kT \left[\sum_i n_{mi}(D) - \sum_i n_{mi}(\infty) \right] \quad (\text{gouy-10})$$

O sub-índice m refere-se ao ponto médio entre as duas superfícies. A distribuição de íons é dada pela distribuição de Boltzmann desde que o potencial seja tomado no ponto médio:

$$P(D) = 2kT n(\infty) \left(\cosh \frac{e\Psi_m}{kT} - 1 \right) \quad (\text{gouy-11})$$

Se as duas superfícies não estão muito próximas, é possível estimar que o potencial no ponto médio seja a soma dos potenciais de cada uma sozinha, e portanto Ψ_m pode ser aproximado por $2\Psi(D/2)$, onde $\Psi(D/2)$ é o potencial gerado por uma superfície no ponto médio. A pressão é dada então por:

$$P(D) = 2kT n(\infty) \left(\cosh \frac{2e\Psi(D/2)}{kT} - 1 \right) \quad (\text{gouy-12})$$

O cálculo dessa pressão não leva em conta forças de hidratação que ocorrem para D pequeno e interações de van der Waals, que introduziriam um termo atrativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

Fosfolipídios e marcadores de spin - Os fosfolipídios dimiristoil fosfatidilglicerol (1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] - sal de sódio) e dimiristoil fosfatidilcolina (1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-Fosfocolina- sal de sódio) usados no trabalho foram obtidos da Avanti Polar Lipids. Os marcadores de spin derivados de fosfolipídios utilizados foram o 5-PCSL, 1-Palmitoil-2-(5-Doxilestearoil) fosfatidilcolina, e o 12-PCSL, 1-Palmitoil-2-(12-Doxilestearoil) fosfatidilcolina, obtidos da Avanti Polar Lipids. Os marcadores de spin derivados de ácido esteárico n-SASL (ácido n-4,4-dimetiloxadolidina-N-oxil esteárico, onde foram usados n = 5, 7, 9 e 12) e o marcador CSL (3-doxil-5-colestano) foram obtidos da Sigma Chemical Co. O marcador SSL (4-estereamina-1-oxil-2, 2, 6, 6-tetrametil piperidina) foi gentilmente cedido pela Profa. Shirley Schreier do IQUSP.

A representação esquemática dos fosfolipídios e marcadores de spin utilizados neste trabalho está mostrada na fig. mat-1.

Solventes - O clorofórmio (CHCl_3) utilizado para preparação dos filmes lipídicos (Métodos) foi obtido comercialmente da Merck. A água usada era destilada, e em alguns experimentos utilizou-se água Milli-Q, fornecendo os mesmos resultados. O tampão hepes, ácido N- (2-Hidroxietil)-Piperazina-N'-2-etano sulfônico, foi obtido da Serva.

2. MÉTODOS

Dispersões lipídicas - Inicialmente foram preparados filmes lipídicos através da evaporação de uma solução clorofórmica de fosfolipídios (nas amostras para RPE foi adicionado no máximo 1 mol% do marcador desejado a essa solução). A evaporação foi feita com um fluxo de nitrogênio gasoso, e os tubos de ensaio contendo os filmes foram deixados no vácuo por pelo menos duas horas, para que a evaporação do clorofórmio fosse completa. Esse procedimento foi seguido tanto para o DMPG quanto para o DMPC. Em seguida foi adicionado o solvente desejado (água destilada, solução de tampão hepes 10 mM pH 7.4 na ausência ou presença de uma dada concentração de sal) e a dispersão foi agitada em um agitador de tubos por 2 minutos pelo menos, até que todo o filme

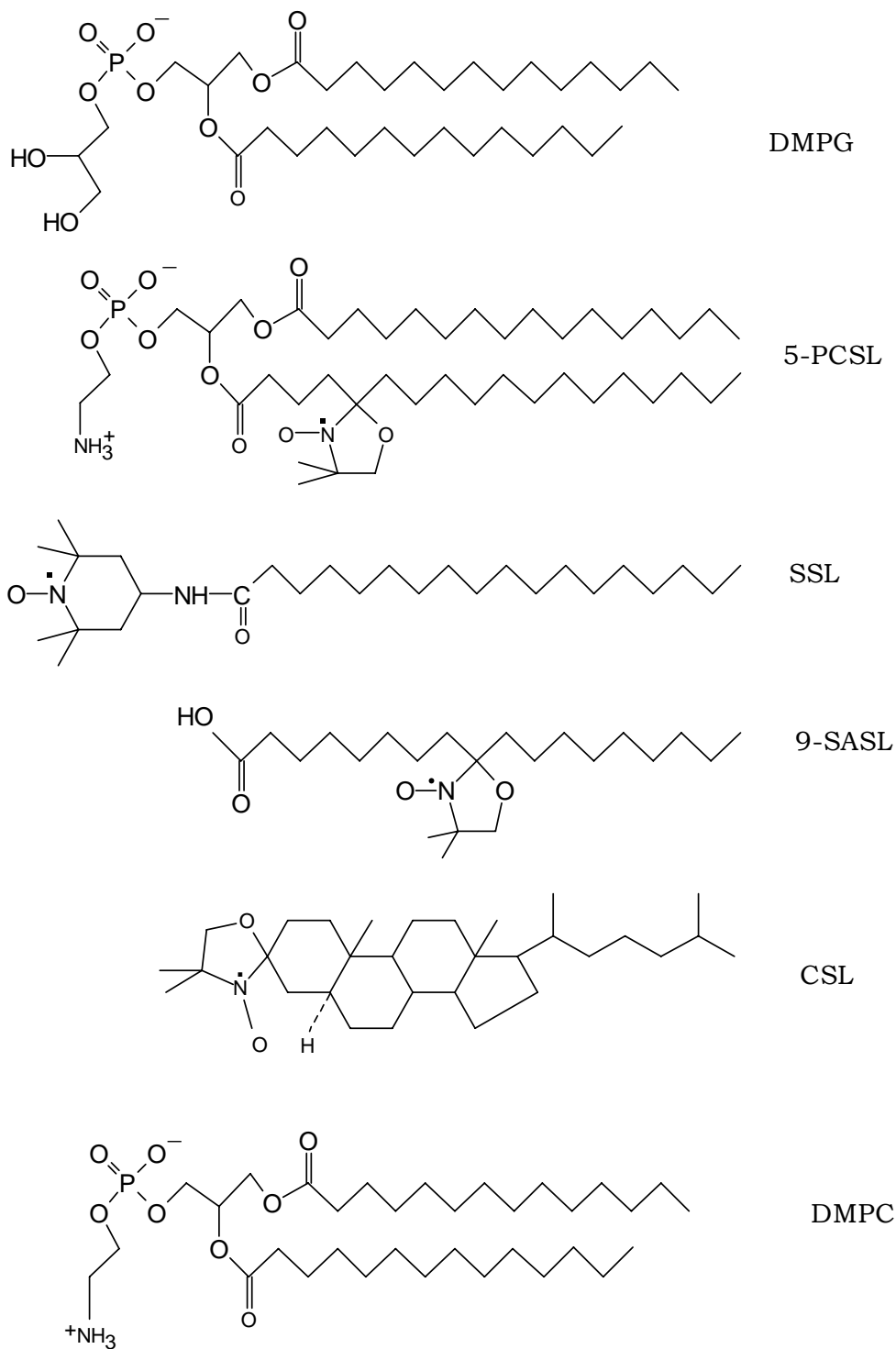


Fig. mat-1: Representação esquemática dos fosfolipídios e marcadores de spin. O 12-PCSL tem a mesma estrutura que o 5-PCSL, entretanto o grupo nitroxido está ligado ao carbono 12 da cadeia hidrocarbônica. O 5,7 e 12-SASL possuem a mesma estrutura da mostrada para o 9-SASL, mas com os grupos nitroxido em diferentes posições da cadeia.

lipídico fosse removido das paredes do tubo de ensaio (algumas vezes foi necessário aquecer um pouco a amostra). As dispersões eram usadas no mesmo dia, a menos que esteja especificado o tempo.

As vesículas unilamelares foram obtidas por extrusão a 30°C (acima de T_m) das dispersões lipídicas, de acordo com o procedimento descrito por Hope et al. (1985). As amostras foram passadas uma vez por um filtro de polycarbonato da Nuclepore de 4000 Å, duas vezes por um filtro de 2000 Å e finalmente pelo menos três vezes por um filtro de 1000 Å. A concentração manteve-se praticamente inalterada durante o processo, como calculado pelo método de dosagem de fosfato. Foram feitas microscopias eletrônicas das vesículas após a extrusão e verificou-se que a maioria delas era realmente unilamelar com diâmetro da ordem de 700 - 1000 Å.

Ajuste de pH - (Lehninger, 1984; Stryer, 1988 e Voet & Voet, 1990) O hepes é um ácido fraco com $pK = 7.55$, ou seja, a $pH = 7.55$ metade do tampão encontra-se na sua forma ionizada e metade na sua forma protonada. Para a titulação de um ácido fraco por uma base forte a equação de Handerson-Hasselbach, obtida das definições de pH, pK e K_d , (eq. pH-2)) descreve o comportamento do pH da solução em função das concentrações das formas protonada e desprotonada do ácido fraco:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (pH-1)$$

onde

$$pK = -\log K_d \quad pH = -\log[H^+] \quad K_d = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad A^- + H^+ \leftrightarrow HA \quad (pH-2)$$

K_d é a constante de dissociação do ácido (A^-) e as concentrações entre colchetes são dadas em mol/l.

Para $pH \approx pK \Rightarrow [A^-] \approx [HA]$, portanto, pequenas concentrações de ácido (H^+) ou base (OH^-) colocadas na solução praticamente não afetam o valor do pH da solução, já que reagem com $[A^-]$ e $[HA]$ respectivamente, mantendo o logaritmo da razão $[A^-]/[HA]$ bem pequeno. Essa região de pH em torno do pK do composto é então chamada de região tamponante, e é de extrema importância em sistemas biológicos, já que pequenas variações de pH significam grandes mudanças na concentração de prótons em solução ($pH = -\log[H^+] \rightarrow [H^+] = 10^{-pH}$).

Dissolvendo 10 mM de hepes em água pura, cujo pH é da ordem de 5.6, uma fração do hepes se dissocia liberando prótons no meio, conseqüentemente diminuindo o

pH da solução, que cai para 5. Para aumentar o pH da solução é necessário o acréscimo de uma base forte (acceptora de prótons). Usamos o hidróxido de sódio (NaOH). Como queríamos chegar na região de tamponamento do hepes foi necessário adicionar bastante base para que o pH chegasse a 7.4.

Adicionou-se pequenas quantidades de NaOH sempre verificando o pH em um pH-metro da Metler Toledo, até que o valor de 7.4 fosse atingido. No entanto é possível calcular a quantidade de NaOH necessária para aumentar o pH de 5 para 7.4. As duas reações principais, quando adicionamos NaOH, são:



Pode-se assumir que todo OH^- em solução reagirá com a forma protonada do ácido, causando a ionização do mesmo, conforme descrito pela primeira reação. Portanto, à medida que a concentração de OH^- é aumentada, a concentração de HA é diminuída e a de A^- é aumentada. Olhando a segunda reação, observa-se que esse aumento de A^- , junto com a diminuição de HA causam uma redução de H^+ , já que essas três espécies encontram-se em um equilíbrio dado por essa segunda reação. Com isso o pH da solução é aumentado à medida que é aumentada a concentração de base (OH^-). A equação de Handerson-Hasselbach relaciona o pH da solução às concentrações de ácido associadas e dissociadas, como visto acima na eq. (pH-1), no entanto é preciso escrevê-las em termos da quantidade de base adicionada. Pela primeira reação da eq. (pH-3) vemos que todo OH^- em solução causa o surgimento de um A^- e o desaparecimento de um HA. Portanto podemos usar que $[\text{A}^-] = [\text{A}^-]_0 + [\text{OH}^-]$ e $[\text{HA}] = [\text{HA}]_0 - [\text{OH}^-]$, onde $[\text{A}^-]_0$ e $[\text{HA}]_0$ são as concentrações no pH inicial de ácido fraco nas formas dissociada e protonada, obtidas através da manipulação das equações (pH-2). No entanto $[\text{A}^-]_0$ é praticamente zero, e a equação de Handerson-Hasselbach (eq. pH-1)) fica

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{OH}^-]}{[\text{HA}]_0 - [\text{OH}^-]} \quad (\text{pH-3})$$

Fazendo este cálculo vemos que são necessários aproximadamente 4 mM de OH^- para que o pH da solução aumente de 5 para 7.4, o que concorda muito bem com a quantidade de NaOH adicionada na prática até que o valor de 7.4 fosse lido no pH-metro. Temos portanto 4 mM de $[\text{Na}^+]$ em solução, já que a dissociação de uma base forte como NaOH é total. No decorrer do trabalho veremos que isso será de grande importância.

O tampão fosfato é preparado de uma forma diferente. Juntam-se certas proporções de dois sais diferentes para que o pH já esteja automaticamente ajustado para 7.4, e que a concentração de tampão seja de 10 mM:

19 ml de uma solução 10 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ → $[\text{Na}^+] = 1,9 \text{ mM}$

81 ml de uma solução 10 mM de Na_2HPO_4 → $[\text{Na}^+] = 2 \times 8,1 \text{ mM}$

resultando em uma concentração total de Na^+ em solução de 18 mM (assumindo dissociação total dos sais), ou seja, o tampão fosfato possui uma força iônica mais de quatro vezes maior que o tampão hepes pH 7.4.

Dosagem de fosfato - (Rouser et al., 1970) As dosagens de fosfato foram feitas em todas as amostras usadas nos “Zimm Plots” e nas medidas de índice de refração, o procedimento sendo o seguinte:

- 1) Guardar uma certa quantidade da amostra lipídica desejada em um tubo de ensaio onde caibam pelo menos 5ml. É importante guardar um volume tal que a quantidade de moles esteja dentro da faixa do padrão de tampão fosfato (de 10 a 100 nmol). (1 mM = 1 nmol/ μl).
- 2) Fazer amostras de referência de tampão fosfato para montar uma curva padrão de absorbância por nmol de Pi (fosfato inorgânico) (que tem que estar na faixa de 10 a 100 nmol).
- 3) Deixar os tubos de ensaio com as amostras e com tampão fosfato em uma estufa a mais de 120°C até que as amostras fiquem secas.
- 4) A partir de agora fazer dois tubos de referência (que não contenham amostra) que servirão de branco nas leituras do espectrofotômetro.
- 5) Adicionar a cada tubo 0.4 ml de HClO_4 (Ácido Perclórico) concentrado (~70%) e colocar os tubos para digerir em um bloco quente a 180° por uma hora. Durante esse processo os tubos devem ficar tampados com uma bolinha de gude em cima, para que haja pouca evaporação. Este tempo é em geral suficiente para a mineralização total do fosfato.
- 6) Deixar a amostra esfriar e adicionar 1ml de água destilada, 0.4 ml de molibdato de amônio a 1.25% (p/v) e misturar cada tubo num vórtex.
- 7) Adicionar 0.4 ml de ácido ascórbico 3% (p/v). Não usar solução de ácido ascórbico com mais de duas semanas após o preparo.
- 8) Misturar novamente num vórtex e deixar os tubos em banho-maria fervente por 10 minutos.
- 9) Deixar as amostras esfriarem e ler as absorbâncias num espectrofotômetro a $\lambda=797\text{nm}$, subtraindo as amostras de referência.
- 10) Fazer as leituras no espectrofotômetro das amostras de tampão fosfato (curva padrão).

11) Comparar as leituras obtidas para as amostras com as obtidas para a solução de tampão. Com isso obteremos a quantidade (em nmol/ μ l) de Pi na solução. Para obter a concentração basta dividir o número obtido pela quantidade de μ l que foi colocada no tubo no início do.

Medidas de espalhamento a 90° - As medidas de espalhamento de luz a 90° foram feitas em um espectrômetro de fluorescência Hitachi F-3010, cuja cela está em contato com um banho e circulador Forma Scientific 2006, para a variação da temperatura. Os valores mostrados nos resultados são os fornecidos por um termopar Fluke 51 K/J colocado dentro da amostra.

Todas as medidas foram feitas no mesmo comprimento de onda. No entanto não foi possível deixar a excitação e emissão no mesmo comprimento de onda, devido a problemas de detecção. Foi escolhido um comprimento de onda pequeno para que o espalhamento fosse grande, assim como suas variações devido à temperatura. Foi usado $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 286 \text{ nm}$. A largura das bandas de excitação e emissão foi de 5 nm.

Foi utilizada uma cela de quartzo com duas paredes grossas e duas finas com 0.4 cm de caminho ótico. A luz incidia em uma das paredes grossas, e foi feita a leitura da luz espalhada a 90°.

Foi sempre esperado pelo menos 5 minutos para estabilização da amostra em cada temperatura. Na tela do aparelho aparecia a intensidade de luz espalhada em função do tempo, de modo que a estabilização da amostra era claramente monitorada. Em alguns momentos a amostra permaneceu cerca de uma hora na mesma temperatura, e a intensidade se manteve constante por todo esse período. Algumas vezes as transições de fase demoravam mais para acontecer, independente se era a transição principal ou a segunda, ou se a temperatura estava sendo aumentada ou diminuída.

As amostras guardadas de um dia para o outro ficavam em uma estufa a uma temperatura entre 35 e 40°C, acima da T_m , portanto.

Medidas de RPE - Os espectros dos marcadores de spin intercalados às membranas de DMPG foram tirados em um espectrômetro ER-200D-SRC da Bruker, pertencente ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. A temperatura era controlada por um aparelho B-ST 100/700 da Bruker. As temperaturas foram conferidas por um termopar. As medidas foram feitas em uma cela de quartzo com volume interno de 80 μ l, de James Scanlon, Costa Mesa, CA.

A potência da microonda utilizada foi de 12,6 mW (atenuação de 12 dB), valor para o qual temos pouca saturação do sinal. A amplitude de modulação (G_{pp}) foi sempre

de 1,25 G. A razão tempo de varredura (s)/constante de tempo (ms) foi sempre mantida igual, no entanto para espectros mais imóveis (temperaturas baixas) era necessário um tempo maior de acumulação. De um modo geral foi usado 500s/500ms (10-14°C), 200s/200ms (16-24°C) e 100s/100ms (26-45°C). As temperaturas usadas foram 10, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, e 45°C, e os experimentos foram feitos em ordem decrescente de temperatura (45-10°C). Em uma das amostras foram feitas a ida e a volta e não foi observado nenhum efeito de histerese.

Os espectros foram gerados em formato ASC-II e os parâmetros de interesse foram obtidos graficamente no programa Micro-Cal Origin 3.0.

Medidas de índice de refração - As medidas de índice de refração foram feitas em um refratômetro de Abbe, gentilmente emprestado pelo Laboratório de Física para Ciências Farmacêuticas e Biológicas do IFUSP. O mesmo banho usado nos experimentos de espalhamento a 90° foi acoplado ao refratômetro, o valor das temperaturas, no entanto, foi dado pelo termopar, colocado diretamente em contato com a amostra. Foi usada uma lâmpada de sódio, cujo comprimento de onda era da ordem de 590 nm, gentilmente emprestada pelo Laboratório de Estrutura da Matéria do IFUSP. Foram feitas medidas do índice de refração da amostra (n) de 14-38°C para as seguintes concentrações lipídicas: 2, 5, 10, 20, 35, 50 e 70 mM. Depois, utilizando o programa Micro-Cal Origin 3.0, a partir de um gráfico de n em função da concentração c , obteve-se a inclinação da reta (dn/dc) para todas as temperaturas. Foram feitas duas dosagens de fosfato de cada amostra.

A medida do índice de refração é baseada no fenômeno de reflexão total, que ocorre, para um certo ângulo, quando a luz passa de um meio mais refringente para um meio menos refringente. O refratômetro de Abbe consiste em um prisma com duas faces polidas e uma despolida, pela qual a luz incide. Em uma das faces polidas é colocada uma gota do líquido cujo índice de refração n_1 se quer descobrir. O prisma é feito de um material com índice de refração n conhecido ($n > n_1$). O aparelho está calibrado para fornecer a leitura do índice de refração do líquido colocado em uma das faces, quando a geometria do aparelho for ajustada para que ocorra a reflexão total.

Medidas de espalhamento a vários ângulos - As medidas de espalhamento a vários ângulos foram feitas em um aparelho Laser Photometer Dawn DSP da Wyatt Technology Inc., cujo comprimento de onda é $\lambda = 633$ nm, em colaboração com o Prof. Mario Politi do Departamento de Bioquímica do IQUSP e com o Prof. Wayne Reed, da Tulane University - EUA, que passou um tempo nesse laboratório, e foi quem fez os programas de análise dos dados fornecidos pelo aparelho.

As amostras tinham que ser passadas em um filtro de 0.2 μm para evitar sujeiras na amostra, devido à alta sensibilidade do aparelho. O aparelho tinha dezoito diodos de detecção dispostos ao redor da amostra.

Os experimentos de intensidade de luz espalhada em função da temperatura foram feitos esquentando a amostra e analisando o espalhamento enquanto a temperatura estabilizava. Um termopar cromel alumel tipo K ligado ao computador fornecia a temperatura da amostra. O mesmo foi feito depois esfriando a amostra e deixando-a estabilizar novamente no aparelho. As duas curvas foram depois juntadas.

Para obtenção dos “Zimm Plots” eram necessárias diferentes concentrações, que não puderam ser muito grandes, pois o espalhamento não poderia sair da escala do aparelho e não poderia haver muita interação entre as macromoléculas, de forma a manter válidas algumas aproximações feitas. As concentrações escolhidas, então, foram, em geral, de 0.1, 0.3, 0.5, 0.75 e 1 mM. A obtenção dos “Zimm Plots” e as grandezas por eles fornecidas foram feitas através de um programa escrito pelo Prof. Wayne Reed.

Medidas de condutividade - As medidas de condutividade foram feitas em um condutivímetro Digimed CD-200 de corrente alternada com uma cela de constante 1 e com eletrodos de platina do Laboratório de Sistemas Biomiméticos do IQUSP. As medidas foram comparadas a valores tabelados de uma solução KCl 10 mM. A condutividade de uma amostra depende de vários fatores, como sua concentração, volume, temperatura e mobilidade dos íons. A condutância é devida tanto aos cátions quanto aos ânions. A espécie que mais conduz é o próton, cerca de 5 vezes mais que o sódio e o potássio, por exemplo. O ânion OH^- também tem uma mobilidade muito maior que o cloro, por exemplo. A condutividade é, em geral, medida em $\Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ ($\text{ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Se adicionamos um eletrólito a uma solução podemos tanto ter uma diminuição quanto um aumento da condutividade da mesma. Se não ocorrer reação iônica a condutividade é aumentada, já que o número de íons em solução aumenta. No entanto, se ocorrer alguma reação iônica podemos ter a substituição de um íon que conduz muito por um que conduz pouco, resultando em uma diminuição da condutividade geral (Vogel, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

1. ESPALHAMENTO A 90°

Estudamos o espalhamento de luz a 90° de amostras de DMPG em diversas condições. A técnica mostrou ser bastante sensível à transição de fase gel - cristal líquido induzida pela temperatura. Durante essa transição ocorre um decréscimo abrupto na intensidade de luz espalhada. A figura esp-1 mostra a intensidade de luz espalhada em função da temperatura para lipossomos de DMPG na seguinte condição específica: 10 mM de tampão hepes pH 7.4. É importante notar que nesse pH o grupo fosfato do DMPG está principalmente carregado ($pK_a = 2.9$ em 100 mM NaCl - Watts et al. 1978 e pK intrínseco ≈ 1.2 , como será analisado na seção 6.).

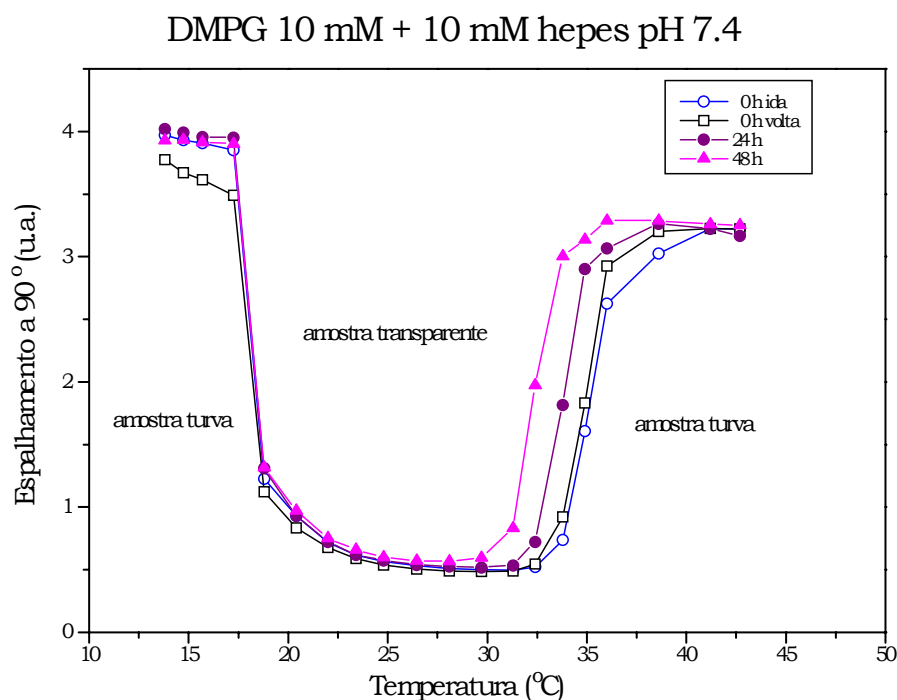


Fig. esp-1: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura. Ida: temperatura crescente; volta: temperatura decrescente.

A transição de fase principal, para o DMPG em tampão hepes, ocorre à temperatura de 18°C (T_m), sendo caracterizada por um grande decréscimo na intensidade de luz espalhada. No entanto observamos que o DMPG nessas condições apresenta uma segunda transição por volta de 35°C (T_p), que, contrariamente à primeira, tem como característica um aumento na intensidade de luz espalhada, atingindo valores da mesma ordem aos obtidos na fase gel. A olho nu, vemos que a amostra é transparente na região de baixo espalhamento (entre as transições) e turva nas regiões de alto espalhamento.

Enquanto a transição principal é uma característica geral de todas as dispersões lipídicas, a pós-transição só foi detectada para o DMPG em certas condições específicas, e, na literatura, encontramos apenas algumas menções a ela (Heimburg & Biltonen, 1994; Salonen et al., 1989), como será discutido mais adiante.

Ainda na figura esp-1 pode-se notar que as duas transições são reversíveis. Entretanto, deixando a amostra incubada em uma estufa por volta de 35°C por dois dias, T_p diminui com o tempo de incubação, sendo que a transição principal não é alterada.

Varição da força iônica do meio - Como já foi dito o DMPG é negativamente carregado, e portanto a interação eletrostática entre as cabeças polares deve ter um papel relevante na estrutura e características da bicamada. Variando a força iônica do meio é possível estudar o efeito do sal no comportamento termotrópico de lipossomos de DMPG. A figura esp-2 mostra o espalhamento de 10 mM de DMPG em diferentes forças iônicas: água destilada, 10 mM de tampão hepes na ausência e presença 10 e 100 mM de NaCl. Todos os solventes estavam ajustados a pH 7.4, com exceção da água pura, cujo pH era por volta de 5.6. Como discutido em Materiais e Métodos foi usada uma base forte (NaOH) para o ajuste de pH do tampão hepes, que ao ser solubilizado em água apresentou um pH de aproximadamente 5. A quantidade de NaOH colocada na solução nos fornece a força iônica da mesma. Para o caso do hepes temos uma força iônica de 4 mM.

Analisando o comportamento das curvas de espalhamento para cada força iônica, podemos notar que a temperatura da transição principal é alterada pela força iônica (tabela esp-I). Quanto mais íons em solução, maior é T_m . Este é um fato conhecido há muito tempo na literatura (Jähnig, 1976; Träuble et al., 1976; Cevc et al., 1980), e será mais extensamente comentado na seção 6.

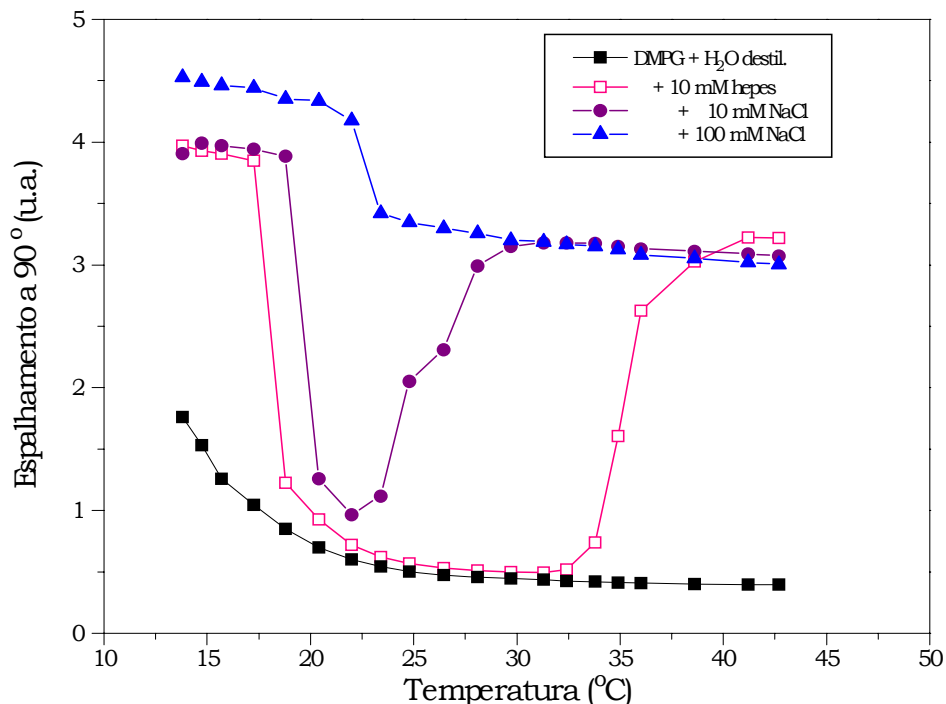


Fig. esp-2 Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura, para diferentes forças iônicas (dadas a seguir em mM). H₂O: 0.0025; hepes: 4, hepes + 10 mM NaCl: 14; hepes + 100 mM NaCl: 104.

No caso de DMPG em água destilada pura, a transição de fase fica extremamente larga, praticamente impossibilitando a definição de um valor para T_m . No artigo de Epan & Hui (1986) fica claro, através da técnica de calorimetria, que o DMPG não apresenta uma transição de fase definida em água destilada. Eles atribuem esse resultado a uma possível perda de cooperatividade entre as moléculas do fosfolípido, devido à forte repulsão eletrostática entre as cabeças. No entanto, como será visto, o DMPG em água pura está quase todo descarregado, pois o pK aparente da solução é muito alto em baixa força iônica.

A pós-transição é extremamente sensível à força iônica, não ocorrendo para forças iônicas muito baixas (água pura) ou muito altas (100 mM NaCl). Na faixa em que a segunda transição ocorre, T_p tem um comportamento contrário ao de T_m : diminui com o aumento da força iônica (Tabela esp-I), ou seja, enquanto a presença de íons em solução estabiliza a fase gel, desestabiliza a fase de baixo espalhamento entre as transições. O espalhamento tem como limites inferior e superior o espalhamento de DMPG em água e o de DMPG em alta força iônica, respectivamente.

Um dos únicos artigos na literatura a detectar a pós-transição do DMPG é o trabalho de Salonen et al. (1989), cujo objetivo é discutir as diferenças estruturais entre

os estereoisômeros 1'-DMPG (espécie que ocorre na natureza), 3'-DMPG e sua mistura racêmica (nosso caso). Experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) com DMPG, variando a concentração de NaCl do meio, foram apresentados para os três tipos de DMPG. Em concentrações de NaCl entre 0 e 100 mM a técnica de DSC foi capaz de detectar para os três tipos de DMPG, além da transição principal, a pós-transição. A entalpia dessa segunda transição é cerca de dez vezes menor que a da primeira. Com o aumento da concentração de NaCl, ΔH_p aumenta, enquanto ΔH_m diminui e os dois picos se aproximam até se colapsarem por volta de 100 mM de sal. Nesse trabalho (Salonen et al., 1989) não são discutidas interpretações para a pós-transição, pois o enfoque do trabalho está nas características de uma fase altamente cristalina, formada após uma incubação da amostra por alguns dias a baixas temperaturas e em presença de NaCl. A formação dessa fase altamente cristalina, que apresenta uma temperatura de transição de fase muito alta, já foi discutida em outros artigos da literatura (Kodama et al., 1993; Epand et al., 1992).

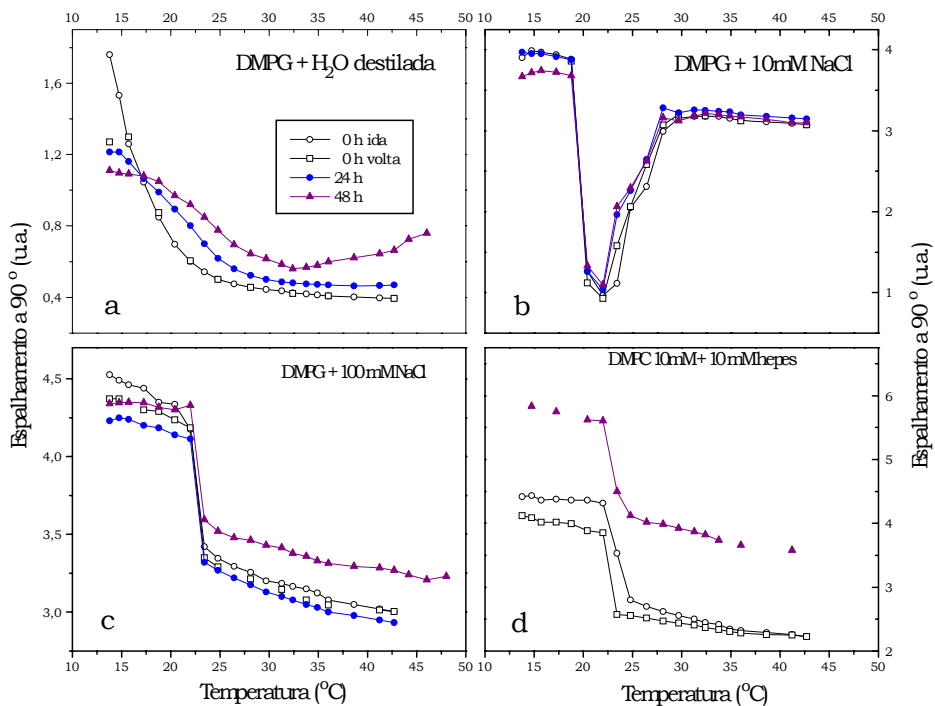


Fig. esp-3 Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG (a, b e c) e DMPC (d) em função da temperatura para diferentes tempos de incubação. O h: medidas feitas após o preparo da amostra. 24 h e 48 h : tempo que a mesma amostra permaneceu em uma estufa a aproximadamente 35 °C.

Uma possível causa do aumento da turbidez da amostra poderia ser a agregação ou fusão das estruturas lipídicas, como observado em outros trabalhos (Avramovic-Zikic & Colbow, 1978). Entretanto, efeitos de agregação e fusão normalmente apresentam histerese, o que não ocorre nos resultados aqui mostrados (fig. esp1). Outros trabalhos (Carmona-Ribeiro & Hix, 1991 e Carmona-Ribeiro, 1990) com o lipídio dihexadecilfosfato mostraram que um aumento da turbidez da amostra na transição de fase principal ocorre para uma faixa de pH próxima ao pK aparente. Esse aumento na turbidez foi atribuído à formação de pontos de ligação entre as vesículas, formando pequenos domínios de um possível arranjo isotrópico dos lipídios (Ellens et al., 1986; Silvius et al., 1976 e Brown et al., 1986).

Semelhante ao DMPG em tampão (fig. esp-1), vemos que T_m também não varia com o tempo de incubação da amostra para as duas concentrações de NaCl usadas (fig. esp-3b e c). T_p , no caso de DMPG em 10 mM de NaCl (fig. esp-3b), varia muito pouco comparado ao DMPG em tampão (fig. esp-1). Para o fosfolipídio em água destilada (fig. esp-3a) a situação é bem mais instável, o espalhamento varia com o tempo e, mesmo não sendo muito nítida, parece que T_m aumenta com o tempo. É curioso observar que após 48 horas o espalhamento apresenta um pequeno aumento para as temperaturas altas.

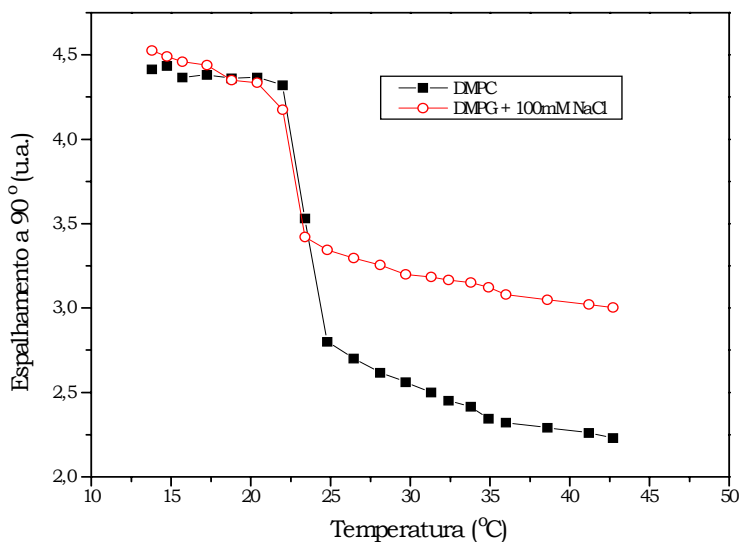


Fig. esp-4 Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG e DMPC em função da temperatura. Amostras medidas após o preparo.

O espalhamento de lipossomos de DMPG em alta força iônica se assemelha muito ao de lipossomos de DMPC, que é um fosfolipídio “zwitteriônico” (além da carga negativa

do grupo fosfato possui a carga positiva da colina - NH_3^+). A transição de fase do DMPC ocorre na mesma temperatura em que a do DMPG em 100 mM de NaCl (fig. esp-4), como já visto em outros artigos (Watts et al., 1978). Ambos não apresentam uma segunda transição o que nos leva a pensar que, com uma alta concentração de íons em solução, as cargas do DMPG tornam-se mais blindadas, de modo que ele se comporta como um fosfolípido com uma menor repulsão eletrostática entre suas cabeças polares. No entanto se abaixamos o pH de modo a termos o grupo fosfato principalmente descarregado, a transição do DMPG passa para 41°C (Watts et al., 1978). Em um outro artigo (Cevc et al., 1980) são analisados tanto o efeito de blindagem das cargas com o aumento de sal, quanto a titulação do grupo fosfato, que a pH neutro possui uma carga negativa e a pH baixo (pH=1.5) está principalmente descarregado. O efeito de blindagem total é atingido em 2 M de sal, quando T_m atinge o seu valor máximo (29°C) e Ψ_o , o potencial na superfície da membrana, se anula. No entanto, T_m de DMPG descarregado é 41°C, muito maior que 29°C, o que sugere a existência de um efeito não eletrostático no aumento em T_m , talvez devido a uma diferente configuração da molécula no seu estado protonado (Cevc et al., 1980).

Tabela esp-I

Condição	T_m (°C)	T_p (°C)
DMPG 1mM + hepes	16	29
DMPG 10mM + H ₂ O	?	-
+ hepes	18	35
+ hepes + 10 mM NaCl	19.5	26
+ hepes + 100 mM NaCl	22.5	-
DMPG 50 mM + hepes	19.5	26
DMPC 10 mM + hepes	22.5	-

Varição da concentração lipídica - Variando a concentração de DMPG também obtemos variações nas temperaturas das duas transições de fase e, novamente, a pós-

transição é a mais afetada. A figura esp-5 mostra o espalhamento de DMPG 1 mM, 10 mM e 50 mM em tampão hepes 10 mM. O espalhamento de DMPG na concentração mais baixa é muito menor do que os outros, portanto seus valores estão em outro eixo y (da direita). T_m apresenta um comportamento semelhante ao obtido com a variação da força iônica: à medida que aumentamos a concentração lipídica, T_m aumenta (Tabela esp-I). No entanto T_p não apresenta um comportamento claro. É importante notar que a força iônica não se alterou em nenhum desses casos, entretanto talvez seja importante levar em conta que aumentando a concentração de lipídio, aumentamos a concentração de contra-íons em solução, embora a relação (carga superficial)/(íons em solução) permaneça constante. Cada molécula de DMPG em pó tem um sódio associado a ela, de tal forma que quando o fosfolipídio está numa solução aquosa o sódio se dissocia da molécula e fica em solução, de acordo com a constante de equilíbrio dessa reação, que será discutida mais adiante. O espalhamento de DMPG 50 mM em hepes é muito semelhante ao de DMPG 10 mM em hepes + 10 mM de NaCl (fig. esp-6).

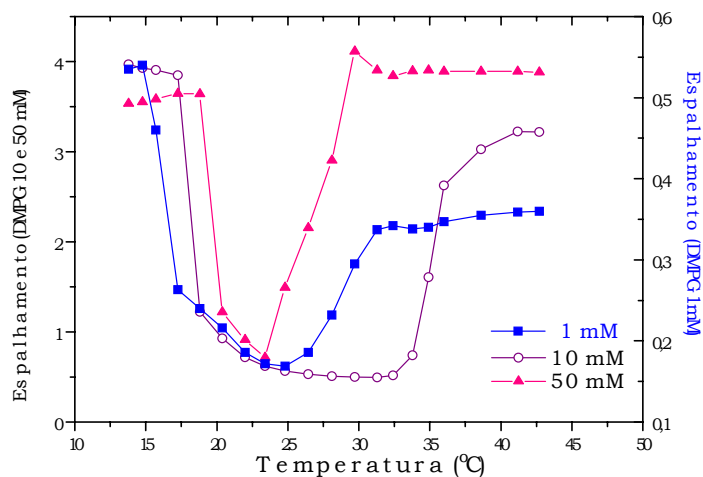


Fig. esp-5: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura para diferentes concentrações lipídicas. O eixo da direita refere-se à intensidade da amostra de concentração mais baixa, e o da esquerda refere-se à intensidade das amostras de 10 e 50 mM de DMPG.

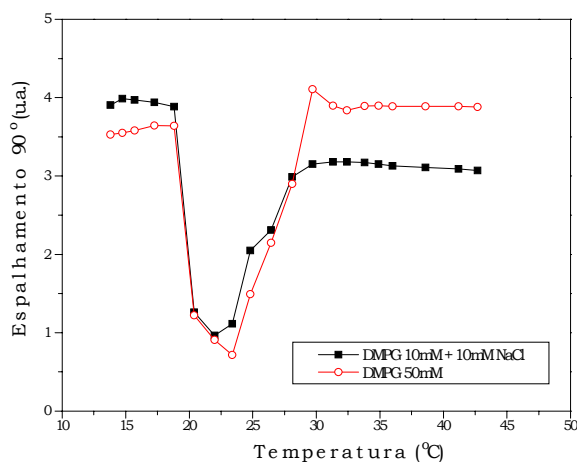


Fig. esp-6: Intensidade de luz espalhada a 90° de dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura.

Na literatura encontramos dados de DSC de DMPG variando a concentração lipídica (Heimburg & Biltonen, 1994). No intervalo de 10 a 150 mM são observados dois picos que estão sobrepostos, pois as curvas de C_p não se anulam entre eles. Com o aumento da concentração lipídica a temperatura do primeiro pico aumenta e a do segundo pico diminui, até praticamente se juntarem na concentração mais alta. Este resultado, bastante curioso, se assemelha muito aos nossos (fig. esp-5) e não poderia ser explicado nos termos da teoria de Gouy-Chapman, como veremos na seção 6., já que a concentração não entra no desenvolvimento da teoria. No entanto o artigo não relaciona a presença dos dois picos de DSC com a existência de duas transições, e interpreta as curvas de C_p como um alargamento da transição de fase principal. Nessas curvas não há uma diferença tão marcante na intensidade do primeiro e do segundo pico, como a encontrada nas curvas de calorimetria do artigo de Salonen et al. (1989) quando a concentração de NaCl é variada.

No artigo acima citado (Heimburg & Biltonen, 1994) foram feitas também medidas de espalhamento de luz a 90° de DMPG 13 mM em 1 mM EDTA e 2 mM tampão fosfato pH 7.5, que possui uma força iônica maior (~ 3.5 mM - Materiais e Métodos) do que a do tampão hepes. O espalhamento obtido se assemelha ao nosso em 10 mM de NaCl (fig. esp-2, 3b) e em 10 mM tampão fosfato (fig. esp-11). Medidas de viscosidade relativa, obtidas para a mesma condição específica, mostraram o seguinte comportamento: nas regiões de alto espalhamento a viscosidade da solução é baixa, praticamente igual à da água, e na região de baixo espalhamento a viscosidade chega a ser cinco vezes maior que a da água.

Na figura esp-7 vemos a variação do espalhamento de DMPG em baixa e alta concentração lipídica (1 e 50 mM respectivamente) com o tempo de incubação da

amostra, como já visto em figuras similares para DMPG 10 mM (fig. esp-3). T_m varia muito pouco com o tempo de incubação em todas as concentrações estudadas. A variação em T_p é maior para as concentrações mais baixas (10 e 1 mM) e praticamente inexistente para a amostra mais concentrada (50 mM). Esse comportamento também foi observado com o aumento da força iônica (fig. esp-3).

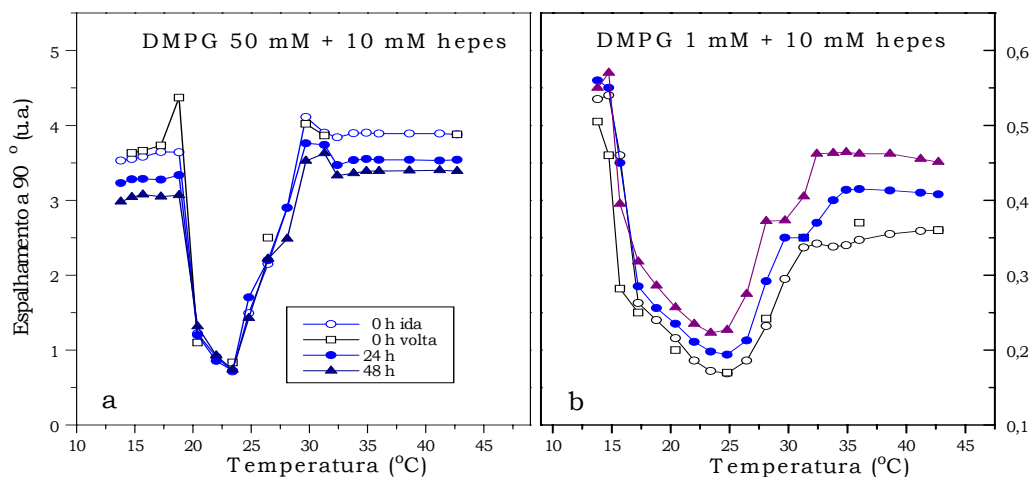


Fig. esp-7: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura para diferentes tempos de incubação, em condições iguais às explicadas na fig. esp-3.

Varição da estrutura, tipo se sal e ajustes de pH - Todos os experimentos apresentados até aqui foram feitos com lipossomos de DMPG, preparados como descrito em Materiais e Métodos. Em geral esse procedimento favorece a formação de estruturas multilamelares, no entanto não temos certeza de quais são as estruturas formadas nas nossas condições, pois é possível que a presença de cargas impossibilite a formação de multibicamadas. Na figura esp-8 vemos o espalhamento de vesículas unilamelares de 1000 Å de DMPG, obtidas pelo método de extrusão (Materiais e Métodos). O espalhamento é bem menor que o de lipossomos, provavelmente indicando que as vesículas unilamelares são centros espalhadores menores que os formados pelos lipossomos. Comparando os dois espalhamentos (fig. esp-9) nota-se que as características gerais são as mesmas, mas T_m e T_p são um pouco menores para as vesículas unilamelares. Já foi discutido na literatura (Marsh et al., 1977) que vesículas menores (principalmente as sonicadas), por terem um raio de curvatura maior, têm uma menor atração de van der Waals entre suas cadeias hidrocarbônicas, causando uma diminuição na temperatura de transição de fase.

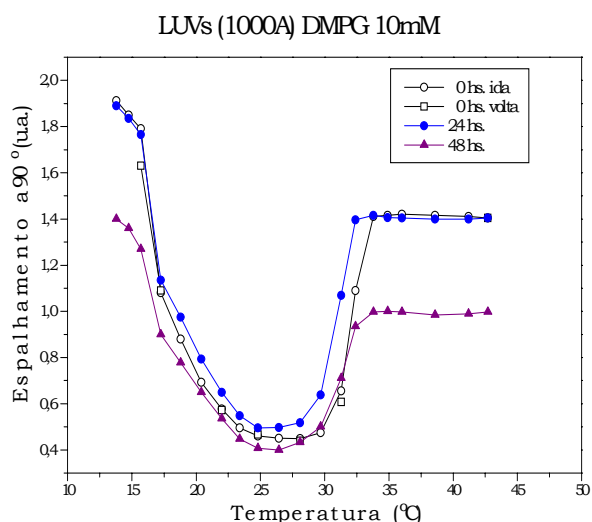


Fig. esp-8: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura para diferentes tempos de incubação, em condições iguais às explicadas na fig. esp-3.

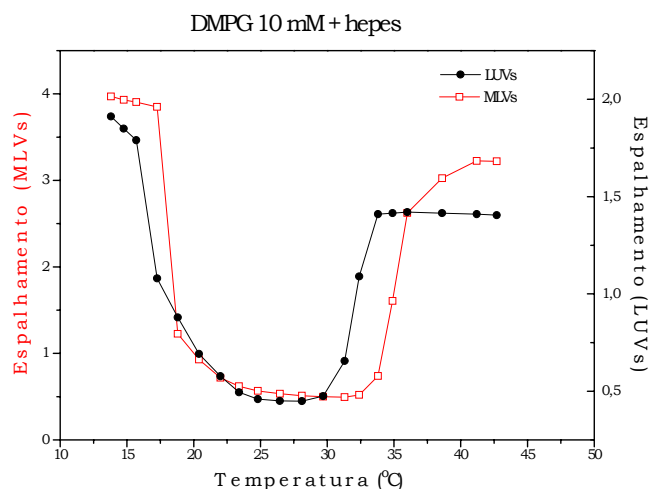


Fig. esp-9: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura. eixo da direita: LUVs (vesículas unilamelares de 1000 Å); eixo da esquerda: MLVs (vesículas multilamelares).

Foi feito um estudo preliminar do espalhamento de DMPG 10 mM em soluções de diferentes sais. Em todos os casos vemos o mesmo comportamento termotrópico, embora os valores de T_m e T_p sejam um pouco diferentes para cada sal (fig. esp-10). Essas diferenças podem ter origem em dois aspectos: a força iônica do meio e a estrutura dos cátions e ânions na água. A série de Hofmeister (von Hippel & Schleich, 1969 e Collins & Washabaugh, 1985) classifica os ânions em agentes desestruturantes (caotrópicos) e estruturantes (cosmotrópicos). Além disso é sabido (Toko & Yamafuji, 1980; Kraayenhof et al., 1996) que existem os cátions estruturadores, como é o caso do Na^+ e Li^+ , e os cátions desestruturadores (K^+ e Cs^+). O estudo preliminar feito aqui usou alguns ânions cosmotrópicos, como o Cl^- e o SO_4^{2-} , este último mais cosmotrópico que o primeiro, e ânions caotrópicos (ClO_4^-). Além disso foram usados dois cátions diferentes, um estruturador (Na^+) e um desestruturador (K^+). No entanto não foi possível relacionar as variações nas temperaturas de transição de fase com as diferentes propriedades estruturadoras dos íons e as diferentes forças iônicas dos sais utilizados (o sulfato de sódio, Na_2SO_4 , tem uma força iônica maior, pois é composto por um ânion divalente e

dois cátions monovalentes). Como o DMPG é negativamente carregado a interação maior de sua superfície é com os cátions, e possivelmente o efeito específico desses seja mais relevante. A uréia é um agente desestruturador, possui uma composição mais complexa ($H_2N-(C=O)-NH_2$) e não se dissocia em água, ou seja, não contribui para a força iônica do meio. Vemos que o espalhamento de DMPG em hepes não é alterado com a presença de 10 mM de uréia. Analisando a figura esp-10 vemos que é difícil estudar o efeito dos sais em T_p , já que todas as temperaturas são próximas e não muito definidas. No entanto é possível distinguir duas temperaturas de transição de fase principal: $T_m = 19.5\text{ }^\circ\text{C}$ para NaCl e KCl e $T_m = 20.5\text{ }^\circ\text{C}$ para $NaClO_4$ e Na_2SO_4 . Na tabela abaixo vemos esquematizado as características dos sais aqui estudados:

Tabela esp-II

Sal	Cátion	Ânion	Força iônica	T_m
NaCl	estruturador	cosmotrópico	10 mM	19.5
KCl	desestruturador	cosmotrópico	10 mM	19.5
Na_2SO_4	estruturador	muito cosmotrópico	30 mM	20.5
$NaClO_4$	estruturador	caotrópico	10 mM	20.5
Uréia	agente desestruturador		0	18

Aparentemente o fato do íon em solução ser um agente estruturante ou desestruturante não é relevante no comportamento de T_m e T_p . Entretanto, esse é um estudo que poderia ser mais extensamente estudado.

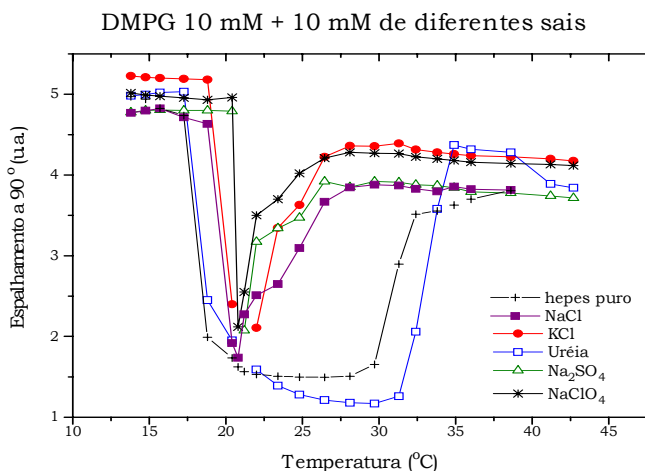


Fig. esp-10: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em 10 mM de diferentes sais em função da temperatura. NaCl: cloreto de sódio; KCl: cloreto de potássio; Na_2SO_4 : sulfato de sódio e $NaClO_4$: perclorato de sódio.

Trocando o tampão hepes por tampão fosfato, que possui uma força iônica maior (4 e 18 mM, respectivamente), vemos que o espalhamento fica semelhante ao de tampão hepes + 10 mM de NaCl, cuja força iônica é de $4 + 10 = 14$ mM (fig. esp-11).

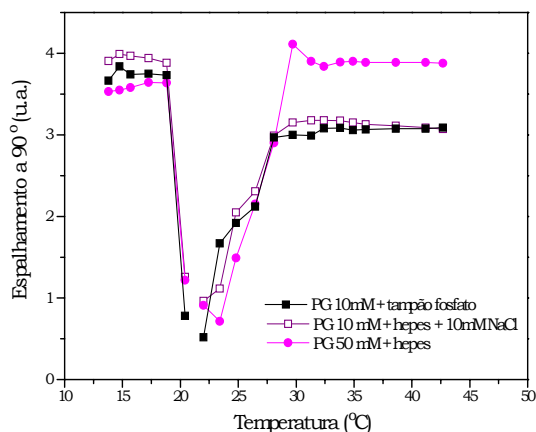


Fig. esp-11 Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em diferentes tampões e concentração lipídica, em função da temperatura.

O fato do pH estar ajustado também é de extrema importância para o espalhamento. Na figura esp-12a vemos o espalhamento de DMPG em tampão hepes antes e depois de ajustado o pH. Assim que o hepes é solubilizado em água destilada a solução apresenta $\text{pH} = 5$. Nessa condição a força iônica da solução é muito parecida com a da água, já que a quantidade de hepes dissociado é muito baixa ($\text{pK} = 7.55$). De fato o espalhamento nessa condição fica muito parecido com o de DMPG em água pura, com a transição principal muito larga e sem a pós-transição. Após ajustar o pH, com aproximadamente 4 mM de NaOH para 7.4, o espalhamento obtido assemelha-se com o da figura esp-1. Nesse pH temos populações praticamente iguais de tampão na forma associada (protonada) e metade na forma dissociada (desprotonada).

DMPG 10mM

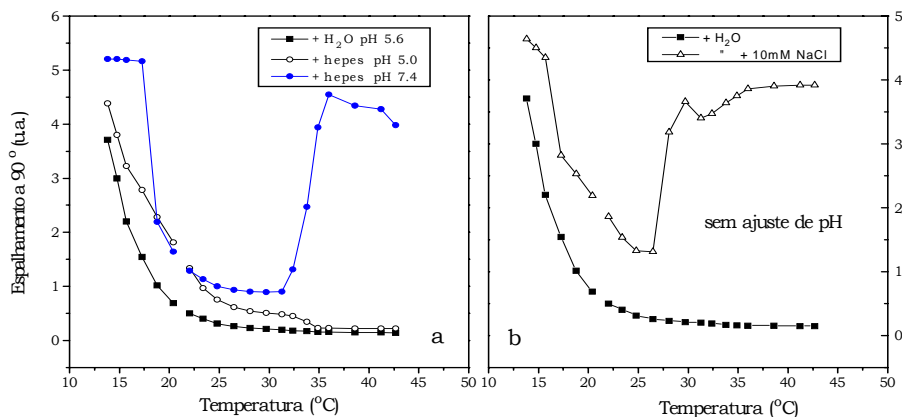


Fig. esp-12: Intensidade de luz espalhada a 90° por dispersões lipídicas de DMPG em função da temperatura. a) H₂O: pH = 5.6; hepes solubilizado em água: pH = 5.0 e hepes + 4 mM NaOH: pH = 7.4. b) H₂O: pH = 5.6 e H₂O + 10 mM NaCl: pH = 5.6.

Adicionando 10 mM de NaCl à água destilada o espalhamento da dispersão lipídica apresenta as duas transições de fase, mas com T_m e T_p menores que as obtidas com hepes pH 7.4 (fig. esp-12b), o que talvez esteja relacionado a uma estabilidade menor na amostra, que na ausência de hepes não está tamponada. Como já mencionado anteriormente, e que será mais amplamente comentado na seção 6., o pK aparente do DMPG varia com a força iônica. Portanto se o DMPG está principalmente descarregado em água pura, ao adicionarmos NaCl induzimos a desprotonação do DMPG, aumentando o número de cargas negativas na superfície.

2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

Através da técnica de RPE podemos obter informação quanto à ordem e mobilidade de marcadores de spin inseridos na bicamada de DMPG. Os marcadores usados foram o 5 e 12-PCSL, o CSL, o SSL e o 5,7,9,12-SASL, mostrados na figura mat-1. Cada marcador fornece informações de diferentes micro-regiões da membrana. Os dois marcadores de spin derivados de PC (Materiais e Métodos), têm o grupo paramagnético nitróxido ligado em um ao carbono 5, perto de cabeça polar, e no outro ao carbono 12, na região central da bicamada. Como na transição de fase principal ocorre uma mudança nas cadeias hidrocarbônicas, que passam de uma configuração toda estendida (“all-trans”), para uma em que ocorrem dobras e, portanto, a mobilidade das cadeias é maior, esperamos que o marcador de spin que está inserido na membrana sinta essas variações. Quanto mais no interior da membrana o marcador está, mais sensível a essas variações ele é.

O marcador CSL, derivado do colesterol, é uma molécula bem mais rígida, tendo pouca liberdade de movimento interno. Seu principal movimento é em torno de seu próprio eixo. O SSL, derivado da estearamida, é um marcador situado na região da cabeça polar, e portanto fornece informações da mobilidade das cabeças polares. Ao contrário dos outros marcadores acima citados, o nitróxido do SSL está alinhado preferencialmente em relação ao eixo x da molécula, enquanto nos outros marcadores seu alinhamento é na direção do eixo z. Esse fato faz com que o primeiro pico de absorção do espectro de SSL (correspondendo à $m = +1$) seja maior que os outros a altas temperaturas.

Os marcadores de spin derivados de ácido esteárico (n-SASL), possuem somente uma cadeia hidrocarbônica, e uma cabeça polar pequena, contendo somente um grupo OH, que pode ou não estar carregado. Embora esse marcador apresente uma certa flutuação de posição na membrana, as diferentes posições do grupo nitróxido são sensíveis a diferentes micro-regiões da membrana (Biaggi et al., 1997).

A partir dos espectros de RPE é possível obter vários parâmetros ligados à ordem e mobilidade dos marcadores. Durante este trabalho foram escolhidos os parâmetros mais sensíveis às variações ocorridas durante a transição de fase e devidas às diferentes forças iônicas, além da precisão das medidas dos parâmetros.

Os resultados mostrados a seguir são a média de experiências com duas amostras distintas.

Fig. epr-1: Espectros de 5-PCSL (1 mol%) inseridos em membranas de DMPG a várias temperaturas.

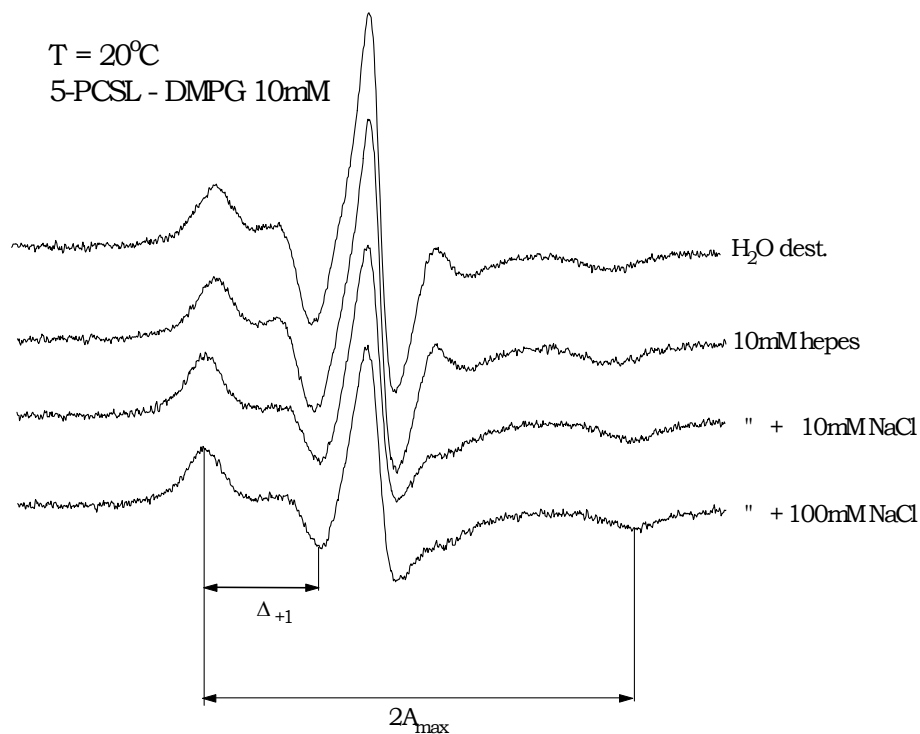


Fig. epr-2: Espectros de 5-PCSL inseridos em membranas de DMPG tirados à 20 °C para diferentes forças iônicas. A_{max} : desdobramento hiperfino máximo, Δ_{+1} : parâmetro relacionado à largura de linha.

Variação da força iônica - Na figura epr-1 são mostrados espectros de 5-PCSL inseridos em bicamadas de DMPG 10 mM nas diversas forças iônicas e nas várias temperaturas estudadas. A seguir, na figura epr-2, temos espectros de 5-PCSL a 20°C nas diferentes forças iônicas. A partir dos espectros é possível calcular parâmetros relacionados à ordem/mobilidade do grupo nitróxido, como discutido na teoria de RPE. Foram calculados, a partir dos espectros, dois desses parâmetros, o desdobramento hiperfino máximo (A_{max}), que traz componentes de ordem e mobilidade, e o parâmetro Δ_{+1} , que engloba a largura de linha e outros efeitos (fig. epr-2). A transição de fase principal é sentida pelos dois parâmetros, mas ambos apresentam uma transição alargada, e um dos motivos para isso é que esse marcador está muito próximo à região da cabeça polar, e portanto possui uma mobilidade restrita. No entanto verifica-se que os valores

aproximados de T_m coincidem com os obtidos através da técnica de espalhamento (Tabela esp-I). Não há indício de uma segunda transição vista por esse marcador.

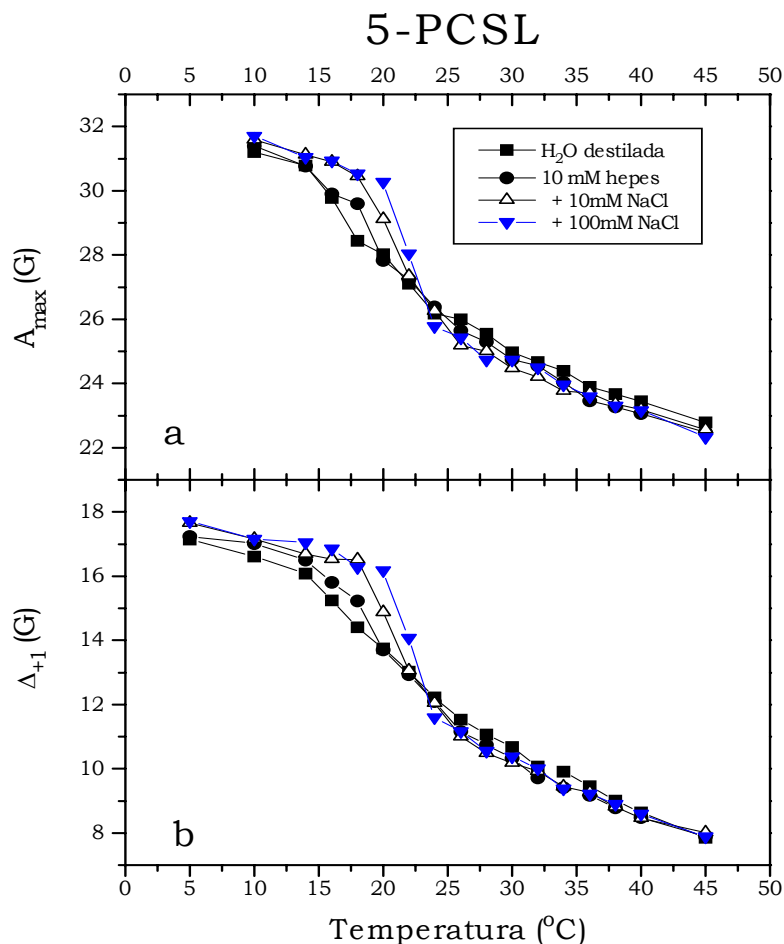


Fig. epr-3: Variação dos parâmetros a) A_{max} b) Δ_{+1} , medidos nos espectros de 5-PCSL conforme mostrado na fig. epr-2. A diminuição por volta de 20°C indica a mudança de ordem/mobilidade ocorrida na membrana após a transição de fase.

As mesmas experiências foram feitas para o marcador 12-PCSL (fig.epr-4 e 5). Os resultados obtidos para esse marcador (fig. epr-6) são extremamente semelhantes aos obtidos para o 5-PCSL, no entanto para este marcador não foi possível calcular A_{max} , devido à indefinição de um dos extremos do desdobramento hiperfino (fig. epr-4). A transição principal, monitorada pela variação do parâmetro Δ_{+1} , fica mais definida para o 12-PCSL, já que o grupo nitróxido desse marcador está numa região de maior liberdade de movimento, sendo portanto mais sensível às mudanças ocorridas na transição de fase. Novamente os valores de T_m com a variação da força iônica são semelhantes aos da Tabela esp-I.

Fig. epr-4: Espectros de 12-PCSL nas mesmas condições que as da fig. epr-1.

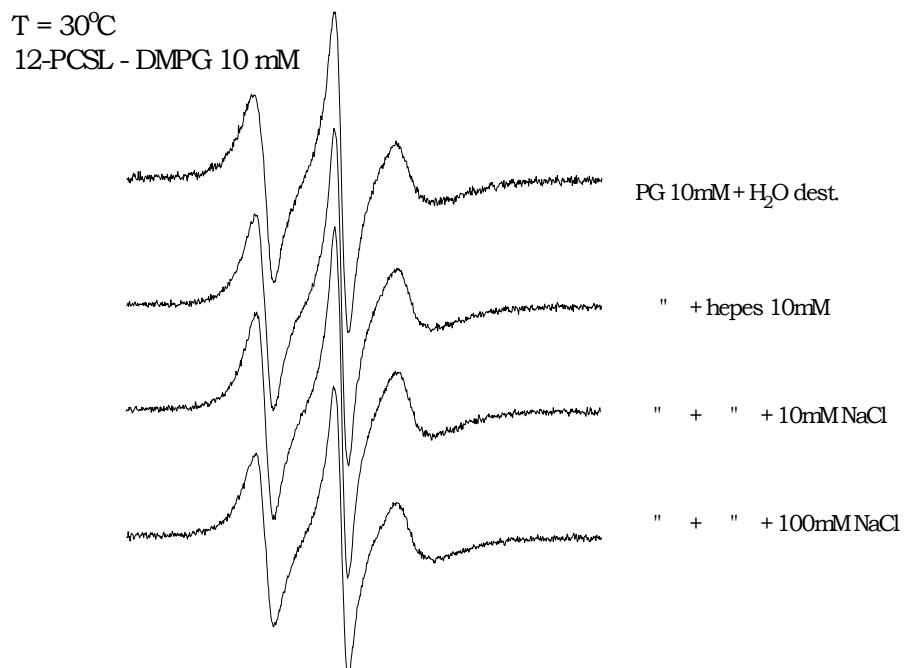


Fig. epr-5: Espectros de 12-PCSL inseridos em membranas de DMPG a 30°C para as diferentes força iônicas.

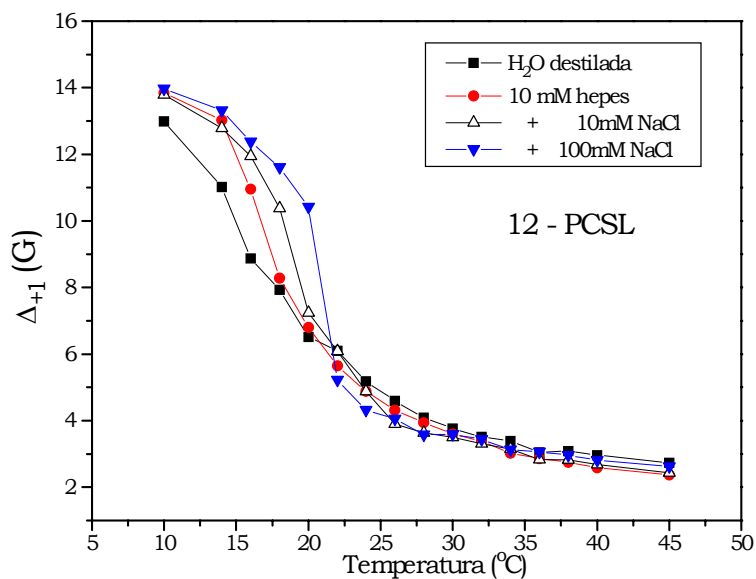


Fig. epr-6: Variação do parâmetro Δ_{+1} , obtido dos espectros de 12-PCSL, com a temperatura. A queda observada indica a temperatura na qual ocorre a transição de fase.

No marcador CSL (fig. epr-7) nenhum parâmetro mostrou ser sensível às diferenças na força iônica do meio, e somente A_{\max} (fig. esp-8) apresentou uma transição de fase definida. É possível notar apenas que T_m de DMPG + 100 mM de NaCl é maior que T_m nas outras condições. A segunda transição também não é sentida por este marcador.

Fig. epr-7: semelhante à figura epr-1, mas para o CSL.

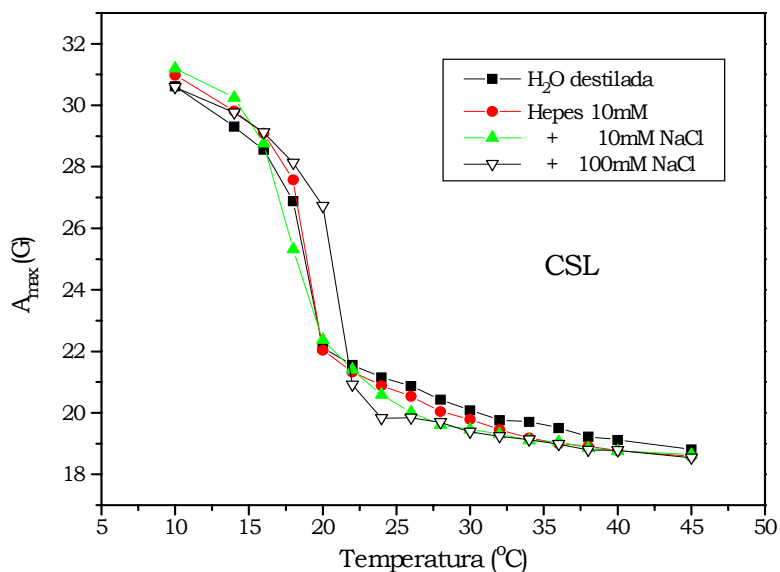


Fig. epr-8: Variação de A_{max} em função da temperatura, obtido dos espectros de CSL. A transição principal é monitorada pelo declínio no valor de A_{max} .

O marcador de superfície SSL também só se mostrou sensível à primeira transição, como visto na figura epr-9 através da largura de linha do primeiro pico (ΔH_{+1}). T_m de DMPG em 300 mM NaCl é maior que de DMPG em hepes e da ordem de DMPC, como já obtido nas experiências de espalhamento (fig. esp-2,4).

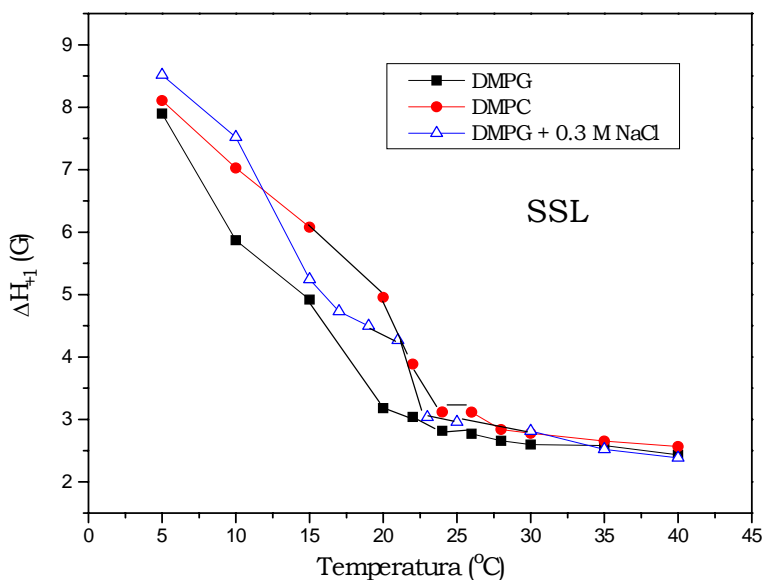


Fig. epr-9: Largura de linha lorentziana do primeiro pico em função da temperatura. DMPG e DMPC 10 mM.

Os espectros de 9-SASL inseridos em membranas de DMPG não foram sensíveis às diferentes forças iônicas. As temperaturas de transição de fase foram praticamente iguais para todos os casos (resultados não mostrados). Entretanto, como já dito, o SASL possui uma flutuação dentro da membrana, e a presença de sal pode afetar a ionização de sua cabeça polar.

Variação da concentração lipídica e estrutura da membrana - Na Tabela esp-I vimos que T_m de DMPG 50 mM é maior que T_m de DMPG 10 mM, quando medida pela técnica de espalhamento de luz. Este resultado não é reproduzível por RPE de nenhum marcador estudado, pois as temperaturas de transição de fase são praticamente iguais nas duas concentrações lipídicas, como é visto para o 5- e 12-PCSL, nas figuras epr-10 e epr-11, respectivamente. Entretanto, a transição de fase é vista de forma muito alargada nos experimentos de RPE, dificultando uma precisão na definição do valor de T_m .

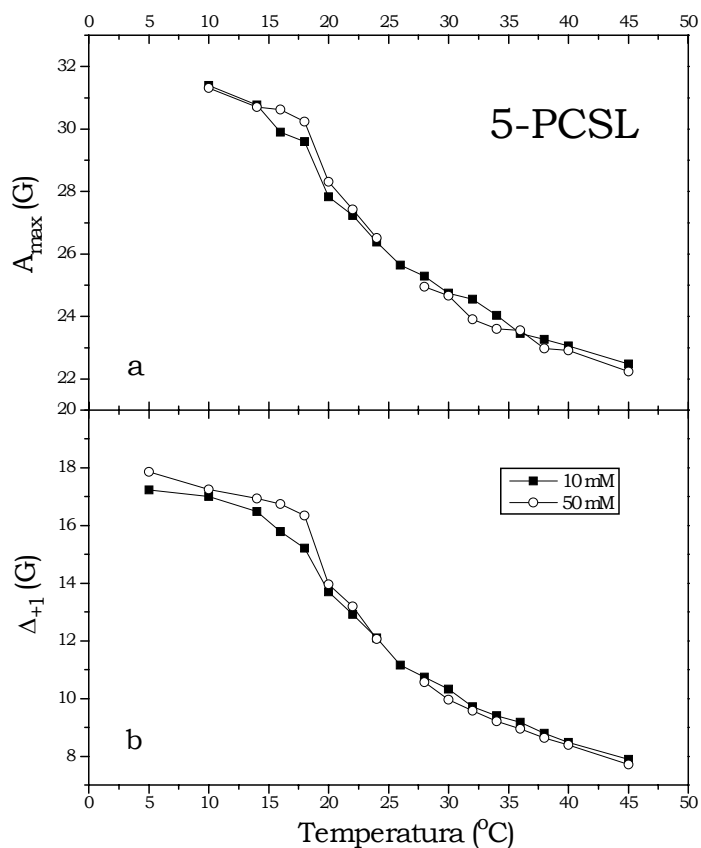


Fig. epr-10: Variação de A_{max} com a temperatura (5-PCSL). DMPG 10 e 50 mM

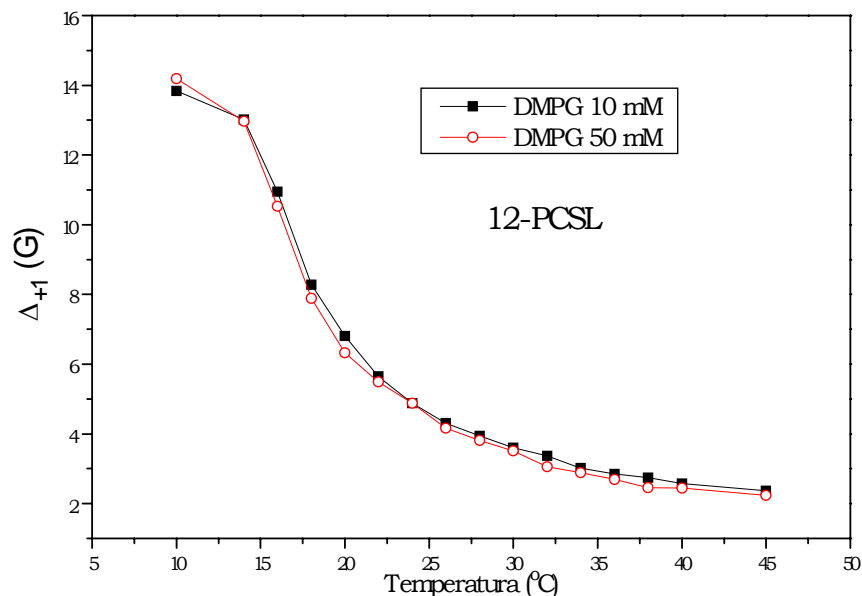


Fig. epr-11: Variação de Δ_{+1} com a temperatura (12-PCSL). DMPG 10 e 50 mM.

Não foi possível realizar experimentos com o DMPG 1 mM, pois a concentração de marcador na membrana tem que ser no máximo de 1 mol%, e no caso de uma concentração lipídica muito baixa, o sinal/ruído fica muito ruim, sendo praticamente impossível analisar os espectros.

Foram feitas também experiências com 9-SASL inserido em lipossomos e em vesículas unilamelares (passadas pelo extrusor). A partir dos valores de A_{\max} não foi possível monitorar possíveis mudanças de ordem/mobilidade nas duas estruturas. A transição de fase parece ocorrer para a mesma temperatura (resultados não mostrados).

Partição do marcador em água- Foi calculada, a partir de espectros de um trabalho anterior (Biaggi et al., 1997) a partição na água de marcadores de spin derivados de ácido esteárico ligados em diferentes posições da cadeia (5, 7, 9, 12 - SASL). Para marcadores de spin derivados de fosfolípido, como o 5- e 12-PCSL a partição em água é praticamente nula, pois essas moléculas são muito mais apolares do que o ácido esteárico. Vemos pela figura epr-12a que quanto mais no final da cadeia está o grupo nitróxido, maior sua partição na água. Este é comportamento esperado, pois o grupo nitróxido é mais hidrofílico que a cauda hidrocarbônica, portanto quanto mais longe da cabeça polar é o marcador, menos hidrofóbica é sua cauda. Para todos os marcadores, aumentando a temperatura da amostra aumentamos a quantidade de marcador dentro

da membrana, e o aumento é maior para as moléculas nas quais o marcador está mais no final da cadeia. A maior variação ocorre por volta de T_m , quando a membrana torna-se mais fluída.

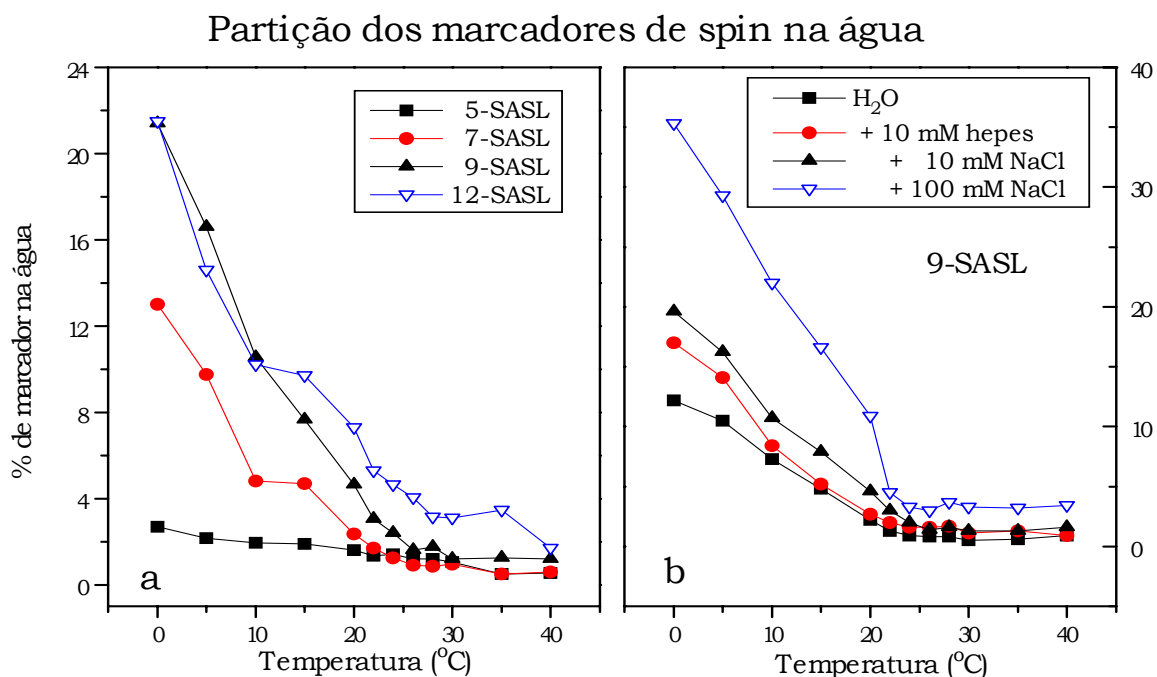


Fig. epr-12: Variação na porcentagem de marcador em água com a temperatura a) para o grupo nitróxido em diferentes posições da cadeia (DMPG + 10 mM hepes) e b) para diferentes forças iônicas (9-SASL).

A partição do marcador na água aumenta com o aumento da força iônica (fig. epr-12b), o que talvez indique que esteja ocorrendo um aumento na rigidez da membrana, já que a variação se dá no sentido contrário ao do aumento na temperatura.

Deixando a amostra incubada a 10°C, o marcador tende a sair da membrana no caso de água pura e entrar mais para forças iônicas maiores (resultados não mostrados).

3. ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Como visto na teoria de espalhamento de luz a intensidade de luz espalhada por uma amostra é proporcional ao quadrado da variação do índice de refração da solução com a concentração de soluto no solvente (dn/dc). É sabido que na transição de fase principal a espessura da membrana diminui (Biltonen, 1990; Lee, 1983, Täuble & Haynes, 1971), pois o comprimento das cadeias hidrocarbônicas é reduzido, devido à formação de dobras (Träuble & Haynes, 1971), levando a um decréscimo no índice de refração da amostra. No entanto é preciso saber se somente este decréscimo seria responsável pela grande diminuição observada para dispersões de DMPG, principalmente em forças iônicas baixas (em tampão hepes com e sem 10 mM de NaCl), onde é observada a maior queda.

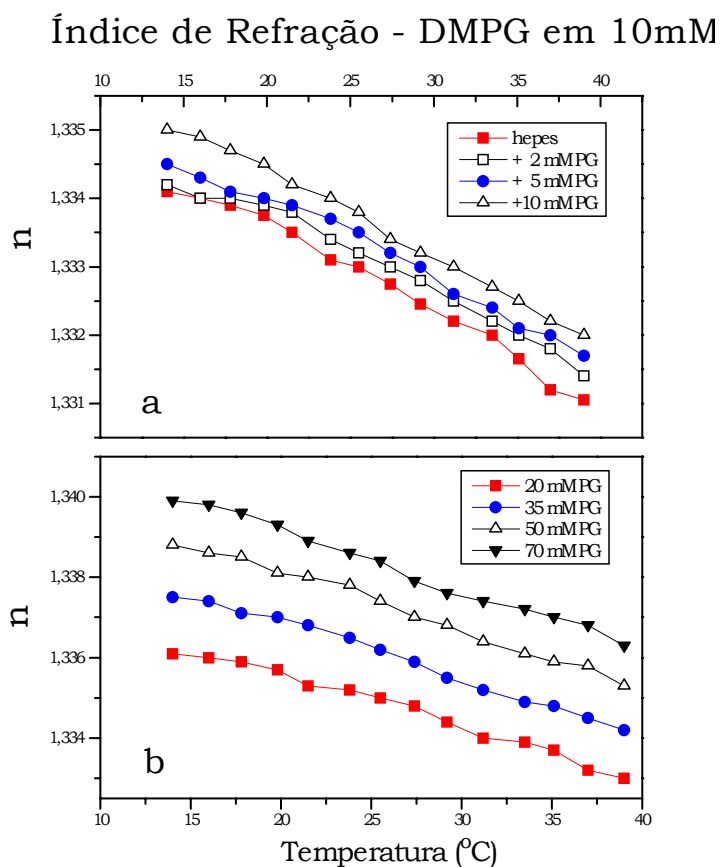


Fig. n-1: Variação do índice de refração da amostra em função temperatura para diferentes concentrações lipídicas.

Os experimentos foram feitos em um refratômetro de Abbe, como discutido em Materiais e Métodos, que nos forneceu o índice de refração para cada temperatura (fig. n-1). Fizemos o mesmo experimento para várias concentrações lipídicas (no intervalo de 1 a 70 mM) e com isso foi possível obter dn/dc a partir da inclinação das retas $n \times c$ (fig. n-2) para as várias temperaturas. Mesmo a precisão do aparelho não sendo muito boa, vemos que ele nos fornece o comportamento linear esperado do índice de refração com a concentração. No total três experimentos foram feitos, e não vemos um comportamento muito claro da variação de dn/dc com a temperatura para os três casos (fig. n-3a). Dosagens de fosfato foram feitas para checar a concentração lipídica, e, usando os valores corrigidos, eram obtidos apenas valores absolutos um pouco diferentes, nunca alterando o comportamento relativo das curvas de dn/dc em função da temperatura. A média dos três experimentos (fig. n-3b) mostra que no caso de DMPG em hepes não é possível detectar a transição principal e nem a pós-transição. Uma das razões para isto talvez seja o fato de que para cada concentração lipídica temos uma temperatura de transição de fase diferente, o que acabaria alargando a transição de dn/dc , que utiliza várias concentrações para ser calculado. De qualquer forma a variação máxima encontrada em dn/dc em todo o intervalo de temperatura estudado (15 %) não é capaz de explicar uma queda de quatro vezes no espalhamento, como de fato ocorre (fig. esp-1).

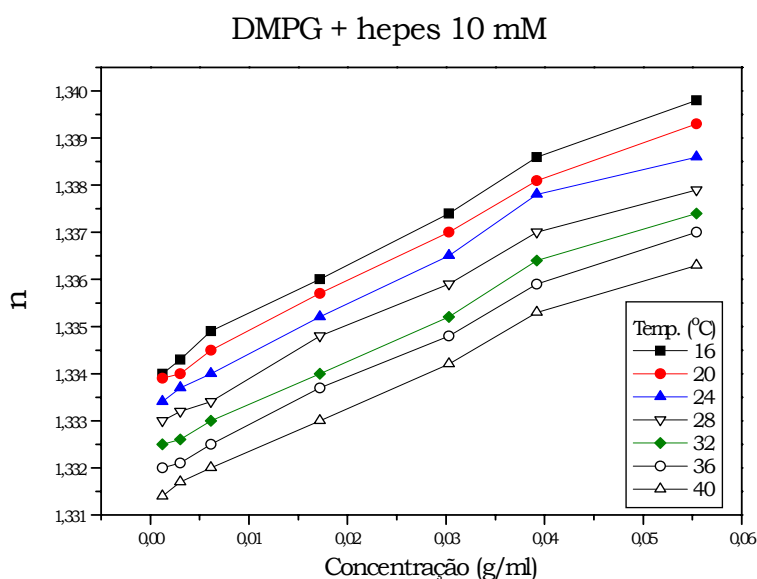


Fig. n-2: Variação do índice de refração da amostra em função da concentração lipídica. A inclinação de cada reta fornece o incremento no índice de refração (dn/dc) para cada temperatura.

Incremento no Índice de Refração
DMPG + hepes 10 mM

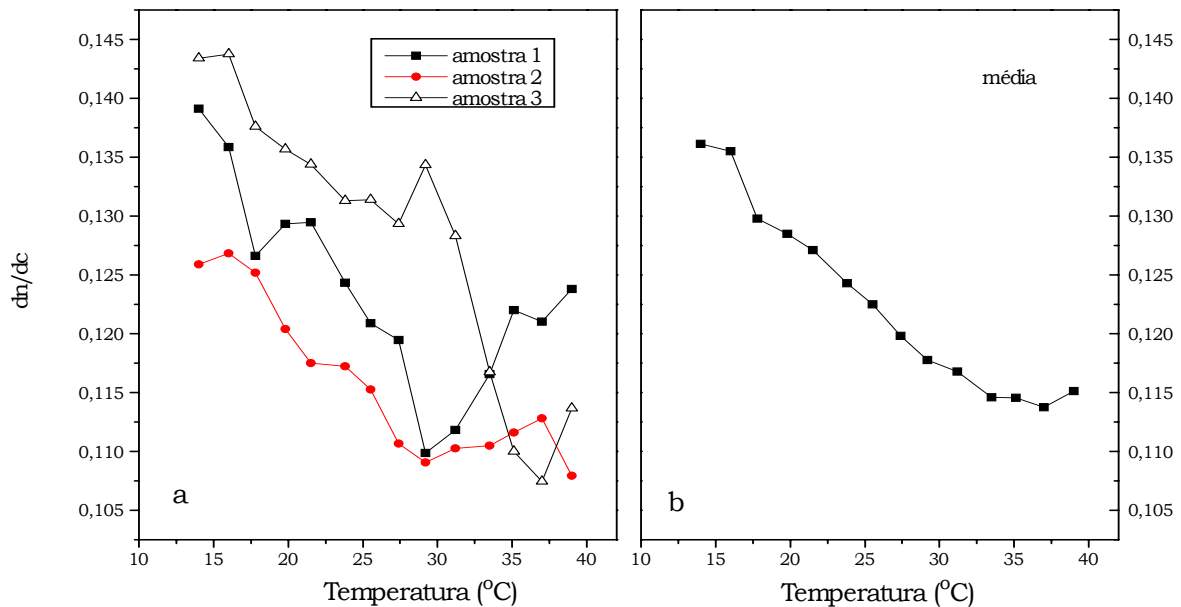


Fig. n-3: Variação de dn/dc com a concentração. a) Três amostras distintas. b) média das três amostras.

Na literatura encontramos artigos que explicam a queda ocorrida no espalhamento de outros lipídios com a variação em dn/dc (Disalvo, 1991). A magnitude dessa queda, no entanto, se assemelha mais com as obtidas para DMPG em alta força iônica e DMPC (fig. esp-4), que são bem menores que DMPG em forças iônicas menores. Fizemos o mesmo experimento para DMPG + 100 mM de NaCl (fig. n-4, n-5), e nesse caso foi possível distinguir uma transição de fase. As duas amostras ficaram muito semelhantes. Na figura n-6a está mostrada a média das duas experiências. A variação ocorrida em dn/dc na transição de fase (8%) é suficiente para explicar a queda do espalhamento:

$$i \propto \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad \frac{i_{gel}}{i_{C.Liq.}} \approx 13 \quad \frac{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{gel}^2}{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{C.Liq.}^2} \approx 12$$

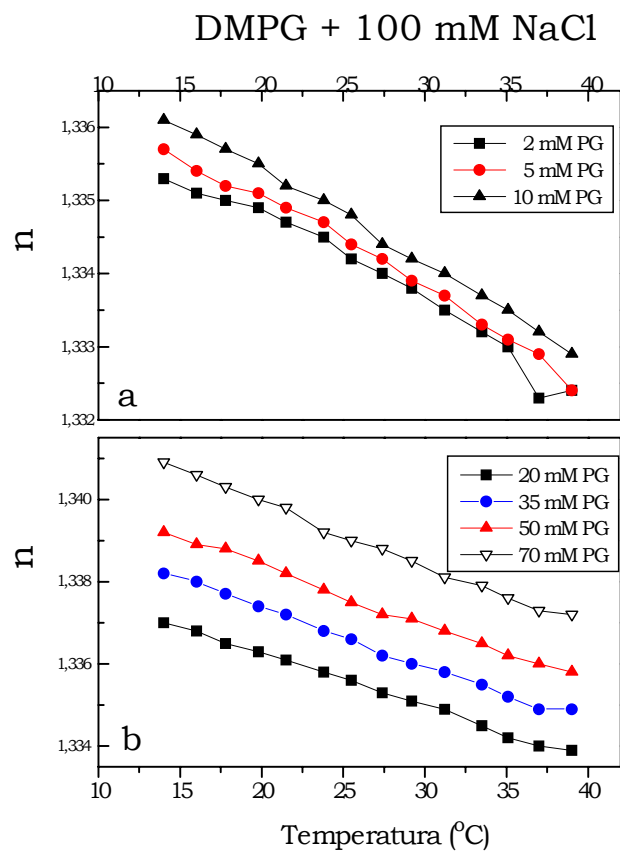


Fig. n-4: Variação do índice de refração com a temperatura para dispersões de diferentes concentrações de DMPG em hepes 10 mM pH 7.4 + 100 mM NaCl.

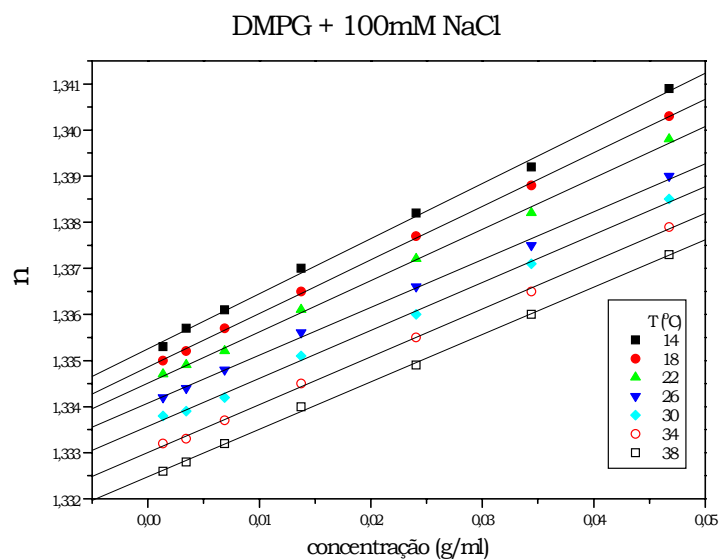


Fig. n-5: Variação do índice de refração com a concentração lipídica. Mesmas condições às da fig. n-4.

Incremento no índice de refração
DMPG + 100 mM NaCl

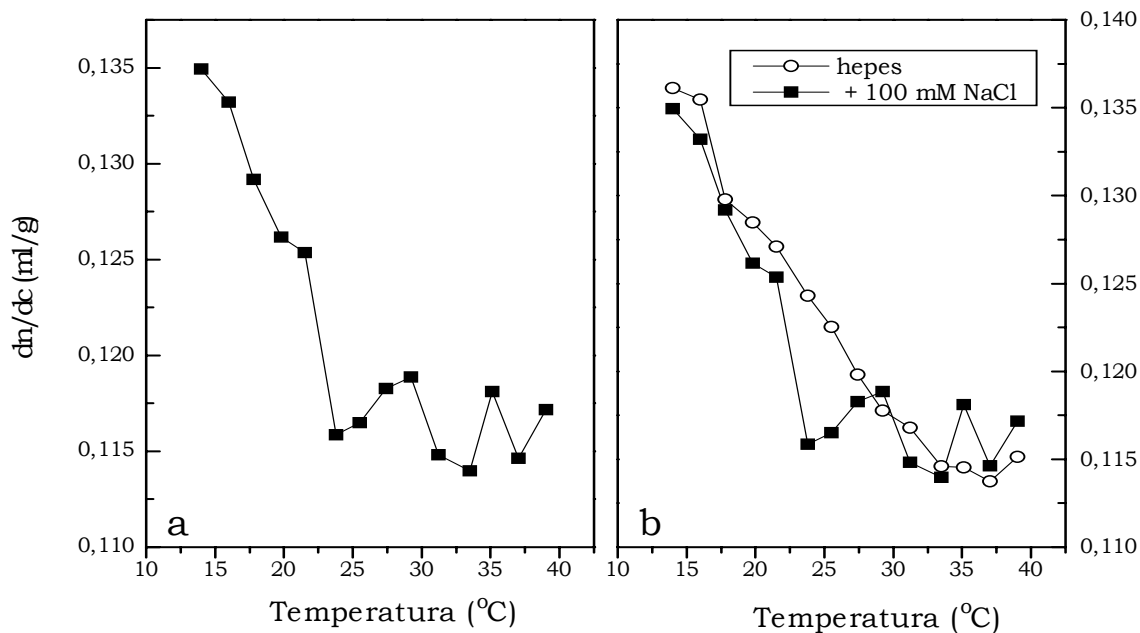


Fig. n-6: Variação do incremento do índice de refração com a temperatura. a) DMPG + 100 mM NaCl. b) comparação com DMPG em hepes

Na figura n-6b vemos a variação em dn/dc , em função da temperatura, para força iônica baixa e alta juntas, mostrando que realmente o comportamento de dn/dc em alta força iônica é diferente na região da transição de fase.

Portanto para o DMPG em alta força iônica, que não apresenta segunda transição, a queda do espalhamento na transição principal pode ser causada somente pelas variações ocorridas na espessura da membrana durante a transição, que segundo Yi & MacDonald (1973) é o motivo pelo qual o índice de refração varia na transição de fase. No caso de força iônica baixa, quando os efeitos da carga de superfície são mais evidentes, ocorre algum outro processo, disparado pela transição de fase, que leva a um estado de espalhamento muito menor, e mais curioso, após uma certa temperatura (T_p) ocorre uma volta para o estado de maior espalhamento.

4. ZIMM PLOTS

O método desenvolvido por Zimm (teoria de espalhamento) permite, dentro das aproximações do modelo, a obtenção de grandezas tais como o peso molecular (M_w), o raio de giração (R_g) e o segundo coeficiente de virial (A_2). Para tal precisamos do espalhamento a diferentes ângulos de amostras com diferentes concentrações, para que seja possível extrapolar os dados para concentração e ângulo nulos. As experiências foram feitas três vezes para lipossomos de DMPG no intervalo de concentração de 0,3 a 1,5 mM em três temperaturas diferentes: antes de T_m (fig. zimm-1a), entre T_m e T_p (fig. zimm-1b) e após T_p (fig. zimm-1c).

Fig. zimm-1: “Zimm Plots” de DMPG em hepes 10 mM pH = 7.4. Concentrações lipídicas (mM): 0.20, 0.36, 0.57, 0.70 e 0.93. a) $T < T_m$ (15°C), b) $T_m < T < T_p$ (22°C), c) $T > T_p$ (40°C) e d) $T_m < T < T_p$ (22°C), mas sem desprezar os ângulos menores.

Vemos na figura dos “Zimm plots” que o espalhamento à temperatura ambiente (fig. zimm-1b) é muito grande para os ângulos menores, o que indica uma alta polidispersidade na amostra (Kratohvíl, 1987). Para obter M_w , R_g e A_2 é preciso fazer a extrapolação para $c=0$ e $\theta=0^\circ$. Para que o ajuste linear possa ser feito é preciso desprezar os primeiros ângulos, que saem da região linear.

A tabela zimm-I mostra as tendências gerais das grandezas acima citadas, obtidas dos três experimentos. Fica evidente que entre as duas transições A_2 tem um valor positivo alto, em comparação às outras regiões, o que pode indicar uma repulsão considerável entre os centros espalhadores. Como visto na Teoria, se $A_2 > 0$ a interação soluto-solvente é preferível à interação solvente-solvente, portanto esperamos que a interação soluto-soluto também seja diminuída.

Tabela zimm-I

Temperatura	M_w (MDaltons)	A_2 (cm.mol/g²)	R_g (Å)	Observação
13°	60	-0.2 x 10 ⁻⁵	650	baixa polidispersidade
22°	15	3 x 10 ⁻⁵	800	alta polidispersidade
40°	40	0.1 x 10 ⁻⁵	600	não polidisperso

Pela análise feita vemos que a tendência geral é que entre as transições ocorra uma diminuição no peso molecular e um aumento no raio de giração e no segundo coeficiente de virial. Nas regiões abaixo de T_m e acima de T_p temos quase sempre um comportamento semelhante, caracterizado por M_w maior, e R_g e A_2 menores.

Através do espalhamento a vários ângulos, para essa concentração, foi possível efetuar o cálculo de M_w e R_g em função da temperatura, e o resultado está mostrado na figura zimm-2. Vemos que a tendência geral é M_w diminuir e R_g aumentar na região de baixo espalhamento, como já observado nos resultados do “Zimm plot”.

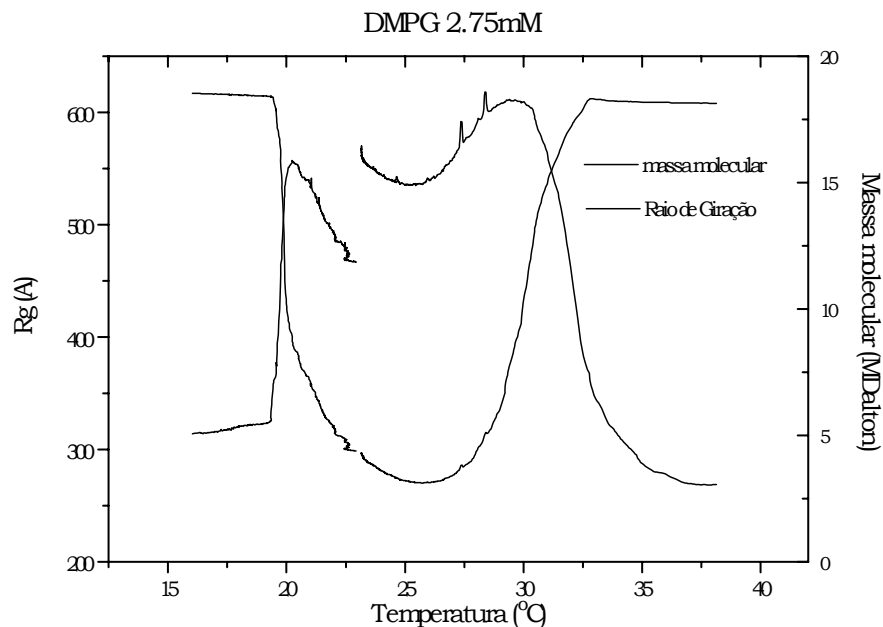


Fig. zimm-2: R_g (eixo esquerdo) e M_w (eixo da direita) em função da temperatura. DMPG 2.75 mM em tampão hepes.

A mesma experiência foi feita com vesículas unilamelares (1000Å) de DMPG com o objetivo de diminuir a polidispersidade, mas foi observado que os ângulos baixos continuam apresentando um alto espalhamento, embora os valores de M_w e R_g sejam bem menores que os obtidos para lipossomos. A_2 apresenta o mesmo comportamento, indicando que entre as transições ocorre uma forte repulsão entre as vesículas, enquanto que nas outras regiões praticamente não existe interação entre os centros espalhadores. O comportamento de M_w e R_g não é muito claro. Os dados obtidos nessas condições não estão muito bons, o que dificultou bastante sua análise.

“Zimm plots” de DMPG em água destilada foram feitos e o comportamento das curvas da figura zimm-3 é um indício de que provavelmente esteja ocorrendo uma forte repulsão entre as partículas, impossibilitando inclusive o uso do método de Zimm para análise dos dados.

Fig. Zimm-3: "Zimm Plots" de DMPG em água pura. Concentrações lipídicas (mM): 1.45, 1.10, 0.73, 0.44 e 0.22. a) $T < T_m$ (15°C), b) $T_m < T < T_p$ (25°C) e c) $T > T_p$ (40°C).

5. CONDUTIVIDADE

Medidas da condutividade das dispersões lipídicas foram feitas a partir de comparações com valores conhecidos de uma solução de KCl 10 mM. A temperatura da amostra foi variada para estudar a influência das transições de fase do DMPG em sua condutividade. Para qualquer solução um aumento da condutividade com a temperatura é esperado. Foram feitas também medidas da condutividade do tampão hepes sozinho, para serem subtraídas da condutividade de DMPG em hepes (fig. cond-1). Com isso o efeito de aumento da condutividade com a temperatura já é descontado. A figura cond-2 mostra a condutividade de dispersões de DMPG após a subtração da condutividade do tampão hepes. A condutividade da amostra aumenta com o aumento da temperatura até um valor próximo a T_p , quando começa a decair. É possível observar também que o aumento inicial da condutividade é maior na faixa da transição principal. Os dados nos mostram que a condutividade é maior na região de baixo espalhamento, entre T_m e T_p .

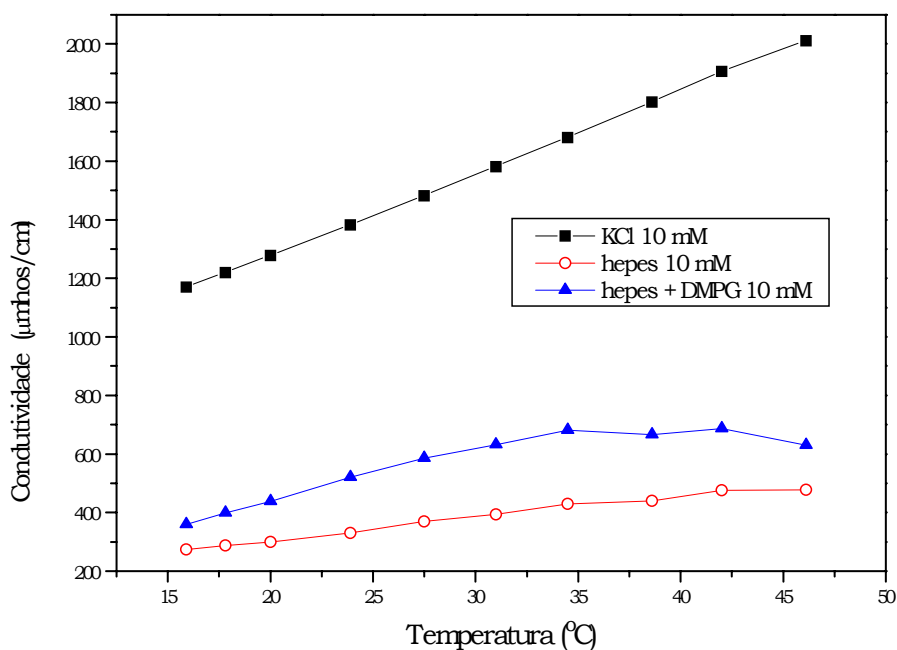


Fig. cond-1: Condutividade da amostra em função da temperatura. KCl 10 mM: amostra de referência.

O mesmo experimento foi feito com DMPG em água Milli-Q (pH = 6.3), que apresenta uma condutividade praticamente nula. A condutividade aumenta com a temperatura, não apresentando uma queda a temperaturas altas (fig. cond-3). Já vimos anteriormente (fig. esp-2, 3a) que o DMPG em água destilada não apresenta a pós-transição, que poderia ser a responsável pela diminuição na condutividade.

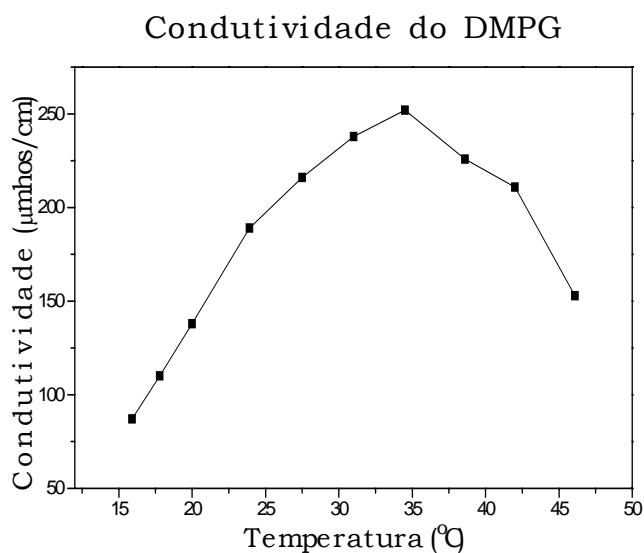


Fig. cond-2: Condutividade da dispersão de DMPG em hepes subtraída a condutividade do tampão hepes puro

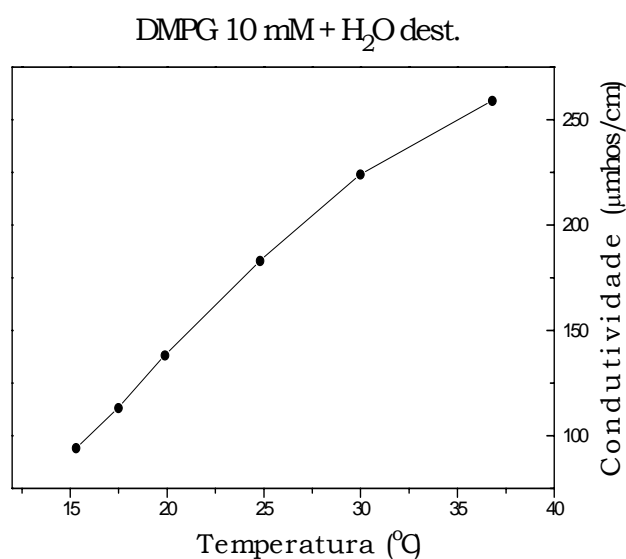


Fig. cond-3: Variação da condutividade da amostra de DMPG em água pura em função da temperatura.

Não foi possível realizar esses experimentos em presença de uma força iônica maior, devido à alta condutividade que as amostras apresentariam.

6. DISTRIBUIÇÃO DE CARGAS NA SUPERFÍCIE DE VESÍCULAS DE DMPG (DISCUSSÕES E CÁLCULOS)

Faremos aqui algumas considerações e cálculos sobre a ionização do grupo fosfato da cabeça polar do DMPG, e sobre a distribuição de íons próximos à superfície da membrana.

De acordo com o fato de A_2 ter um valor positivo alto entre as transições de fase, sugerindo uma menor interação, ou repulsão, entre as vesículas, e levando-se em conta que ocorre um aumento na condutividade da amostra nessa mesma região (fig. cond-3), foi levantada a hipótese de que as transições de fase causariam uma mudança na distribuição de íons próximos à superfície da membrana, e, portanto, uma variação na força de interação entre as superfícies de duas vesículas durante as transições de fase. No entanto, como somente temos informações sobre as mudanças estruturais ocorridas na transição de fase principal, a discussão feita a seguir será baseada nestas mudanças, e em suas consequências na distribuição de íons próximos à membrana. Discutiremos também a força por área (pressão) entre duas vesículas quando ocorre a transição de fase principal, para os diferentes valores da força iônica estudados aqui. É importante notar que alguns artigos mencionam o fato de que a transição principal faz com que muitos íons da superfície da membrana passem para o meio (Vaz et al., 1978 e Jähnig et al., 1979).

Efeitos de sal e pH em T_m (revisão bibliográfica) - Analisando a dependência da temperatura de transição de fase do DMPG com a força iônica do meio, parece claro que a presença de íons em solução é um fator muito relevante no comportamento termotrópico deste fosfolípido negativamente carregado.

É sabido que a presença de cargas nas cabeças polares dos fosfolípidios desestabiliza a fase gel (Träuble & Eibl, 1974; Träuble et al., 1976; Jähnig, 1976), causando uma diminuição da temperatura de transição de fase. No trabalho de Träuble et al. (1976) a variação de T_m com a força iônica e com o pH é analisada tanto experimental (ácido fosfatídico) quanto teoricamente, a partir da variação ocorrida na área por cabeça polar (Δf) após a transição de fase principal. Esse aumento na área por cabeça polar, da ordem de 25 %, parece ocorrer para qualquer lipídio, independente da presença de cargas na superfície (Träuble & Haynes, 1971; Lee, 1983 e Biltonen, 1990). Quando as cabeças polares são carregadas este aumento na área por cabeça, Δf , diminui a repulsão eletrostática entre as cargas das cabeças polares. Com isso a energia livre é menor na fase líquido cristalina para um sistema de lipídios carregados, gerando uma

diminuição de T_m . Os cálculos da variação de T_m com o pH e a força iônica são feitos utilizando expressões obtidas da teoria de Gouy-Chapman.

Jähnig (1976) identifica, juntamente com o efeito de Δf , uma segunda causa para a diminuição em T_m devido a cargas superficiais. Ele discute que, em presença de cargas, a área por cabeça polar aumenta, o que na fase gel causa uma diminuição das interações entre as cadeias hidrocarbônicas, levando a uma diminuição da estabilidade desta fase.

Nas expressões obtidas no artigo de Träuble et al. (1976) dois parâmetros são importantes: o grau de ionização α e a força iônica do meio. Para o ácido fosfatídico foi obtido ΔT_m da ordem de 18 °C, para α variando de 0 a 1. No trabalho de Watts et al. (1978) é mostrado que para o DMPG a variação é também dessa ordem (T_m para DMPG descarregado é por volta de 42°C).

Portanto, a presença de uma carga na cabeça polar tem efeitos dramáticos na temperatura de transição de fase. É interessante notar também que a transição de fase pode ser induzida somente com um aumento do pH a uma temperatura constante.

No trabalho de Träuble et al. (1976) chega-se a uma expressão da variação de T_m com a força iônica, que, assumindo Δf constante, apresenta um comportamento linear. Em um trabalho posterior a esse, Cevc et al. (1980) mostraram experimentalmente que o comportamento linear (assumindo $\Delta f \approx 12 \text{ \AA}^2$) só vale para concentrações não muito grandes de sal. A partir de concentrações da ordem de 0.5 M ocorre uma saturação no aumento de T_m , culminando em um valor máximo de 29 °C por volta de 2 M. Nessa concentração foi observado que o potencial de superfície Ψ_0 se anula (medido experimentalmente através da partição em água de um marcador de spin positivamente carregado), portanto as cargas tornam-se todas blindadas. Cevc et al. concluem que a diferença em T_m do estado de cargas blindadas (29°) para o estado descarregado (cuja temperatura de transição é de 42°C), pode ter origem em um efeito não eletrostático, talvez de rearranjo das cabeças polares.

A variação de T_m com a concentração de NaCl, no trabalho de Cevc et al. (1980), foi medida a partir de 100 mM de NaCl, que é o maior valor usado no presente trabalho. Portanto, não foi possível comparar nossos dados com os obtidos por Cevc et al. Utilizando a expressão obtida por Träuble et al. (1976) para a variação de T_m com n_m , seria necessário assumir um Δf da ordem de 40 \AA^2 para que a equação concorde com a variação em T_m obtida nos nossos experimentos (tabela esp-I). Entretanto, de acordo com muitos trabalhos, o aumento em f na transição de fase é da ordem de 25 %, enquanto que $\Delta f = 40 \text{ \AA}^2$ equivaleria a um aumento de quase 50 %. O comportamento de T_m (tabela esp-I) com $(n_m)^{1/2}$, obtido dos dados aqui mostrados, não é linear. Uma análise cuidadosa da variação de T_m com a concentração de NaCl, e uma discussão do modelo teórico de Träuble et al. (1976), fazem parte do nosso projeto de trabalho futuro.

Buscou-se a obtenção do potencial de superfície e da distribuição de cargas em função da distância à membrana, através da teoria de Gouy-Chapman, discutida na seção de Teoria. Como visto, são necessários dois parâmetros para que os cálculos sejam feitos: a força iônica do meio, n_m , e a distribuição superficial de cargas, σ . O cálculo da força iônica é simples. Assumindo uma dissociação total do eletrólito em uma solução aquosa, n_m é dado por:

$$n_m = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (\text{calc-1})$$

onde c_i e z_i são as concentrações molares e valência dos íons respectivamente. Para o NaCl, que é um eletrólito simétrico de valência 1, $n_m = c$, onde c é a concentração de sal adicionada à solução.

Para conhecermos a densidade superficial de cargas é necessário saber o grau de ionização (ou grau de dissociação) da vesícula (α), ou seja, a fração de lipídios com carga, e a área por cabeça polar (f) do lipídio, pois a expressão para σ é dada por:

$$\sigma = \frac{e\alpha}{f} \quad (\text{calc-2})$$

Estimativas de área por cabeça polar do DMPG (revisão bibliográfica)- Precisariamos ter valores para as áreas por cabeça polar do DMPG nas diversas forças iônicas e nas fases gel e líquido-cristal. Esses dados não são muito claros na literatura. Pensando somente em termos do efeito de blindagem causado pela presença do sal, imaginariamos que f diminuiria com o aumento de n_m . No entanto, encontramos dados na literatura que dizem o contrário (Tocanne et al., 1974 e Tocanne & Sacré, 1977). Esses estudos são feitos em monocamadas, e não fica claro se essa propriedade seria válida no caso de vesículas e lipossomos, onde existe uma curvatura da superfície. Eles atribuem esse aumento na área por cabeça a uma penetração do sódio na monocamada. No entanto, a influência do tamanho da cabeça polar na estabilidade e polimorfismo em membranas biológicas parece não ter a importância imaginada (Seddon & Cevc, 1993).

Quanto à Δf (variação de f na transição de fase), não encontramos nenhum artigo que mencione uma variação de Δf com a força iônica. Para lipídios em geral, assume-se que o aumento é da ordem de 25 % (Träuble & Haynes, 1971; Lee, 1983 e Biltonen, 1990). Poderíamos imaginar que com uma maior repulsão eletrostática entre as cabeças

Δf seria maior, já que na fase líquido-cristalina os lipídios estariam mais livres para se expandir. Por outro lado, se f variar com a força iônica talvez não se torne necessário um Δf maior, já que f já seria maior.

Quanto aos valores absolutos de f nas fases gel e líquido-cristal e Δf , encontramos alguns dados na literatura:

- i) Para DPPC (cuja cadeia hidrocarbônica possui dois CH_2 a mais que o DMPC) foi obtido $f_{\text{gel}} = 48 \text{ \AA}^2$ e $f_{\text{Cliqu}} = 60 \text{ \AA}^2$ (Marsh, 74), através de experiências de interação de troca entre marcadores de spins. Em princípio a área por cabeça polar não deve ser muito dependente do tamanho da cadeia hidrofóbica. No entanto Copeland & Andersen (1982) discutem que na fase gel isto é verdade, mas que na fase líquido-cristalina um aumento da cadeia pode levar a um aumento da área por cabeça polar, já o movimento angular da cadeia na fase líquido-cristalina é relevante.
- ii) $f_{\text{gel}} = 44 \text{ \AA}^2$ e $f_{\text{Cliqu}} = 65 \text{ \AA}^2$ para DMPG descarregado, sendo que, para DMPG carregado é esperado um aumento de 5 \AA^2 na fase gel e 10 \AA^2 na fase líquido-cristalina (Copeland & Andersen, 1982). Esses dados foram obtidos teoricamente para DMPG em 100 mM NaCl, através dos valores que forneciam o melhor ajuste das curvas teóricas de T_m em função do pH, não levando em conta possíveis efeitos de adsorção dos íons monovalentes. O artigo não discute variação de f e Δf com a quantidade de sal.
- iii) $f_{\text{gel}} = 40.5 \text{ \AA}^2$ ou 48.0 \AA^2 para DMPG carregado em presença de alta força iônica, calculado por difração de raio-x, dependendo se a área por cabeça polar for tomada paralela à bicamada ou à molécula, indicando que existe uma inclinação de cerca de 30° do fosfolipídio em relação ao plano da membrana. Para DMPG descarregado praticamente não existe variação nas duas referências, e assume-se que a inclinação é praticamente nula: $f_{\text{gel}} = 39.2 \text{ \AA}^2$ ou 37.0 \AA^2 (Watts et al., 1981).
- iv) Δf foi assumido da ordem de $10\text{-}15 \text{ \AA}^2$ nos trabalhos de Träuble et al, 1976; Cevc et al., 1980.

Cálculo do grau de ionização α - O grau de ionização α depende das constantes de associação dos íons que se ligam à superfície da membrana. No presente trabalho as dispersões lipídicas possuem prótons e sódios em solução. Muitos autores assumem que somente o próton associa-se ao grupo fosfato, e não incorporam o efeito de uma possível ligação do sódio ao fosfato no cálculo de α (Träuble & Eibl, 1974; Träuble et al., 1976; Cevc et al., 1980 e Copeland & Andersen, 1982). No entanto, outros artigos discutem que a associação existe, e alguns calculam valores para as constantes de associação do sódio com o fosfatidilglicerol (Eisenberg et al., 1979; Millman et al., 1982; Lakhdar-Ghazal et al., 1983; Helm et al., 1986; Lakhdar-Ghazal & Tocanne, 1988; Tocanne & Teissié, 1990 e Tatulian, 1993). Os valores calculados experimentalmente diferem bastante entre si,

ficam dentro da faixa entre 0.1 e 1 M⁻¹, bem menores que a constante de associação do próton, como era de se esperar. Algumas dessas constantes foram obtidas de experiências com monocamadas, e algumas com vesículas. Usaremos o valor calculado por Lakhdar-Ghazal & Tocanne (1988) para vesículas de DMPG, que é $K_{Na} = 0.3 \text{ M}^{-1}$.

A constante de associação do próton (K_H) está relacionada ao pK intrínseco (pK_i) do DMPG por $pK_i = \log K_H$, de forma análoga à discutida para a reação de dissociação do tampão hepes, na seção de Materiais e Métodos.

É necessário conhecermos o pK_i do DMPG. Alguns artigos na literatura fornecem esse valor como sendo 1.2 (Toko & Yamafuji, 1980; Lakhdar-Ghazal et al., 1983). Esse valor também pode ser calculado a partir do pK aparente (pK_{ap}), que é o pH do meio (“bulk”) para o qual $[PGH]=[PG^-]$, usando a distribuição de Boltzmann:

$$[H^+]_o = [H^+]_\infty e^{\frac{e\Psi_o}{kT}} \quad pK_i = pK_{ap} - \frac{e\Psi_o}{2.3kT} \quad (\text{calc-3})$$

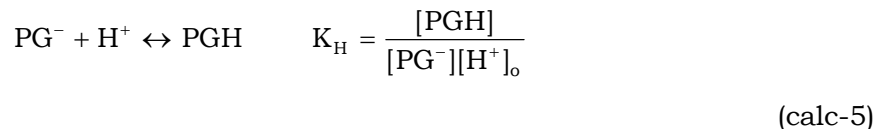
onde $[H^+]_\infty$ é a concentração de prótons muito longe da superfície da membrana, relacionada ao pH do meio. O potencial de superfície Ψ_o é dado em módulo.

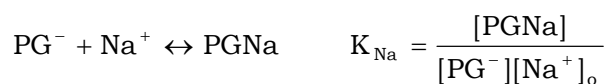
O trabalho de Watts et al. (1978) calcula, a partir da variação de T_m com o pH do meio, que $pK_{ap} = 2.9$, tanto para o DMPG quanto para o DPPG. Utilizando o valor experimental $\Psi_o = 99 \text{ mV}$, (Cevc et al., 1980), obtém-se, a partir da equação acima, o mesmo valor da literatura, ou seja, $pK_i \approx 1.2$. Esse valor corresponde a uma constante de associação $K_H = 15.8 \text{ M}^{-1}$.

A expressão de α é dada pela quantidade de PG negativo dividido pela soma de todas as formas de PG. Levando em conta tanto a associação do próton quanto a do sódio, temos:

$$\alpha = \frac{[PG^-]}{[PG^-] + [PGH] + [PGNa]} \quad (\text{calc-4})$$

as reações e constantes de associação do próton e do sódio são dadas por:





onde []_o refere-se à concentração em mol/l na superfície da membrana, onde estão localizados os grupos fosfatos do DMPG.

Dividindo o numerador e o denominador da eq. (calc-4) por [PG⁻], é possível escrever α em função das constantes de associação e quantidade de íons na superfície, usando (calc-5):

$$\alpha = \frac{1}{1 + K_{\text{H}}[\text{H}^+]_o + K_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_o} \quad (\text{calc-6})$$

Substituindo [H⁺]_o e [Na⁺]_o pela distribuição de Boltzmann, e utilizando a equação de Gouy para potencial alto (eq. gouy-12) para escrever Ψ_o em função de σ (e portanto de α):

$$\alpha = \frac{1}{1 + 4e^2\alpha^2(K_{\text{H}}[\text{H}^+]_{\infty} + K_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_{\infty}) / c^2f^2n_m} \quad , \quad c^2 = \frac{2\epsilon kT}{\pi} = 127 \times 10^9 \text{ erg} \quad (\text{calc-7})$$

Rearranjando os termos, usando que [Na⁺]_∞=n_m e definindo $\beta = \frac{c^2f^2}{4e^2(K_{\text{Na}} + K_{\text{H}}[\text{H}^+]_{\infty}/n_m)}$:

$$\alpha^3 + (\alpha - 1)\beta = 0 \quad (\text{calc-8})$$

A partir da solução numérica dessa equação é possível obter o grau de ionização da membrana, dados os parâmetros n_m, K_{Na}, f e [H⁺]_∞. A quantidade de prótons em solução é dada por 10^{-pH}. Para as soluções tamponadas pH = 7.4, e para a água pura pH = 5.6. Abaixo vemos os cálculos feitos para as condições que serão discutidas adiante:

tabela calc-I

Condição	n _m (mM)	f (Å ²)	K _{Na} (M ⁻¹)	α
----------	---------------------	---------------------	------------------------------------	---

		gel	c.líq.		gel	c.líq.
hepes	4	48	60	0	0.994	0.996
+ 10 mM NaCl	14	48	60	0	0.998	0.999
+ 100 mM NaCl	104	48	60	0	1	1
	4, 14, 104	48	60	0.3	0.397	0.448
	4, 14, 104	-	60	0.1	-	0.586

Pela tabela calc-I, assumindo $K_{Na} = 0$, fica claro que, para as condições usadas durante o trabalho (excluindo DMPG em água pura), ou seja, hepes na ausência e presença de NaCl (pH = 7.4), podemos sempre assumir que a ionização com respeito ao próton, é $\alpha_H \cong 1$ (vesícula desprotonada). Como já mencionado, a presença de sal aumenta a temperatura de transição de fase de lipídios negativamente carregados (Träuble et al., 1976) devido à blindagem eletrostática das cargas. No entanto, a presença de NaCl induz uma maior ionização da vesícula, já que, diminuindo o potencial de superfície (eq. (gouy-14)), $[H^+]_o$ diminui (eq. (calc-3)). No trabalho de Träuble & Eibl (1974) é discutido que o efeito do sal, portanto, pode ter sentidos contrários em T_m , dependendo do grau de ionização da vesícula. Se α_H for relativamente menor que um, a presença de NaCl fará com que a superfície da vesícula fique mais carregada, causando uma diminuição de T_m . No entanto se $\alpha_H \approx 1$ (condição dos nossos experimentos) o efeito de blindagem do sal será predominante, causando, então, um aumento de T_m com a concentração de NaCl, como previsto e verificado nos nossos dados (fig. esp-2).

DMPG em água pura - Dispersões lipídicas de DMPG em água pura apresentam um comportamento estranho. A transição é extremamente larga (fig. esp-2, 3a; Epand & Hui, 1986) e os “Zimm Plots” (fig. zimm-3) apresentam uma curvatura que pode ser atribuída a uma grande repulsão entre as partículas do meio.

Para a água pura os únicos íons em solução vêm da concentração de prótons, ou seja, do pH da solução. Como visto em Materiais e Métodos o pH da água pura usada nos experimentos é de 5.6, portanto $n_m = [H^+]_o = 2.5 \times 10^{-6}$. Usando esse dado e assumindo $f = 48 \text{ \AA}^2$ foi possível calcular o grau de ionização também para o DMPG em água pura, cujo resultado obtido foi $\alpha = 0.12$. É interessante ver que o DMPG em água pura possui somente 12 % de grupos fosfato ionizados. Epand & Hui (1986) sugerem que o comportamento estranho apresentado por DMPG em água (pH = 7) é devido à forte repulsão eletrostática entre as cabeças polares. O ajuste do pH da água foi feito com pequenas quantias de NaOH e HCl. Como vimos, a presença de Na^+ pode induzir uma maior ionização dos grupos fosfatos, de forma que talvez a ionização do DMPG, nas

condições de Epanand & Hui, seja de fato maior que 0.12. Encontramos outros artigos na literatura que encontram comportamentos de DMPG em água semelhantes à DMPG em pH 2.0, quando ele estaria descarregado (Tocanne et al, 1974 e Sacré & Tocanne, 1977). Nesses trabalhos, experiências de monocamadas de DMPG em várias condições diferentes, mostraram que a variação da pressão com a área por cabeça polar é muito semelhante para DMPG em água e para DMPG em tampão pH 2.0. Como não observamos transição de fase para DMPG em água, vamos analisar a água apenas em uma fase.

Além dos prótons presentes nas dispersões de DMPG em água pura, existem também os contra-íons Na^+ , provenientes do sal de DMPG. No entanto a concentração de sódio no infinito é zero. Portanto, não foi assumida ligação de sódio com PG em dispersões de DMPG em água pura.

Cálculos de Ψ_0 , $\Psi(\mathbf{x})$, $\rho(\mathbf{x})$ e $P(D)$ - Usando o fato da área por cabeça polar aumentar após a transição de fase principal, foi possível avaliar o efeito da transição de fase no potencial de superfície Ψ_0 , eq. (gouy-12), no potencial eletrostático $\Psi(\mathbf{x})$, eq. (gouy-7), na distribuição de íons $\rho(\mathbf{x})$, eq. (gouy-5), e na pressão entre duas superfícies $P(D)$, eq. (gouy-15), onde D é a separação entre elas, para os diferentes valores de força iônica usados nos experimentos (fig. esp-2). Para o cálculo do potencial de superfície Ψ_0 foi utilizada a aproximação de potencial alto, o que é razoável, já de Ψ_0 é da ordem de 100 mV, enquanto que e/kT à temperatura ambiente é da ordem de 25 mV. Foram feitos cálculos variando os parâmetros K_{Na} (constante de associação do sódio), f (área por cabeça polar do DMPG) e Δf (variação em f na transição).

Foram considerados diferentes comportamentos de f com a força iônica. No entanto, as variações causadas por f em Ψ_0 e α , foram muito pequenas, o que fez com que optássemos por deixar f constante com a força iônica. Mesmo porque, não ficou claro pelos dados da literatura (como visto anteriormente), se a força iônica realmente influencia o valor de f em cada fase. Foi também estudado o caso em que ocorre uma diminuição em Δf com o aumento de íons em solução, mas também as variações nos parâmetros monitorados foram pequenas, e não foi encontrado nenhum dado na literatura que mencionasse uma variação de Δf com n_m .

Portanto, baseado na discussão feita anteriormente, foram escolhidos os seguintes valores das áreas por cabeça polar: $f_{\text{gel}} = 48 \text{ \AA}^2$ e $f_{\text{Clq}} = 60 \text{ \AA}^2$ ($\Delta f = 12 \text{ \AA}^2$).

O comprimento de Debye λ_D , definido como o inverso de κ (gouy-8), depende somente da força iônica do meio. Quanto maior seu valor, mais lenta é a queda do potencial eletrostático em função da distância à membrana. Abaixo vemos uma tabela com os valores do comprimento de Debye para as diferentes forças iônicas estudadas:

tabela calc-II

Condição	n_m (mM)	κ (cm ⁻¹)	λ_D (Å)
H ₂ O	0.0025	5.13 x 10 ⁴	1952
+ hepes	4	2.05 x 10 ⁶	49
+ 10 mM NaCl	14	3.84 x 10 ⁶	30
+ 100 mM NaCl	104	1.05 x 10 ⁷	9.6

Essa tabela deixa claro que o comprimento de Debye, em uma solução de baixa força iônica, é muito maior que nos outros casos, indicando que a distribuição de íons nesta se dá de uma forma muito mais estendida. Quanto maior a força iônica, menor seria a “espessura” da camada difusa.

Foram estudadas três situações, nas quais foram assumidos diferentes valores da constante de associação do sódio:

$$\Rightarrow K_{Na} = 0$$

$$\Rightarrow K_{Na} = 0.3 \text{ M}^{-1}$$

$$\Rightarrow K_{Na} = 0.3 \text{ M}^{-1}(\text{gel})$$

$$K_{Na} = 0.1 \text{ M}^{-1}(\text{cristal - liquido})$$

i) Variação com a força iônica - Pela tabela calc-III é possível verificar que, com o aumento da força iônica em uma dada fase, para qualquer valor de K_{Na} assumido, $|\Psi_0|$ diminui e σ apresenta um pequeno aumento, perceptível somente para $K_{Na} = 0$. Além disso, como visto na tabela calc-II, o comprimento de Debye diminui com o aumento da força iônica.

Na figura calc-1 está mostrado o potencial eletrostático $\Psi(x)$ em função da distância à membrana. Quanto menor a força iônica, e portanto maior o comprimento de Debye, mais lentamente o potencial eletrostático se anula em função da distância à membrana. Esse comportamento ocorre para qualquer fase, e qualquer constante de associação. A fase na qual encontra-se o lipídio (valor de f), e a constante de associação do sódio, só modificam o valor de Ψ_0 (que entra no cálculo de $\Psi(x)$), não alterando o comprimento de Debye. Com isso vemos que variações em f e K_{Na} serão mais relevantes em $\Psi(x)$ para x pequeno. Portanto, o efeito de assumir $K_{Na} = 0.3 \text{ M}^{-1}$ tem uma influência

maior em $\Psi(x)$ nas vizinhanças da membrana. É interessante notar o alto valor (em módulo) para $\Psi(x)$ em água pura, mesmo com um grau de ionização baixo.

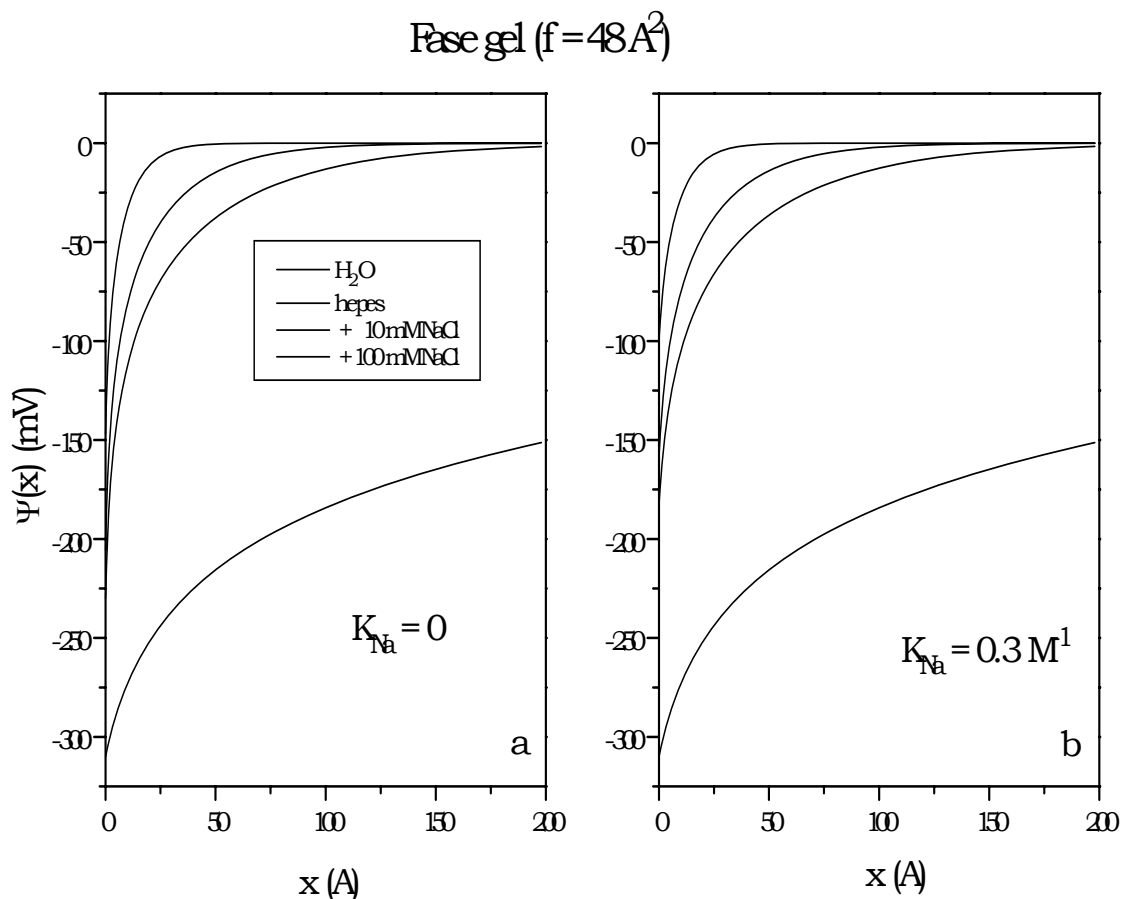


Fig. calc-1: Variação do potencial eletrostático da membrana com a distância à superfície da bicamada, calculada para diferentes forças iônicas: H_2O , 0.0025 mM; hepes, 4 mM; hepes + 10 mM NaCl, 14 mM; hepes + 100 mM NaCl, 104 mM. Constante de associação do sódio com o fosfatidilglicerol, $K_{Na} =$ a) 0, b) 0.3 M^{-1} .

O efeito da força iônica na distribuição de íons é muito pequeno para $x \neq 0$, com exceção do caso de água pura, onde $\rho(x)$ é bem menor que para as outras forças iônicas (fig. calc-2a). Aumentando a constante de associação do sódio (fig. calc-2b), os valores de $\rho(x)$ próximos à membrana, ficam bem reduzidos, pois, como visto acima, Ψ_0 diminui, e portanto diminui a atração dos íons pela membrana. Nota-se também, que a distribuição de íons fica mais alongada com o aumento de K_{Na} (fig. calc-2b). (O comportamento

anômalo da curva correspondente a DMPG em hepes + 10 mM NaCl ocorre devido à competição dos termos n_m e $\sinh\Psi(x)$, como visto na eq. (gouy-5)).

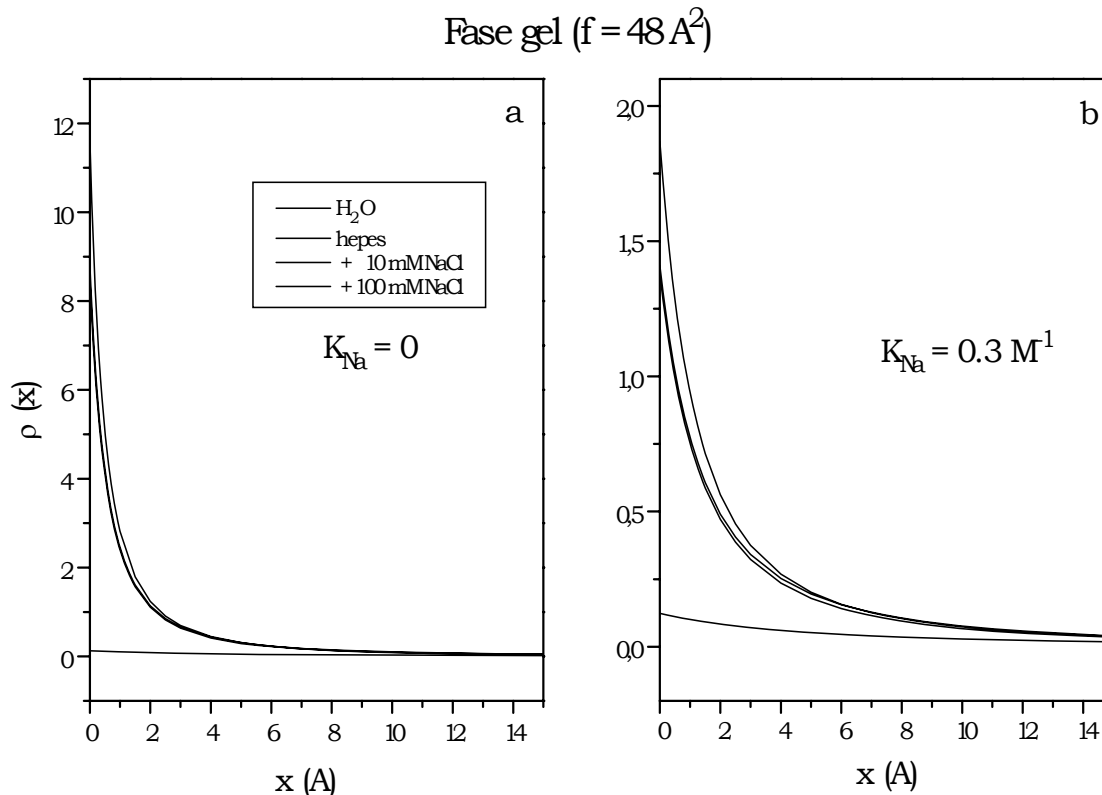


Fig. calc-2: Variação da distribuição de íons (10^{12} esu/cm³) em função da distância à superfície da bicamada, calculada para as mesmas forças iônicas da fig. calc-1.

Na figura calc-3a vemos a pressão entre duas superfícies em função da distância de separação D entre elas, para o caso em que não ocorre associação do sódio com o fosfato. Para essa condição, vemos que a pressão entre superfícies na água, é maior somente a partir de uma certa separação. Isso ocorre devido a um balanço entre a força iônica e o potencial eletrostático (eq. (gouy-15)). É possível notar, também, que a maneira como a pressão decresce está relacionada ao comprimento de Debye.

Para as dispersões em hepes com e sem sal, aumentando a constante de associação ($K_{\text{Na}} = 0.3 \text{ M}^{-1}$), e portanto tornando as superfícies menos carregadas, as pressões diminuem, pois os valores de $\Psi(D)$ tornam-se menores. Essa grande diminuição faz com que as pressões entre as vesículas nessas condições fiquem muito menores que a

pressão entre as vesículas em água pura, que não é alterada pelo maior valor de K_{Na} . Observamos que a pressão entre as superfícies é tanto menor quanto maior é a força iônica do meio.

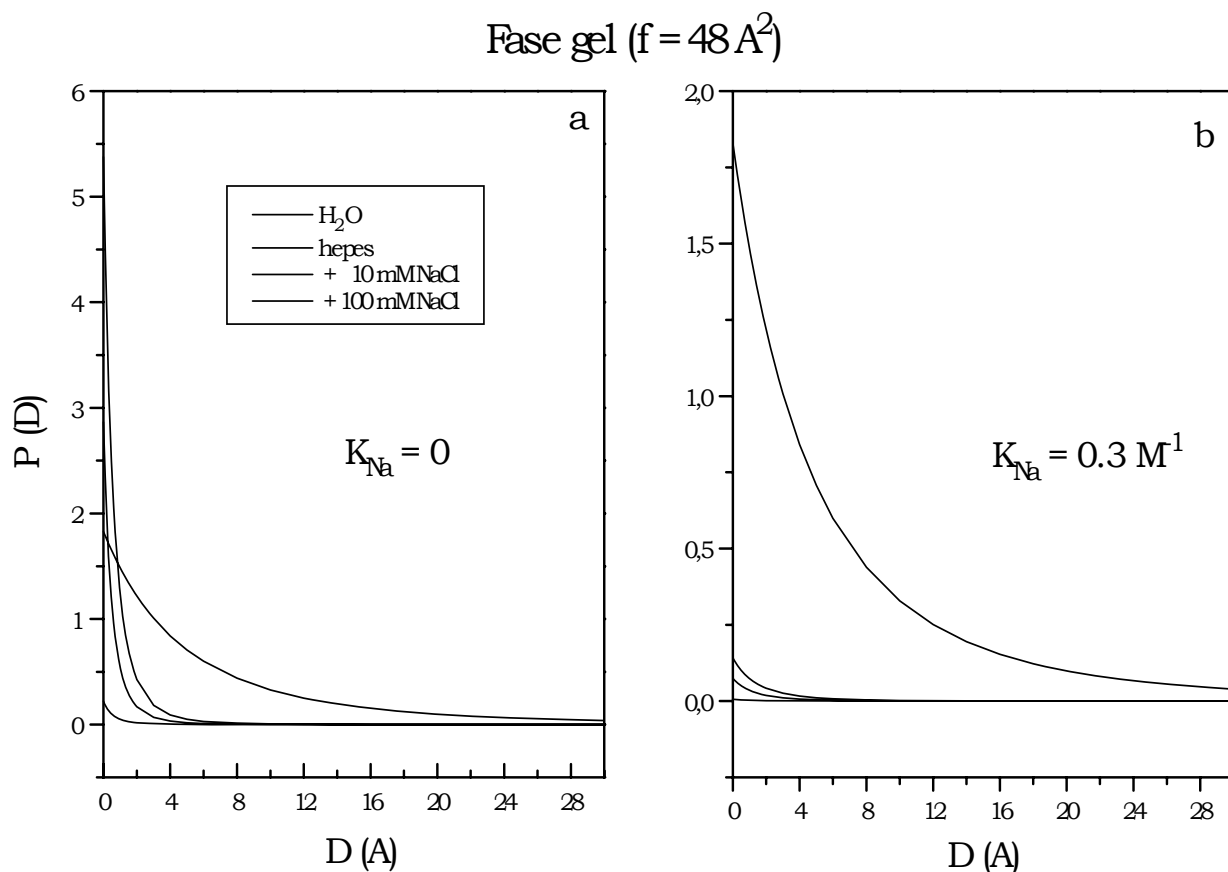


Fig. calc-3: Variação da pressão (10^{12} dyn/cm^2) entre duas superfícies carregadas em função da distância de separação D , calculada para as mesmas forças iônicas usadas na fig. calc-1.

Os dados do “Zimm Plot” nos sugerem que ocorre uma forte repulsão nas dispersões de DMPG em água pura (fig. zimm-4). Isto poderia ser explicado pelo alto valor da pressão entre as superfícies ($P(D)$), que é significativa até separações da ordem de 30 \AA , enquanto que nas outras forças iônicas a pressão praticamente se anula para D da ordem de 10 \AA .

As figuras calc-1, 2 e 3 são referentes à fase gel. Entretanto, comportamentos semelhantes de $\Psi(x)$, $\rho(x)$ e $P(D)$ com n_m são obtidos para a fase líquido-cristalina.

tabela calc-III

Fase	Condição		Ψ_0 (mV)	σ (esu/cm ²)	α	%
	H ₂ O		-313	12.100	0,120	
gel	hepes	$K_{Na} = 0$	-231	99.500	0,994	
		$K_{Na} = 0.3$	-184	39.700	0,397	
f = 48Å²	+ 10 mM NaCl	$K_{Na} = 0$	-207	99.900	0,998	
		$K_{Na} = 0.3$	-159	39.700	0,397	
	+ 100 mM NaCl	$K_{Na} = 0$	-147	100.100	1,000	
		$K_{Na} = 0.3$	-100	39.700	0,397	

	hepes	$K_{Na} = 0$	-220	79.700	0,996	0,2
		$K_{Na} = 0.3$	-178	35.900	0,448	12
		$K_{Na} = 0.1$	-192	46.900	0,586	48
C. Líq. f = 60 Å²	+ 10 mM NaCl	$K_{Na} = 0$	-195	79.900	0,998	0,1
		$K_{Na} = 0.3$	-154	35.900	0,448	12
		$K_{Na} = 0.1$	-166	46.900	0,586	48
	+ 100 mM NaCl	$K_{Na} = 0$	-136	80.000	1,000	0
		$K_{Na} = 0.3$	-95	35.900	0,448	12
		$K_{Na} = 0.1$	-106	46.900	0,586	48

A coluna de % (porcentagem) refere-se ao aumento em α devido à transição de fase.

ii) Efeito da transição de fase - A transição de fase é representada nos cálculos apenas por uma variação na área por cabeça polar Δf . Como já discutido anteriormente, foi assumido que $\Delta f = 12 \text{ Å}^2$ (correspondendo a um aumento de 25 %). A eq. (calc-7), a partir da qual α é obtido numericamente, depende de f . Para um valor de f maior, mais ionizada estará a vesícula. A transição de fase (Δf), portanto, causará um aumento em α .

Na última coluna da tabela calc-III vemos a porcentagem de aumento na ionização dos grupos fosfato da cabeça polar do DMPG, para as diferentes constantes de associação assumidas. Para todos os casos ocorre um aumento de α , ou seja, uma certa quantidade de íons associados à membrana na fase gel, são liberados para a solução com a transição de fase. Esse aumento em α ocorre devido ao aumento em f na transição

principal, pois como visto na eq. (calc-8) que α depende da área por cabeça polar assumida. Essa poderia ser uma explicação para o aumento da condutividade das dispersões lipídicas de DMPG com a transição de fase principal (fig. cond-2), pois a condutividade depende do número de íons em solução. Para $K_{Na} = 0$, a variação de α na transição de fase é praticamente desprezível (0.2 %), não parecendo ser razoável explicar o aumento na condutividade da amostra em termos dessa pequena quantidade de prótons liberada em solução, mesmo o próton apresentando uma condutividade maior do que qualquer outro cátion.

Assumindo uma constante de associação para o sódio não nula ($K_{Na} = 0.3$), a variação em α é mais significativa (12 %). Nesse caso, o aumento da condutividade poderia ser causado por um aumento da quantidade de Na^+ em solução, juntamente com um aumento da carga da própria vesícula, embora essa última contribua muito pouco, já que a mobilidade da vesícula é muito menor que a mobilidade do íon de sódio.

O aumento em α é maior ainda quando é assumido que a constante de associação diminui na transição de fase (48 %).

O efeito de K_{Na} em Ψ_0 depende da área assumida, pois $\Psi_0 \propto \ln(\alpha/f)$. Na tabela calc-III estão os valores obtidos para Ψ_0 nas diferentes condições. Para $K_{Na} = 0$ e $0.3 M^{-1}$ nas duas fases, Ψ_0 diminui (f aumenta, α não aumenta tanto). Entretanto a diminuição de K_{Na} de 0.3 para $0.1 M^{-1}$ na transição, é suficiente para que o aumento em α seja maior que o aumento em f, resultando em um Ψ_0 maior na fase líquido-cristalina.

É interessante notar que o valor obtido para Ψ_0 de DMPG + 100 mM de NaCl na fase líquido-cristalina, considerando $K_{Na} = 0.3$ ($\Psi_0 = -95$ mV), concorda muito bem com o valor experimental de $\Psi_0 = -99$ mV obtido por Cevc et al. (1980), em condições muito semelhantes, sugerindo que a associação do sódio deve ser levada em conta. O valor teórico obtido por Cevc et al., e por nós, da teoria de Gouy-Chapman sem adsorção de íons é de -147 mV.

De um modo geral, as variações encontradas nos comportamentos de $\Psi(x)$, $\rho(x)$ e $P(D)$, após a transição de fase, foram pequenas, sendo relevantes somente até 10 Å. Aqui estão mostrados apenas os casos correspondentes à hepes na ausência e presença de 100 mM de NaCl, já que o hepes + 10 mM é um caso intermediário, e não apresentou uma tendência diferente dos resultados aqui mostrados.

Nas situações em que a constante de associação permaneceu constante na transição de fase ($K_{Na} = 0$ e $0.3 M^{-1}$), o valor absoluto de $\Psi(x)$ (fig. calc-4a,b,d,e), a distribuição de íons $\rho(x)$ (fig. calc-5a,b,d,e), e a pressão $P(D)$ (fig. calc-6a,b,d,e), diminuíram após a transição, para qualquer força iônica analisada.

Fig. calc-4: Comparação do comportamento de $\Psi(x)$ antes e depois da transição de fase, caracterizada por um aumento de 25 % na área por cabeça polar, para $n_m = 4$ mM (hepes) e 104 mM (hepes + 100 mM NaCl)

Fig. calc-5: Comparação do comportamento de $\rho(x)$ (10^{12} esu/cm³) ocorrida na transição de fase, caracterizada por um aumento de 25 % na área por cabeça polar, para $n_m = 4$ mM (hepes) e 104 mM (hepes + 100 mM NaCl)

Fig. calc-6: Comparação do comportamento de $P(D)$ (10^{10} dyn/cm²) ocorrida na transição de fase, caracterizada por um aumento de 25 % na área por cabeça polar, para $n_m = 4$ mM (hepes) e 104 mM (hepes + 100 mM NaCl)

Entretanto, o valor positivo do segundo coeficiente de virial, obtido dos “Zimm Plot”, sugere que ocorre uma pequena repulsão, ou não-atração, entre as vesículas de DMPC após a transição de fase principal.

Para explicar essa maior repulsão após a transição de fase, é necessário assumir que $\Psi(x)$ aumente na fase líquido-cristalina. Como f aumenta na transição de fase, devido ao maior volume ocupado pelas cadeias hidrocarbônicas, seria preciso ocorrer um aumento adicional em α para que um aumento em $\Psi(x)$ fosse obtido. Para isso acontecer é preciso assumir que o valor da constante de associação do sódio pelo grupo fosfato seja menor após a transição de fase.

Copeland & Andersen (1982) discutem que em certos casos a constante de associação do próton pode variar na transição de fase. Tatulian (1993) discute que a transição de fase causa uma diminuição da constante de associação tanto de próton quanto de íons divalentes, portanto seria razoável supor que a constante de associação de íons monovalentes também diminui.

Nas figuras calc-4c, 5c e 6c estão mostrados o resultado dos cálculos feitos considerando $K_{Na} = 0.3$ para a fase gel e $K_{Na} = 0.1$ para a fase líquido-cristalina. De fato, vemos um comportamento de $\Psi(x)$, $\rho(x)$ e $P(D)$ com a transição de fase contrário ao observado assumindo K_{Na} constante na transição. Entretanto, fica difícil avaliar se essa pequena variação, significativa apenas até uma separação de 10 Å, poderia explicar um aumento em A_2 , gerando uma consequente diminuição na intensidade de luz espalhada. Além disso, é importante ter em mente que na expressão usada para o cálculo dessa pressão entre as superfícies foi considerado que as superfícies não estão muito próximas, de forma que o potencial das duas superfícies pudesse ser somado (eq. (gouy-14 e 15)).

É importante, novamente, ressaltar que no cálculo dessa pressão não entraram considerações sobre forças de hidratação e de van der Waals, sendo portanto, um modelo simplificado da realidade.

CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta uma caracterização da transição de fase principal e da pós-transição de dispersões de DMPG, utilizando principalmente a técnica de espalhamento de luz. Nas dispersões em baixa força iônica foram observadas, nas duas transições, grandes variações na intensidade de luz espalhada pela amostra, as quais não puderam ser explicadas em termos de variações no índice de refração do meio ou no incremento do índice de refração com a concentração (dn/dc). Enquanto a transição principal foi caracterizada por um decréscimo na turbidez da amostra, a pós-transição apresentou um aumento da mesma.

Resultados de análises utilizando o método de Zimm, e medidas da condutividade da amostra, mostraram que, na região entre as duas transições de fase, a repulsão entre as vesículas e a condutividade da amostra eram maiores do que nas outras fases. A partir da teoria de Gouy-Chapman, e da consideração de uma associação do sódio com os grupos fosfato do DMPG, foi mostrado que o grau de ionização da vesícula aumenta com as mudanças estruturais ocorridas na transição principal, conseqüentemente também aumentando a concentração de íons em solução. Esse aumento poderia dar origem à maior condutividade observada após a transição principal. No entanto, não é observado um acréscimo brusco da condutividade com a transição, mas sim um aumento gradual, o que precisa, portanto, ser melhor compreendido.

A repulsão entre as vesículas pode ser explicada, dentro do modelo estudado, considerando uma diminuição na constante de associação do sódio pelo DMPG após a transição principal. Entretanto, essa maior repulsão só é significativa para separações muito pequenas, nas quais algumas aproximações do modelo não são mais válidas. É nosso projeto, para um futuro próximo, estender o estudo das forças entre duas vesículas carregadas, considerando no modelo, além da interação eletrostática, a atração de Van der Waals, as forças de solvatação (que ocorrem a curtas distâncias) e o fato das vesículas não apresentarem uma superfície plana.

O aumento da força de repulsão eletrostática entre as superfícies seria uma possível explicação para o grande decréscimo na intensidade de luz espalhada, observada para dispersões de DMPG em baixa força iônica após a transição principal. Entretanto, é importante ressaltar que podem existir outras razões para a diminuição da turbidez, como por exemplo uma possível mudança na forma do agregado, alterando o fator de forma do centro espalhador.

Os dados apresentados nesse trabalho são importantes para a caracterização da pós-transição, que foi muito pouco estudada na literatura. Foi mostrado que as

dispersões, após essa transição, apresentam características semelhantes às da fase gel, como maior espalhamento, menor repulsão e menor condutividade. A técnica de RPE de marcadores de spin posicionados tanto na superfície quanto no interior da bicamada, não foi sensível à pós-transição, indicando que a ordem/mobilidade da bicamada não é alterada por essa transição. É importante notar que a pós-transição foi detectada também pela técnica de calorimetria diferencial de varredura (Salonen et al., 1989), entretanto com um pico de calor específico menor que o apresentado pela transição principal. Estudos futuros serão feitos para melhor compreender a pós-transição.

Dispersões de DMPG em água pura apresentaram um comportamento particular. A transição principal, vista por espalhamento de luz, é extremamente alargada, e o comportamento dos “Zimm plots” mostrou que existe uma forte repulsão entre as vesículas. Mesmo contendo apenas 12 % de grupos fosfato ionizados, o potencial de superfície calculado para a água foi muito alto, devido à força iônica extremamente baixa do meio. Esse fato faz com que a pressão entre as vesículas na água seja muito maior que nos outros casos, além de ser relevante a separações maiores.

REFERÊNCIAS

- Aragón, S.R. & Pecora, R. - *J. Chem. Phys.* 66(6) (1977) 2506-2516
- Atherton, N.M. - em "Principles of Electron Spin Resonance" Edit. Ellis Horwood Limited (1993)
- Biaggi, M.H.; Riske, K.A. e Lamy-Freund, M.T. - submetido à publicação (1997)
- Biltonen, R.L. - *J. Chem. Thermodynamics* 22 (1990) 1-19
- Brown, P.M., Steers, J., Hui, S.W., Yeagle, P.L. e Silvius, J.R. - *Biochemistry* 25 (1986) 4259-4267
- Carmona-Ribeiro, A.M. - *J. Colloid and Interface Sci.* 139(2) (1990) 343-350
- Carmona-Ribeiro, A.M. & Hix, S. - *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 1812-1817
- Cevc, G.; Watts, A. e Marsh, D. - *Biochemistry* 20 (1981) 4955-4965
- Cevc, G.; Watts, A. e Marsh, D. - *FEBS Letters* 120(2) (1980) 267-270
- Chong, C.S. & Colbow, K. - *Biochim. Biophys. Acta* 436 (1976) 260-282
- Collins, K.D. & Washabaugh, M.W. - *Quarterly Review of Biophysics* 18(4) (1985) 323-422
- Copeland, B.R. & Andersen, H.H. - *Biochemistry* 21(12) (1982) 2811-2820
- Debye, P. - *Ann. Physik* 46 (1915) 809-823
- Disalvo, E.A. - *Chem. Phys. Lipids* 59 (1991) 199-206
- Eibl, H. - em "Membrane Fluidity in Biology" vol. 2 Editado por R.C. Aloia, editora Academic Press Inc, 1992.
- Eisenberg, M.; Gresalfi, T.; Riccio, T. e MacLaughlin, S. - *Biochemistry* 18(23) (1979) 5213-5223
- Ellens, H., Bentz, J. e Szoka, F.C. - *Biochemistry* 25 (1986) 4141
- Epand, R.M. & Hui, S.W. - *FEBS Letters* 209(2) (1986) 257-260
- Epand, R.M.; Gabel, B.; Epand, R.F.; Sen, A. e Hui, S.W. - *Biophys. J.* 63 (1992) 327-332
- Evans, D.F.; Wennerström, H. - em "The Colloidal Domain" (1994), Edit. VCH Publishers
- Gaffney, B.J. - em "Spin Labelling. Theory and Applications" Vol.1 pp. 567-571, ed. Berliner, L.J. Edit. Academic Press (1976)
- Gennis, R.B. - em "Biomembranes" caps. 1 e 2 - Edit. Springer-Verlag (1989)
- Griffith, O.H. & Jost, P.C. - em "Spin Labelling. Theory and Applications" Vol.1 pp. 453-523, ed. Berliner, L.J. Edit. Academic Press (1976)
- Hauser, H. - *Biochim. Biophys. Acta* 772 (1984) 37-50
- Heimburg, T. & Biltonen, R.L. - *Biochemistry* 33 (1994) 9477-9488
- Helm, C.A.; Laxhuber, L.; Lösche, M., e Möhwald, H. - *Colloid & Polymer Sci.* 264 (1986) 46-55

- Hiemenz, P.C. - "Polymer Chemistry" (1984) - Edit. Marcel Dekker
- Hiemenz, P.C. - "Principles of Colloid and Surface Chemistry" (1986), 2ª ed. - Edit. Marcel Dekker
- Hope, M.J.; Bally, M.B.; Weeb, G. e Cullis, P.R. - *Biochim. Biophys. Acta* 812 (1985) 55-65
- Israelachvili, J.N.- em "Intermolecular and surface forces" - cap. 12 , 2ª edição Edit. Academic Press (1992)
- Jähnig, F. - *Biophysical Chemistry* 4 (1976) 309-318
- Jähnig, F.; Harlos, K.; Vogel, H. e Eibl, H. - *Biochemistry* 18(8) (1979) 1459-1468
- Jost, P.C. & Griffith, O.H. - em "Lipid Protein Interaction" Wiley, New York (1982)
- Kerker, M. - "The Scattering of Light, and other electromagnetic radiation" Edit. Academic Press (1969)
- Knowles, P.F.; Marsh, D.; e Rattle, H.W.E. - em "Magnetic Resonance of Biomolecules" - Edit. John Wiley & Sons (1976)
- Kodama, M.; Miyata, T. e Yokoyama, T. - *Biochim. Biophys. Acta* 1168 (1993) 243-248
- Kraayenhof, R.; Sterk, G.J.; Sang, H.W.W.F., Krab, K. e Eppard, R.M. - *Biochim. Biophys. Acta* 1282 (1996) 293-302
- Kratochvíl, P. - em "Classical Light Scattering from Polymer Solutions" (1987), Edit. Elsevier
- Kumar, V.V. - *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 444-448
- Lakhdar-Ghazal, F. & Tocanne, J.F. - *Biochim. Biophys. Acta* 943 (1988) 19-27
- Lakhdar-Ghazal, F.; Tichadou, J.L.; e Tocanne, J.F. - *Eur. J. Biochem.* 134 (1983) 531-537
- Lasic, D. - *American Scientist* 80 (1992) 21-31
- Lee, A.G. - em "Membrane Fluidity in Biology" vol. 2 - (1983) Editado por R. C. Aloia, Edit. Academic Press, Inc.; pp. 43-89
- Lehninger, A.L. - "Princípios de Bioquímica" Cap. 4 Edit. Sarvier (1984)
- Marsh, D. - em "Membrane Spectroscopy" editado por Ernst Grell, Springer Verlag (1981)
- Marsh, D.; Watts, A. e Knowles, P.F. - *Biochim. Biophys. Acta* 465 (1977) 500-514
- Marsh, D. - *Biochim. Biophys. Acta* 363 (1974) 373-386
- McFairland, M.G. - em "Advances in Lipid Research" vol.2 p. 91-125 editado por Paoletti, R. & Kritschinsky, D. - Edit. Academic Press (1964)
- McLaughlin, S - em "Current Topics in Membranes and Transport" vol. 9 (1977)
- Millman, M.E.L.; Rand, P. e Parsegian, V.A. - *Biophys. J.* 40 (1982) 221-232
- Pecora, R. & Aragón, S.R. - *Chem. Phys. Lipids* 13 (1974) 1-10
- Rooney, S.A.; Canavan, P.M. e Motoyama, E.K. - *Biochim. Biophys. Acta* 360 (1974) 56-67

Rouser, G.; Fleischer, S. e Yamamoto, A. - *Lipids* 5 (1970) 494-496

Sacré, M.M. & Tocanne, J.F. - *Chem. Phys. Lipids* 18 (1977) 334-354

Salonen, I.S.; Eklund, K.K., Virtanen, J.A. e Kinnunen, P.K.J. - *Biochim. Biophys. Acta* 982 (1989) 205-215

Seddon, J.M. & Cevc, G. - em "Phospholipid Handbook" p.431 - editado por Cevc, G.; Editora Marcel Dekker, Inc. (1993)

Silvius, J.R. & Brown, P.M. - *Biochemistry* 25 (1986) 4249-4258

Stryer, L. - em "Biochemistry" 3ª ed. p. 41-42 Edit. W.H. Freeman and Company (1988)

Swartz, H.M.; Bolton, J.R.; e Borg, D.C. - em "Biological Applications of Electron Spin Resonance", edit. Wiley-Interscience (1972)

Tanford, C. - em "Physical Chemistry of Macromolecules" cap. 3 e 5, Edit. Wiley (1961)

Tatulian, S.A. - em "Phospholipid Handbook" p.431 - editado por Cevc, G.; Editora Marcel Dekker, Inc. (1993)

Tocanne, J.F. & Teissié, J. - *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (1990) 111-142

Tocanne, J.F.; Ververgaert, P.H.J.Th.; Verkleij, A.J. e van Deenen, L.L.M. - *Chem. Phys. Lipids* 12 (1974) 201-219

Toko, K. & Yamafuji, K. - *Chem. Phys. Lipids* 26 (1980) 79-99

Träuble, H. & Eibl, H. - *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71(1) (1974) 214-219

Träuble, H. & Haynes, D.H. - *Chem. Phys. Lipids* 7 (1971) 324-335

Träuble, H.; Teubner, M.; Wooley, P.; Eibl, H. - *Biophysical Chemistry* 4 (1976) 319-342

van Zanten, J.H. & Monbouquette, H.G. - *J. Colloid and Interface Sci.* 146(2) (1991) 330-336

van Zanten, J.H. & Monbouquette, H.G. - *J. Colloid and Interface Sci.* 165 (1994) 512-518

van Zanten, J.H. - *J. Chem. Phys.* 102(22) (1995) 9121-9128

Vaz, W.L.C.; Nicksch, A. e Jähnig, F. - *Eur. J. Biochem.* 83 (1978) 299-305

Voet, D. & Voet, J.G. - em "Biochemistry" p. 35-40 Edit. John Wiley & Sons Inc. (1990)

Vogel, A.I. - em "Análise química quantitativa" pp.422-429, (1992)

von Hippel, P.H. & Schleich, T. - *Accounts of the Chemical Research* 2(9) (1969) 257-265

Warner, M. - *Colloid & Polymer Sci.* 261 (1983) 508-519

Ware, B.R. - em "Optical Techniques in Biological Research" - pp.2-23. editado por Rousseau, D., Academic Press (1984)

Watts, A.; Harlos, K. e Marsh, D. - *Biochim. Biophys. Acta* 645 (1981) 91-96

Watts, A.; Harlos, K.; Maschke, W. e Marsh, D. - *Biochim. Biophys. Acta* 510 (1978) 63-74

Yi, P.N. & MacDonald, R.C. - *Chem. Phys. Lipids* 11 (1974) 114-134

Zimm, B.H. - *The Journal of Chemical Physics* 16(12) (1948) 1093-1116.